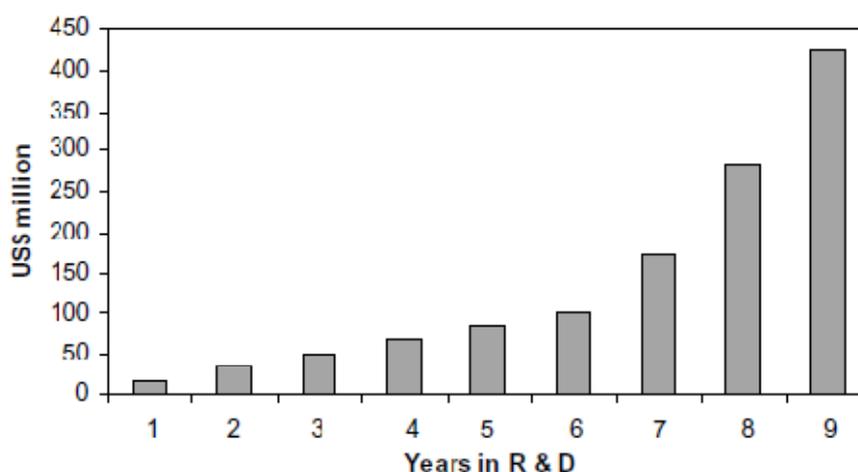


## 1. INTRODUZIONE

La progettazione e la realizzazione (*drug discovery*) di una molecola innovativa in campo farmaceutico viene definita, in gergo strettamente tecnico, come NCE (*New Chemical Entity*) e costituisce una delle principali attività di ricerca su cui le grandi multinazionali farmaceutiche investono ingenti capitali.

Tuttavia il *drug discovery* è un percorso arduo e molto dispendioso: è stato stimato che la spesa totale per la ricerca e lo sviluppo farmaceutico a carico delle maggiori industrie farmaceutiche degli Stati Uniti d'America supera i 20 miliardi di dollari e, secondo le stime statistiche, questo dato è in continuo aumento<sup>1</sup>.

Il costo medio per ogni nuova molecola ad attività biologica, da quando viene progettata e realizzata a quando giunge al consumatore finale, si aggira intorno ai 400 milioni di dollari (fig.1)<sup>2-4</sup> e tutto il processo può richiedere più di 14 anni di tempo<sup>5</sup>.



**Figura 1:** Fondi destinati allo sviluppo di NCE negli USA negli ultimi 10 anni

Proprio a causa di questi alti costi di gestione e di questi ampi tempi di sviluppo le politiche economiche delle grandi aziende farmaceutiche sono gradualmente cambiate in risposta, soprattutto, alle enormi pressioni provenienti dai settori del marketing e dell'economia, che spingono verso una massimizzazione dell'efficienza dei principi attivi di nuova sintesi ed una minimizzazione dei tempi necessari alla loro immissione in commercio. Per tale motivazione, a partire dai primi anni '90, sono state analizzate le diverse tappe che è necessario percorrere da quando un principio attivo è in fase di progettazione a quando può essere immesso nel circuito di vendita, al fine di capire dove fosse possibile apportare delle migliorie.

Tale processo produttivo può essere diviso in diversi step<sup>6</sup>:

- Identificazione del meccanismo biochimico che sta alla base dello sviluppo della patologia da trattare
- Identificazione del target molecolare che regola tale meccanismo
- Studi di drug design/docking molecolare
- Creazione di una serie di composti potenzialmente attivi
- Selezione e sviluppo di un composto Lead
- Isolamento di una o più molecole
- Trials clinici

Nelle prime fasi del periodo di sviluppo viene identificato un sito target di interesse farmacologico. Solo quando vi sono prove sufficienti per confermare la relazione tra questo bersaglio molecolare ed una malattia di interesse, vengono poi sintetizzati decine di nuovi composti e testati contro l'obiettivo. Di questi solo alcuni possiedono l'attività biologica desiderata e, dopo un primo screening, vengono sintetizzati degli analoghi strutturali che saranno ulteriormente testati per migliorarne l'attività ed ottimizzati numerosissime volte, al fine di individuare un piccolo numero di composti adatti ai test farmacologici su modelli in vivo. Alla fine restano in media solo pochi composti che saranno ottimizzati per ulteriori sviluppi e che entreranno nelle fasi della sperimentazione clinica. Sfortunatamente il 90% dei composti che entrano in queste fasi di sperimentazione vengono scartati per diversi motivi<sup>7</sup>. In particolare, uno studio condotto da Prentis e coll., dimostra che circa il 40% dei composti viene scartato a causa di uno scarso profilo farmacocinetico e che più del 20% mostra tossicità correlata ad effetti collaterali dovuti ad una inadeguata biodistribuzione<sup>8</sup>. Questa attenta analisi ha portato allo sviluppo del Drug Delivery, un settore innovativo in campo farmaceutico che, soprattutto negli ultimi anni, sta assistendo ad una crescita e ad una diffusione nella comunità scientifica sempre maggiore.

La filosofia che sta alla base di questo settore scientifico è quella di migliorare il profilo farmacocinetico delle molecole e, conseguentemente, di ridurre entro i limiti del possibile gli effetti collaterali ed i danni che ne conseguono.

Inoltre, come sarà meglio descritto in seguito, il principio attivo può essere protetto dall'ambiente circostante e ciò consente anche l'impiego di molecole chimicamente labili altrimenti inutilizzabili.

Infine, lo sviluppo di sistemi di rilascio tecnologicamente avanzati, richiede costi relativamente contenuti se paragonati a quelli necessari per affrontare lo sviluppo di una NCE.

Esistono numerosi sistemi di rilascio, definiti *DDS* (Drug Delivery Systems), che differiscono sia per le materie prime che li costituiscono (polimeri, lipidi, carboidrati ecc.), sia per le dimensioni che per i siti che il principio attivo deve raggiungere. In ogni caso il più importante obiettivo che ci si propone è quello di veicolare il principio attivo direttamente sul sito bersaglio, limitandone la distribuzione su altri tessuti e garantendo la concentrazione minima efficace per uno specifico periodo di tempo.

Le proprietà chimico-fisiche del principio attivo giocano un ruolo chiave nella progettazione di una formulazione a rilascio controllato ed è fondamentale effettuare degli studi preliminari accurati per determinare se tali proprietà sono compatibili con il distretto che si deve raggiungere. Generalmente si preferisce impiegare principi attivi allo stato solido in quanto sono chimicamente più stabili e sono più agevolmente lavorabili rispetto a sostanze in forma liquida. Tuttavia i farmaci solidi devono prima passare in soluzione nei liquidi fisiologici per poter espletare la loro azione biologica per cui devono possedere le giuste caratteristiche di solubilità e di stabilità in questi distretti. Bisogna tenere conto dei valori di pH e della forza ionica dei distretti interessati e delle caratteristiche di lipofilità, in quanto sono tutte caratteristiche che influenzano drasticamente la solubilità di una sostanza.

Una tipica caratterizzazione chimico-fisica preliminare prevede uno studio di stabilità del principio attivo in funzione della variazione di pH. Nel caso di farmaci allo stato solido vengono condotte sia delle

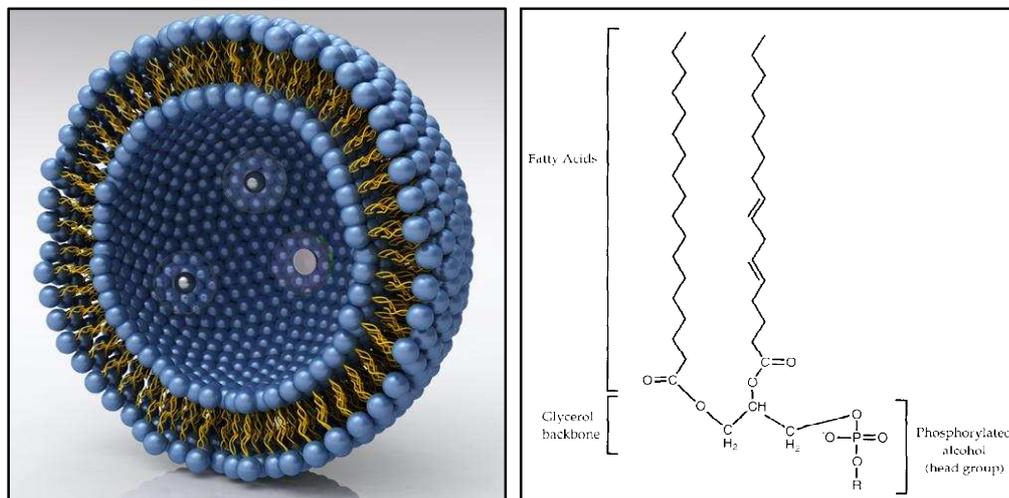
analisi calorimetriche per determinarne il loro stato fisico (amorfo, cristallino, ecc..) che delle caratterizzazioni spettrofotometriche termogravimetriche per determinarne la loro struttura chimica ed il grado di purezza<sup>9</sup> .

## ***1.1 LIPOSOMI***

I liposomi costituiscono un potenziale drug carrier per una vasta serie di principi attivi, inclusi composti a basso peso molecolare, proteine ad azione terapeutica ed agenti diagnostici. La loro utilità terapeutica consiste nella possibilità di incorporare al loro interno dei principi attivi idrosolubili, che non sarebbero normalmente biodisponibili in quanto non verrebbero assorbiti a causa della loro scarsa interazione con i fosfolipidi delle membrane cellulari. In ogni caso possono essere veicolati anche farmaci di origine lipofila o sostanze con caratteristiche antipatiche, la cui parte lipofila si colloca all'interno del bilayer mentre la porzione idrofila si dispone all'interno dei compartimenti acquosi. I sistemi liposomiali si formano quando dei fosfolipidi, di origine sintetica o naturale, vengono dispersi in un mezzo acquoso<sup>10</sup>. In queste condizioni, infatti, si verificano delle interazioni dipolo-dipolo tra le teste polari delle catene fosfolipidiche e le molecole di acqua con una conseguente formazione di sistemi unilamellari o multilamellari sferici (vesicole) (fig. 2a). Tali vescicole presentano una notevole analogia strutturale con il doppio strato lipidico caratteristico delle membrane biologiche e ciò conferisce loro una elevata biocompatibilità ed un alto grado di penetrabilità nell'ambiente intracellulare.

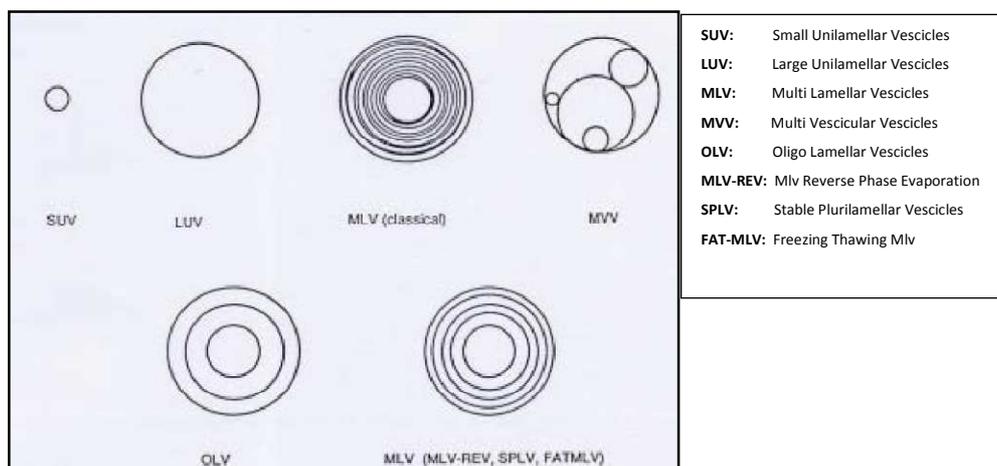
La struttura chimica generale dei fosfolipidi è costituita dall'acido fosfatidico, un acido formato da un backbone di glicerolo in cui il gruppo idrossile in posizione 3 è esterificato con una molecola di acido fosforico, mentre i restanti gruppi idrossilici in posizione 1 e 2 sono esterificati con acidi grassi di lunghezza variabile (fig. 2b). Il

grado di lipofilia può essere definito in fase di progettazione sia modulando la lunghezza della catena degli acidi grassi esterificati in posizione 1 e 2, che scegliendo opportune molecole funzionalizzanti che possono essere esterificate su uno degli ossigeni disponibili dell'acido fosforico in posizione 1 del glicerolo (serina, etanolamina, colina, inositolo, ecc...). E' possibile anche modificare la struttura tridimensionale delle vescicole. Aumentando la lunghezza delle catene di acidi grassi o inserendo delle molecole di colesterolo<sup>11</sup> in fase di preparazione, ad esempio, si ottengono degli strati fosfolipidici più sottili. Incrementano il grado di insaturazione o il grado di ramificazione o aumentando la temperatura in fase di formulazione, invece, si ottiene un minore grado di impacchettamento dei lipidi<sup>12</sup>.



**Figura 2:** Struttura tridimensionale di una vescicola liposomiale (a) e dell'acido fosfatidico (b)

Per la preparazione dei liposomi sono state sviluppate e testate numerose procedure, ma solo alcune di esse sono in grado di produrre dei sistemi in grado di incorporare principi attivi idrosolubili. Tra queste le più usate sono la tecnica di evaporazione in fase inversa<sup>13</sup>, la tecnica dell'iniezione<sup>14, 15</sup> o la tecnica freeze-thaw<sup>16</sup>. Tutte queste tecniche consentono la formazione di strati uni lamellari o multilamellari ma devono essere applicate seguendo schemi elaborati ed ordinati in modo tale da ottenere sistemi il più omogenei possibile. In questo modo, combinando diverse tecniche di preparazione all'impiego di fosfolipidi di diversa natura, è possibile ottenere una vasta gamma di sistemi liposomiali morfologicamente diversi ed adatti alla veicolazione in numerosi distretti biologici. Per questa motivazione i sistemi liposomiali possono essere classificati secondo diversi criteri. Una classificazione viene effettuata in base alla tecnica di preparazione adoperata per la loro realizzazione, tuttavia vengono più comunemente classificati in base alle loro caratteristiche dimensionali e strutturali (fig. 3).

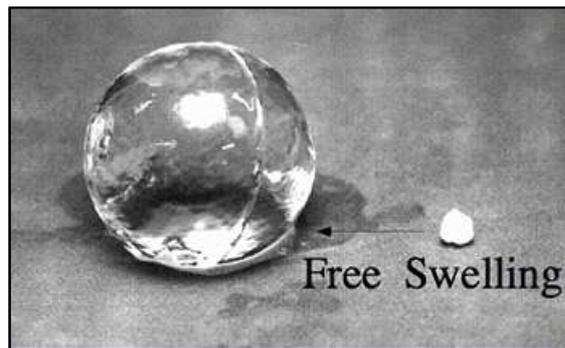


**Figura 3:** Classificazione generale dei liposomi

Oggi esistono in commercio alcune specialità medicinali basate sull'impiego di sistemi liposomiali. Ad esempio l'*AMBISOME*® è un prodotto liofilizzato, sterile ed apirogeno destinato ad un'infusione endovenosa. E' costituito da liposomi unilamellari con un diametro inferiore ai 100 nm (SUV) contenenti Amfotericina B, un antimicotico a struttura anfotera intercalato tra i bilayer lipidico. Rispetto alla tradizionale formulazione, l'*AMBISOME*® risulta essere attivo a concentrazioni inferiori e presenta minori effetti tossici.

## 1.2 IDROGEL

Gli idrogel sono polimeri reticolati, tridimensionali e idrofilici, capaci di incorporare grandi quantità di acqua o di fluidi biologici<sup>17, 18</sup>. I reticoli sono composti da omopolimeri o copolimeri e sono insolubili in acqua a causa della presenza di legami chimici e fisici<sup>19, 20</sup>. Gli idrogel mostrano compatibilità termodinamica con l'acqua, che permette loro di rigonfiarsi nei mezzi acquosi (fig. 4)<sup>17, 18, 21-23</sup>.



**Figura 4:** Fenomeno di swelling caratteristico degli idrogel

Esistono numerose applicazioni degli idrogel, in particolare nei settori medico e farmaceutico<sup>24-26</sup>.

Gli idrogel assomigliano ai tessuti viventi naturali più di ogni altra classe di biomateriali sintetici. Ciò è dovuto al loro alto contenuto in acqua ed alla consistenza soffice che è simile al tessuto naturale<sup>24</sup>. Inoltre, l'elevato contenuto di acqua di questi materiali contribuisce alla loro biocompatibilità. Quindi, gli idrogel possono essere usati per lenti a contatto, membrane per biosensori, materiali per pelle

artificiale, e dispositivi per il rilascio di farmaci<sup>24-28</sup>. Gli idrogel possono essere classificati come neutri o ionici, in base alla natura dei loro gruppi funzionali in catena laterale. Inoltre in base al metodo di preparazione utilizzato, si possono distinguere networks omopolimerici o copolimerici. Infine possono essere classificati in base alla struttura fisica del reticolo come amorfi, semicristallini, strutture con legami ad idrogeno, strutture supramolecolari e aggregati idrocolloidali<sup>17-20, 29-37</sup>. Gli idrogel possono anche mostrare un comportamento di rigonfiamento dipendente dall'ambiente esterno. Questi polimeri sono idrogel a risposta fisiologica<sup>38</sup>, in cui i reticoli possono essere rotti o possono rigonfiarsi come risultato del cambiamento dell'ambiente esterno. Questi sistemi tendono a mostrare drastici cambiamenti nel loro rapporto di rigonfiamento. Alcuni dei fattori che influenzano il rigonfiamento o la risposta fisiologica degli idrogel includono pH, forza ionica, temperatura e radiazioni elettromagnetiche<sup>38</sup>. Un modo conveniente per classificare gli idrogel è basato sulla natura dei gruppi laterali; essi possono essere sia neutri che ionici. La natura chimica ed il numero di questi gruppi può essere ben controllato dalla scelta dei parametri usati nella sintesi polimerica. Un elenco dei monomeri più comunemente usati nella preparazione dei materiali polimerici nel campo farmaceutico è indicato in Tabella 1.

Monomer abbreviation	Monomer
HEMA	Hydroxyethyl methacrylate
HEEMA	Hydroxyethoxyethyl methacrylate
HDEEMA	Hydroxydiethoxyethyl methacrylate
MEMA	Methoxyethyl methacrylate
MEEMA	Methoxyethoxyethyl methacrylate
MDEEMA	Methoxydiethoxyethyl methacrylate
EGDMA	Ethylene glycol dimethacrylate
NVP	<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone
NIPAAm	<i>N</i> -isopropyl AAm
VAc	Vinyl acetate
AA	Acrylic acid
MAA	MAA
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl) methacrylamide
EG	Ethylene glycol
PEGA	PEG acrylate
PEGMA	PEG methacrylate
PEGDA	PEG diacrylate
PEGDMA	PEG dimethacrylate

**Tabella 1:** Monomeri comunemente usati nella sintesi di idrogel per applicazioni farmaceutiche.

Nuovi materiali polimerici possono essere realizzati per risolvere specifici problemi nel rilascio dei farmaci <sup>39</sup>. Quindi, materiali innovativi basati sull'impiego di polimeri come PHEMA, poli(*N*-isopropilacrilammide) (PNIPAAm), e poli(vinil alcol) (PVA), sono sintetizzati principalmente attraverso tecniche di preparazione moderne ed innovative e nuovi monomeri sono stati preparati per la produzione di polimeri con le proprietà desiderate.

Gli idrogel sono usati anche come carriers che possono interagire con la mucosa che riveste il tratto gastrointestinale, il colon, la vagina, il naso ed altre parti del corpo, a causa della loro abilità di prolungare il tempo di permanenza nel luogo di rilascio <sup>40</sup>. Si pensa che l'interazione tra tali carriers e le glicoproteine della mucosa avvenga principalmente attraverso legami ad idrogeno. Quindi, i materiali contenenti un'alta percentuale di gruppi carbossilici ed idrossilici appaiono promettenti per questo tipo di applicazioni.

Uno dei più importanti fattori che influenzano il rigonfiamento degli idrogel è l'entità della reticolazione, che è definita come il rapporto tra le moli dell'agente reticolante e le moli delle unità ripetitive del polimero. Più tale valore è alto, più l'agente reticolante è incorporato nella struttura dell'idrogel. Gli idrogel altamente reticolati hanno una struttura più stretta, e si rigonfieranno meno, in confronto agli stessi idrogel con un rapporto di reticolazione più basso. La reticolazione ostacola la mobilità delle catene polimeriche, quindi diminuisce l'entità del rigonfiamento. Anche la struttura chimica del polimero può influenzare l'entità del rigonfiamento degli idrogel. Quelli contenenti gruppi idrofilici si rigonfiano maggiormente, rispetto a quelli contenenti gruppi idrofobici, poiché i gruppi idrofobici collassano in presenza di acqua, minimizzando quindi la loro esposizione alle molecole di tale solvente. Il rigonfiamento degli idrogel sensibili alle condizioni ambientali può essere influenzato da stimoli specifici. Il rigonfiamento degli idrogel temperatura-sensibili può essere influenzato da cambiamenti della temperatura del mezzo di rigonfiamento. La forza ionica ed il pH influenzano invece rispettivamente gli idrogel forza ionica-sensibili e pH-sensibili.

Gli idrogel ambiente-sensibili sono in grado di rispondere ai cambiamenti del loro ambiente esterno. Essi possono esibire drastiche variazioni nel comportamento di rigonfiamento, nella struttura reticolata, nella permeabilità e nella forza meccanica in risposta ai cambiamenti del pH, della forza ionica del fluido circostante o della temperatura<sup>41</sup>. Altri idrogel hanno la capacità di rispondere all'applicazione di campi elettrici o magnetici, o al cambiamento nella concentrazione del glucosio<sup>41</sup>. A causa della loro natura, questi materiali possono essere usati in un'ampia varietà di applicazioni.

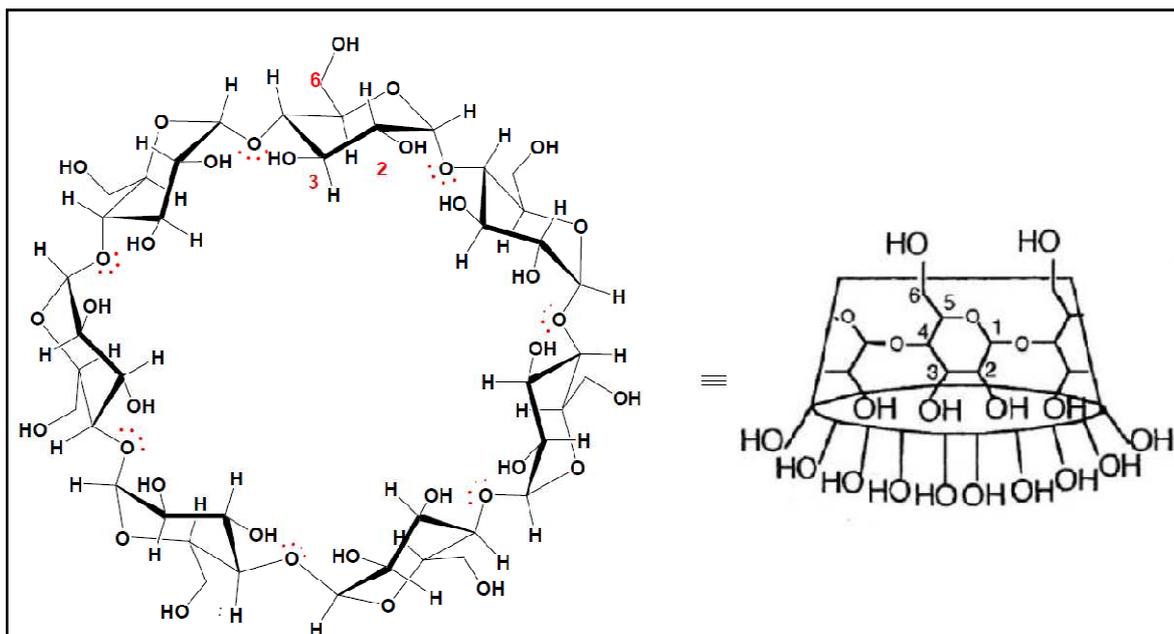
Le proprietà meccaniche degli idrogel sono molto importanti per le applicazioni farmaceutiche. Ad esempio, l'integrità del dispositivo di rilascio del farmaco per la durata dell'applicazione è molto importante per ottenere l'approvazione della FDA, a meno che il dispositivo sia progettato come un sistema biodegradabile. Un sistema di rilascio del farmaco progettato per proteggere un agente terapeutico sensibile, come una proteina, deve mantenere la sua integrità, finché il principio attivo viene rilasciato completamente.

### ***1.3 CICLODESTRINE***

La prima descrizione delle molecole che successivamente vennero classificate come ciclodestrine (CD), fu pubblicata da Villiers nel 1891. Egli isolò due prodotti cristallini provenienti dalla degradazione dell'amido da parte di un batterio, il *Bacillus Amylobacter*. Nel 1903, Schardinger studiò la degradazione dell'amido, e mise in evidenza la produzione delle stesse ciclodestrine, che chiamò  $\alpha$  e  $\beta$ -destrine. Solo nel 1930, Freudenberg e i suoi collaboratori dimostrarono che le CD cristallizzate da Schardinger erano costituite da unità di glucosio legate con legami 1,4- $\alpha$ -glucosidici. Essi isolarono per la prima volta delle frazioni pure e nel 1936 pubblicarono la struttura ciclica di queste molecole. All'inizio degli anni '50 French e Cramer svilupparono unitamente ai metodi di produzione enzimatica delle CD, quelli relativi alla purificazione delle frazioni ottenute e determinarono le loro proprietà chimico-fisiche. Descrissero inoltre la presenza di CD più grandi mettendo in evidenza le loro proprietà complessanti. La letteratura degli ultimi decenni ha mostrato un crescente interesse nella sintesi di CD modificate, per il moltiplicarsi dei campi di applicazione nel settore biologico, farmaceutico, analitico, cosmetico e non ultimo nella sintesi organica. Tale successo è dovuto alla loro spiccata capacità di formare complessi di inclusione con una grande varietà di composti organici sia in soluzione che allo stato solido. A partire dalla fine degli anni '60 sono stati scoperti vari metodi per la preparazione di CD native in laboratorio, e sono state illustrate le proprietà che permettono di formare i complessi di inclusione. In quel periodo le CD risultavano essere delle molecole

molto interessanti e promettenti, ma ancora troppo costose per poter essere prodotte su larga scala.

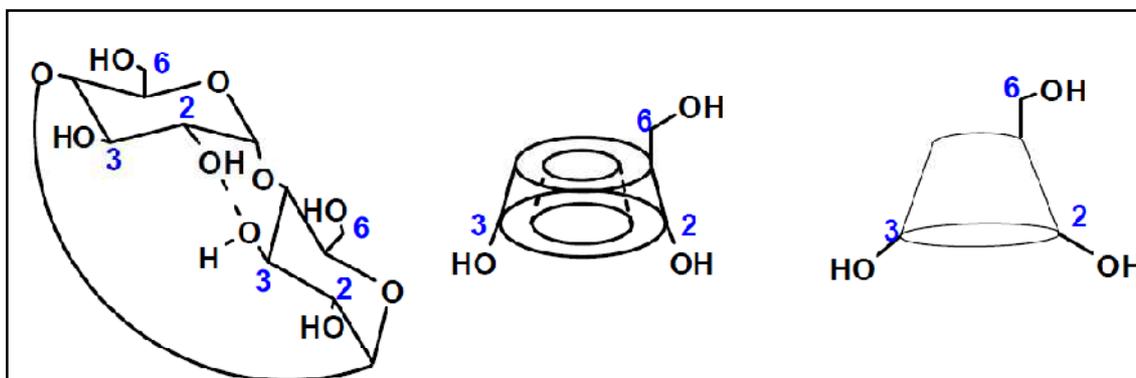
Strutturalmente le CD sono oligosaccaridi ciclici composti da 6, 7, o 8 (ma anche 10, 14 fino a 26) unità di  $\alpha$ -D-glucopiranosio, unite mediante legami 1,4- $\alpha$ -glucosidici a formare rispettivamente  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, anche se le più utilizzate sono quelle costituite da 8 unità. Sono ottenute su scala industriale per degradazione enzimatica dell'amido da parte di batteri in grado di sintetizzare l'enzima glucosiltransferasi, che permette la rottura della catena glucosidica e la successiva reazione di ciclizzazione intramolecolare. Le CD presentano diverse tipologie di ossidrili: quelli primari si trovano in posizione 6 degli anelli glucosidici, mentre i secondari sono collocati in posizione 2 e 3. Gli ossidrili in 6 sono i più reattivi, i più nucleofili ed i più facilmente accessibili grazie a uno scarso impedimento sterico; gli ossidrili in 2 sono i più acidi; gli ossidrili in 3 sono i meno reattivi e i meno accessibili, poiché, essendo rivolti verso l'interno della cavità ciclodestrinica, sono soggetti ad un maggiore impedimento sterico. Come conseguenza della conformazione  ${}^4C_1$  delle unità glucopiranosidiche tutti gli ossidrili secondari sono situati sulla medesima faccia dell'anello ciclodestrinico, mentre quelli primari sono situati sull'altra faccia. L'anello in realtà è un cilindro frequentemente raffigurato come una ciambella o un tronco di cono, la cui cavità è delineata rispettivamente dagli atomi di idrogeno e dai ponti ossigeno glucosidici (fig. 5).



**Figura 5:** Struttura di una ciclodestrina

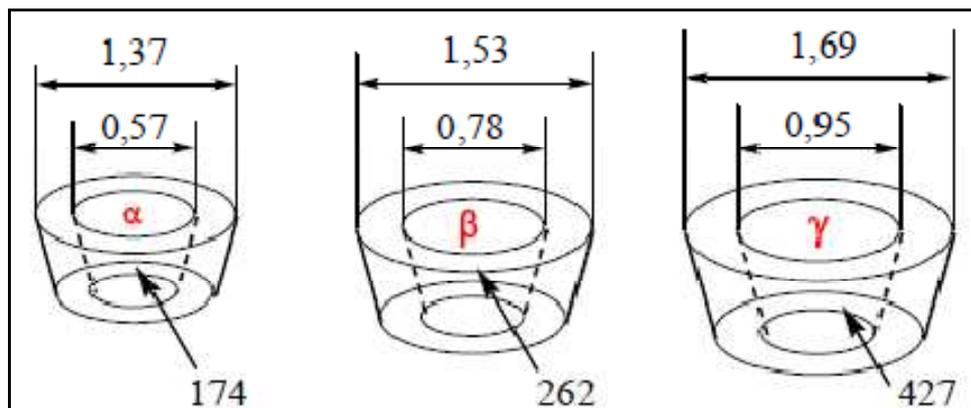
I doppietti di elettroni di non legame degli atomi di ossigeno sono diretti verso l'interno della cavità producendo così un'alta densità elettronica e conferendo alla CD caratteristiche di base di Lewis. La forma macrociclica aumenta la rigidità della struttura favorendo la formazione di ponti idrogeno intramolecolari tra i gruppi ossidrilici delle posizioni 2 e 3. La rotazione dei gruppi secondari viene così ridotta contrariamente a quella degli ossidrili in 6 che restringono parzialmente l'accesso alla cavità attraverso la faccia primaria.

La formazione di legami ad idrogeno tra l'ossidrile in 2 di un monomero e l'ossidrile in 3 di quello adiacente, è responsabile della rigidità della struttura delle CD. Tale effetto è particolarmente marcato nelle  $\beta$ -CD. La struttura delle CD, per convenzione, può essere schematizzata in modi diversi con una immagine a tronco di cono (fig. 6).



**Figura 6:** Struttura ciclodestrinica a tronco di cono e legame ad idrogeno intramolecolare

La solubilità in acqua delle CD è strettamente correlata alla capacità dei gruppi ossidrilici di formare legami ad idrogeno con il solvente. All'interno delle tre famiglie, la disposizione spaziale dei monomeri di glucosio determina sia il numero che l'intensità di interazioni tra gli ossidrili. Pertanto la  $\gamma$ -CD possedendo una struttura meno rigida risulta essere la più solubile (23,2 g/100 ml), seguono la  $\alpha$ -CD (14,5 g/100 ml) e la  $\beta$ -CD (1,85 g/100 ml). La modesta solubilità in acqua della  $\beta$ -CD, imputabile alla riduzione di solvatazione, è causata dalla rigidità della struttura. Le tre classi di CD si differenziano anche per le dimensioni della cavità (fig. 7), dalla quale dipendono le caratteristiche delle molecole che possono essere incluse e la relativa stabilità dei complessi formatisi.



**Figura 7:** Dimensioni (nm) e volume (Å<sup>2</sup>) delle cavità ciclodestriniche

La β-CD, pur essendo la meno solubile, è quella maggiormente utilizzata in quanto produce i complessi di inclusione più stabili. La stabilità del complesso è misurata dalla costante di inclusione e dipende dalla struttura della molecola in esame, che dovrà presentare almeno una porzione o un pendaglio idrofobo<sup>42</sup>.

La peculiare abilità delle CD di includere sostanze idrofobicamente compatibili all'interno della cavità ha permesso la loro applicazione anche in campo farmaceutico<sup>43</sup>. Grazie alla loro bioadattabilità ed alle loro caratteristiche multifunzionali, le ciclodestrine possono agire come un sistema a rilascio controllato e pertanto possono essere potenzialmente impiegate in formulazioni di farmaci somministrabili per via orale, rettale<sup>42</sup>, nasale<sup>44</sup>, oftalmica<sup>45</sup>, transdermica e dermica<sup>46</sup>.

Molti vantaggi derivanti dall'impiego delle CD nel settore farmaceutico sono da ricercarsi nella più facile manipolazione di prodotti volatili, nell'aumentata resistenza delle sostanze nei confronti di reazioni di idrolisi e di ossidazione e al miglioramento di stabilità nei confronti di agenti fisici quali temperatura e luce. In taluni casi le

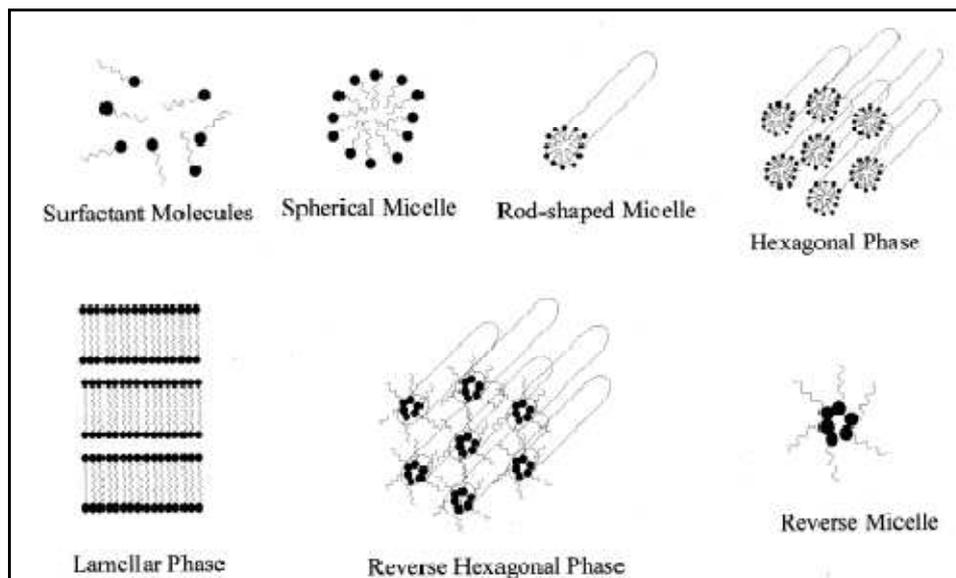
CD, in virtù delle loro capacità inclusive, sono state anche utilizzate per convertire in formulazioni come polveri più maneggevoli, sostanze di natura oleosa e liquida. Particolarmente interessanti sono poi gli impieghi delle CD come agenti miglioranti la palatabilità di molti farmaci soprattutto ad uso pediatrico, come protettivi delle mucose gastriche nelle somministrazioni orali e come fattori salvaguardanti l'integrità della pelle nelle somministrazioni per via dermica. A base ciclodestrinica sono infatti alcune formulazioni di antitumorali: la loro complessazione con CD. Infatti, diminuisce la necrosi della pelle dovuta alla mitomicina C, un farmaco anticancro impiegato in ambito clinico che causa lesioni dermatologiche importanti.

La bassa tossicità delle CD per via orale è imputabile alla loro degradazione ad opera non delle amilasi della saliva o del pancreas, ma delle  $\alpha$ -amilasi dei microorganismi della flora batterica del colon. Studi di assorbimento rivelano che solo il 2-4% delle CD viene assorbito dall'intestino tenue, mentre la restante parte è degradata e assorbita come glucosio a livello del colon. Più recentemente le CD sono state impiegate anche come sistemi di rilascio di agenti genoterapici come ad esempio plasmidi e vettori virali<sup>47</sup>. Oltre alle CD native, in campo farmaceutico sono utilizzati soprattutto i derivati acetilati delle  $\gamma$ -CD e i derivati idrossipropilici delle  $\beta$ -CD maggiormente solubili in acqua.

## ***1.4 MICROEMULSIONI***

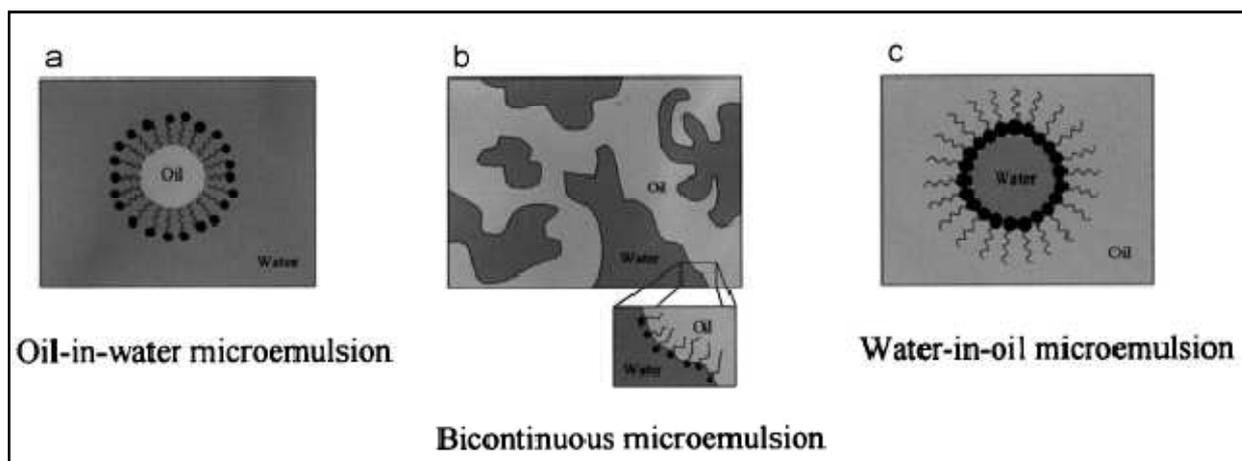
Il concetto generale di microemulsione è stato introdotto per la prima volta intorno alla seconda metà del '900 da Hoar e Schulman che, in seguito ad una titolazione di una sospensione lattiginosa con esanolo, hanno ottenuto una soluzione limpida a singola fase<sup>48</sup>. In seguito lo stesso Schulman ha condotto numerosi studi sulle microemulsioni per mettere a punto delle formulazioni sempre più stabili<sup>49</sup>.

Le microemulsioni sono comunemente definite come dei sistemi di acqua, olio e molecole anfifiliche caratterizzati da isotropia ottica e da una relativa stabilità termodinamica<sup>50</sup>. Da un punto di vista pratico la principale differenza che intercorre tra emulsioni e microemulsioni sta nel fatto che, nonostante i primi sistemi possono presentare una eccellente stabilità cinetica, sono termodinamicamente instabili e, pertanto, potranno andare facilmente incontro a fenomeni di separazione di fase<sup>51</sup>. Un'altra importante differenza riguarda il loro aspetto in quanto, mentre le emulsioni appaiono visibilmente lattescenti, le microemulsioni sono limpide o translucide all'analisi visiva. Infine, in fase preparativa, le emulsioni richiedono un apporto di energia senza dubbio superiore rispetto alle microemulsioni e questo influisce ovviamente sulle potenziali applicazioni pratiche e sui costi di produzione in larga scala (fig. 8).



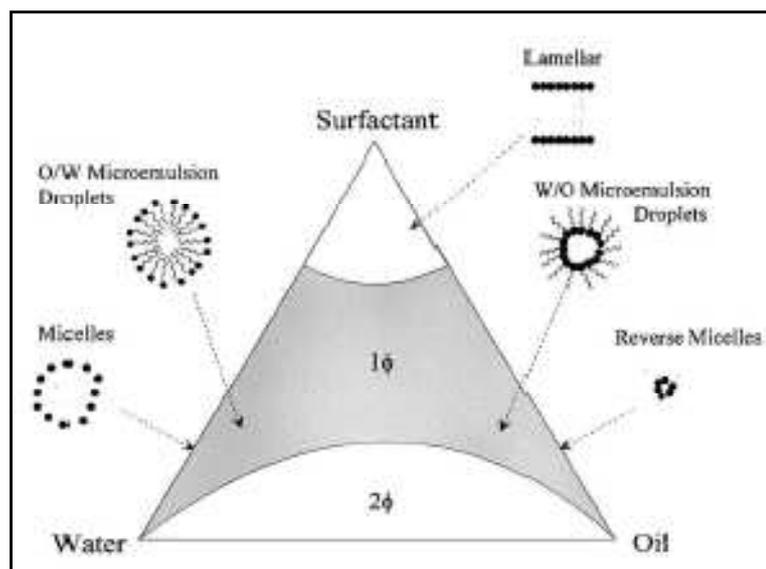
**Figura 8:** Rappresentazione schematica delle più comuni strutture di autoassemblamento dei tensioattivi

Nel caso in cui i tensioattivi siano dispersi in un sistema di due sostanze immiscibili la struttura termodinamicamente favorita è quella che si ottiene quando essi si dispongono all'interfaccia dei due componenti del sistema, con la coda idrofoba orientata verso la fase oleosa e la testa idrofila orientata verso la fase acquosa. Le possibili conformazioni dipendono in maggior parte dalle quantità relative dei componenti delle microemulsioni<sup>52</sup>. Nel caso in cui la fase oleosa sia in quantità ridotte rispetto alla fase acquosa si formerà una microemulsione O/A (fig. 9a), viceversa nel caso in cui i volumi di fase idrofila siano più piccoli si formerà una microemulsione A/O stabilizzata da micelle inverse (fig. 9c). Se i volumi delle due fasi si equivalgono la microemulsione avrà una struttura definita "bicontinua" in cui, in ogni caso, le molecole di tensioattivo saranno poste all'interfaccia tra le fasi stesse (fig. 9b).



**Figura 9:** Strutture più comuni delle microemulsioni: O/A (a), bicontinua (b) e W/O (c)

In fase di formulazione di una microemulsione, quindi, è di fondamentale importanza utilizzare le giuste quantità dei componenti in modo tale da ottenere una forma di dosaggio stabile. La tecnologia farmaceutica prevede l'impiego di particolari grafici che rendono più semplice il compito del formulatore. In questo modo è possibile impiegare dosare i costituenti in maniera adeguata per riuscire ad ottenere dei sistemi omogenei (fig. 10).



**Figura 10:** Esempio di grafico ternario per un sistema a tre componenti

Negli ultimi anni i sistemi basati su microemulsioni sono sempre più utilizzati come drug delivery systems grazie alle loro enormi potenzialità<sup>53-60</sup>. Infatti l'esistenza di microdomini con differente polarità permette l'incorporazione di molecole idrofobiche, idrofiliche o anfifiliche anche contemporaneamente. Sostanze idrofobiche, ad esempio, si collocano nei compartimenti oleosi di una microemulsione O/A o all'interfaccia dei due compartimenti e, contemporaneamente, è possibile incorporare dei principi attivi idrofili che si solubilizzeranno nella fase disperdente acquosa della stessa microemulsione.

I vantaggi si traducono in una preservazione delle peculiarità chimico-fisiche dei principi attivi, soprattutto per quanto riguarda sostanze particolarmente labili. In questo modo sarebbe possibile veicolare molecole di origine proteica anche per via orale, proteggendole dalla naturale degradazione enzimatica cui andrebbero incontro una volta raggiunti i distretti gastrici<sup>61</sup>.

Un sistema di rilascio in microemulsione, inoltre, permette l'aumento di solubilità di principi attivi (idrofilici o idrofobici) aumentandone la biodisponibilità<sup>62</sup> e, grazie alla presenza di tensioattivi e co-surfattanti come di gliceridi a media catena, aumentano l'affinità verso le membrane biologiche e migliorano il processo di uptake cellulare.

## 1.5 PROFARMACI

L'impiego di derivati chimici di molecole di interesse farmaceutico rappresenta un approccio alternativo in campo chimico-farmaceutico per superare le difficoltà relative al profilo farmacocinetico di molti farmaci<sup>63-66</sup>.

Un obiettivo comune nella progettazione di un profarmaco è quello di modificare una molecola di interesse farmaceutico attraverso la derivatizzazione chimica con particolari *promoiety*, con lo scopo di migliorarne le proprietà chimico-fisiche, biofarmaceutiche e farmacocinetiche<sup>67</sup>. Una volta assorbito, il profarmaco va incontro ad un destino metabolico che generalmente conduce alla liberazione della molecola attiva e del promoiety impiegato (fig. 11)

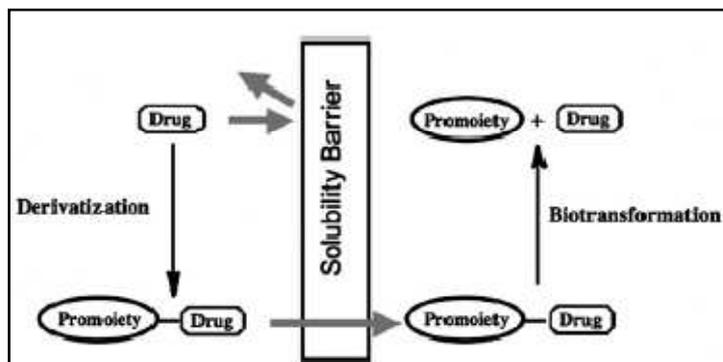
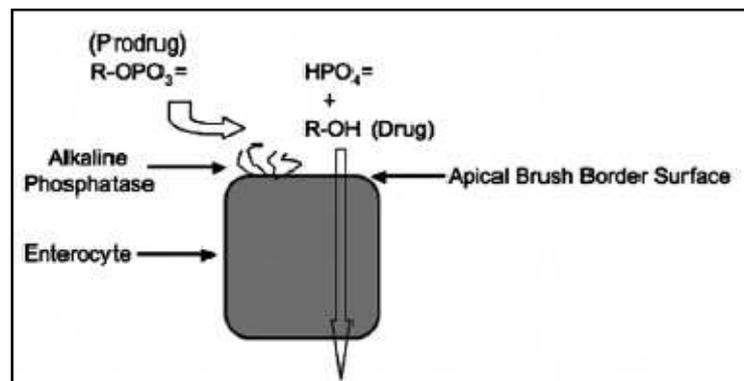


Figura 11: Destino metabolico di un profarmaco

L'uso di profarmaci risulta particolarmente utile per il drug delivery a livello intestinale dopo somministrazione orale. Un molecola che

presenta caratteristiche apolari, infatti, va facilmente incontro a fenomeni di uptake cellulare da parte degli enterociti. Contemporaneamente, però, tale caratteristica limita la sua solubilità nei fluidi intestinali e ciò si traduce in una bassa probabilità che il farmaco stesso entri in contatto con la mucosa intestinale e, quindi, che si renda biodisponibile. Questo problema può essere superato legando un gruppo fosfato al principio attivo che acquista maggiori caratteristiche di idrosolubilità e, di conseguenza, aumenta la quantità di farmaco che entra in contatto diretto con la mucosa. Una volta entrata in contatto con gli enterociti il profarmaco viene attaccato dalle fosfatasi alcaline fisiologicamente espresse in questi distretti e liberato dal gruppo fosfato. A questo punto la molecola riacquista la sua iniziale lipofilicità e viene agevolmente internalizzata e resa biodisponibile<sup>68</sup> (fig. 12).



**Figura 12:** Attacco della fosfatasi alcalina enterica a carico di un promoiety fosforico

Attualmente esistono in commercio numerosi profarmaci di questo tipo di cui sono state determinate le effettive miglorie del profilo

farmacocinetico rispetto al principio attivo di partenza come ad esempio l'antitumorale *EMCYT*®<sup>69, 70</sup> a base di estramustina fosfato, gli antiretrovirali *TELZIR*® e *LEXIVA*®<sup>71-75</sup> a base di fasamprenavil o l'antiepilettico *CEREBIX*®<sup>76, 77</sup> a base di fosfenitoina.

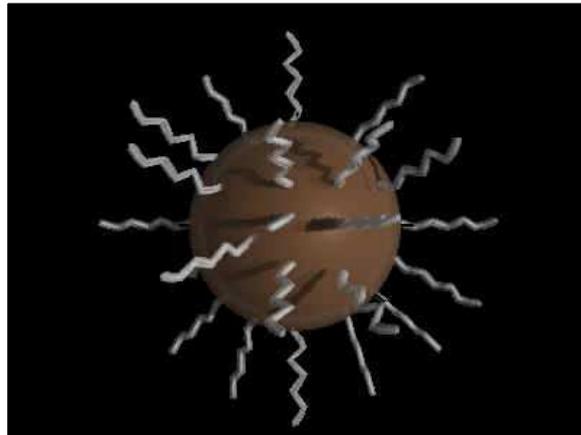
## ***1.6 NANOPARTICELLE POLIMERICHE***

I sistemi nanoparticellari hanno iniziato a farsi strada nel mondo del drug delivery a partire dai primissimi anni '80 per superare i diversi inconvenienti legati all'impiego di altre forme di rilascio innovative. Tali sistemi sono basati sull'impiego di tecnologie farmaceutiche avanzate applicate a materiali polimerici o lipidici e sono caratterizzati da particelle di dimensioni nanometriche in grado di incorporare farmaci ed altre sostanze di interesse biologico.

Le nanoparticelle polimeriche sono dei sistemi costruiti a partire da polimeri di diversa natura che si aggregano a formare delle strutture più o meno sferiche di dimensioni comprese nel range nanometrico. I polimeri impiegati per la preparazione di tali nanoparticelle possono essere di natura sintetica, semi-sintetica o naturale.

Una delle difficoltà legata all'impiego dei sistemi nanostrutturati in generale riguarda il destino metabolico dopo la somministrazione. Da diversi studi condotti da Allemann e Blunk<sup>78, 79</sup> risulta che quando un sistema nanostrutturato raggiunge il torrente ematico tende ad adsorbire sulla propria superficie numerose proteine ematiche, in particolar modo quelle del complemento. Questo fenomeno, definito opsonizzazione, è un processo che conduce alla rapida eliminazione del sistema dall'organismo, spesso ancor prima che riesca a liberare il principio attivo che incorpora. Per superare questa problematica è possibile creare attorno al nanosistema uno shell esterno composto da materiale idrofilico. Una ricerca condotta da Gref<sup>80</sup> dimostra che esiste una correlazione tra grado di opsonizzazione e tempo di permanenza nel torrente ematico di sistemi nanostrutturati polimerici. Ricoprendo le nanoparticelle con shell di Polietilenglicole (PEG) (fig.

13) aumenta l'idrofilia del sistema e, contemporaneamente, diminuisce il grado di opsonizzazione ed aumenta il tempo di permanenza in-vivo.



**Figura 13:** Ricostruzione 3D della struttura di una nanoparticella PEGhilata

Il ridotto fenomeno di adsorbimento di proteine del complemento sembra essere correlato alla massa molecolare ed alla densità superficiale dei sistemi, caratteristiche che ne limitano anche l'uptake epatico<sup>81</sup>. Torchilin ha studiato la variazione di interazioni esistente tra nanosistemi rivestiti e non rivestiti da altre matrici polimeriche. Oggetto della maggior parte di questi studi sono le nanoparticelle di PLGA rivestite con PEG. Lo studio ha dimostrato che la presenza di catene polimeriche flessibili ed idrofile quali i PEG, quando vengono graftate su superfici polimeriche di PLGA, formano una densa nube conformazionale che previene sia l'interazione del core polimerico con altre singole unità di nanosistema, che i fenomeni di adsorbimento di proteine plasmatiche e del complemento<sup>82</sup>.

Altri studi sono stati condotti su sistemi polimerici a base di PLA rivestiti da uno shell di MPOE (monometossi poliossietilene). Su questi sistemi sono state condotte delle analisi specifiche per determinare il grado di fagocitosi da parte dei monociti circolanti ed è stato notato che quando la concentrazione percentuale di MPOE nella miscela polimerica è superiore al 2-3 % si ha una drastica riduzione del fenomeno di fagocitosi ed aumento del tempo di permanenza dei sistemi nel torrente ematico<sup>83</sup>.

Gli stessi effetti possono essere ottenuti utilizzando come materiale polimerico per lo shell di rivestimento altri polimeri idrofili e biocompatibili quali ad esempio i *poloxamer*, le *poloxamine* ed i *polisorbati (tween)*.

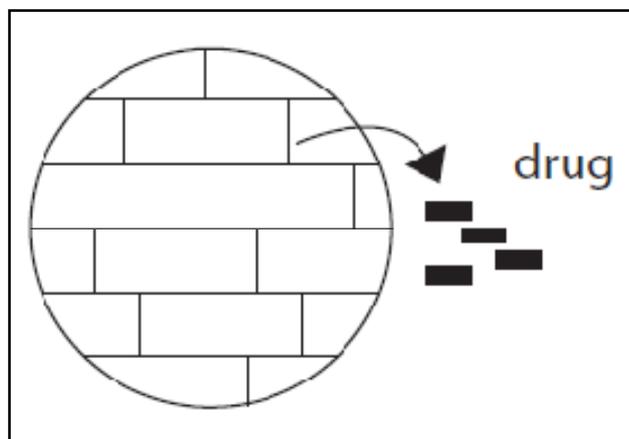
I sistemi nanoparticellari polimerici sono preparati sfruttando tecniche diverse in base alle necessità del formulatore. Il metodo dell'*evaporazione del solvente* prevede la dissoluzione del principio attivo in una soluzione organica (diclorometano, cloroformio, ecc...) del polimero preformato. Questa soluzione organica viene successivamente dispersa in una soluzione acquosa e rapidamente emulsionata per ottenere un'emulsione O/A stabilizzata da tensioattivi. Una volta ottenuta un'emulsione stabile si procede all'evaporazione del solvente organico in condizioni di pressione ridotta<sup>84</sup>. Un'altra metodica molto comune è quella della *polimerizzazione* in cui una soluzione di monomeri precursori viene addizionata di un mezzo polimerizzante in cui è dissolto il farmaco. In questo modo l'incorporazione del principio attivo avviene nello stesso momento in cui si forma il polimero<sup>85</sup>. Nella produzione di nanoparticelle polimeriche sono tuttavia impiegate numerose altre tecniche che sono scelte tenendo conto delle caratteristiche cui il

sistema stesso deve sottostare e che dipendono anche dal tipo di molecola che si vuole veicolare e dalle dimensioni finali che il sistema deve avere. Le più comunemente usate, giusto per citarne qualcuna, sono la tecnica della *diffusione del solvente*<sup>86-88</sup>, la tecnica del *salting out*<sup>89, 90</sup> o la tecnica che si avvale dell'impiego dei *fluidi supercritici*<sup>91-97</sup>.

## ***1.7 NANOPARTICELLE LIPIDICHE***

I principali problemi legati all'impiego di nanoparticelle composte da materiali polimerici derivano dai residui di solventi organici impiegati nei loro processi di produzione, dalla tossicità relativa che la maggior parte dei polimeri manifesta quando vengono internalizzati dalle cellule e dalla difficoltà di produzione su larga scala<sup>98</sup>. Nella maggior parte dei processi impiegati, infatti, si ottengono delle sospensioni o delle soluzioni nanoparticellari con concentrazioni molto basse che raramente superano il 2% in peso. Inoltre, durante le fasi di stoccaggio, va valutata l'elevata probabilità di idrolisi cui normalmente vanno incontro i materiali polimerici e questa labilità chimico-fisica richiede sempre la liofilizzazione dei sistemi nanoparticellari<sup>99</sup>. Una valida alternativa ai sistemi nanostrutturati polimerici è rappresentata dalle nanoparticelle lipidiche in quanto costituite da materiali altamente biocompatibili e prodotti senza l'impiego di solventi organici. Inoltre la relativa semplicità di preparazione ed i bassi costi di gestione ne permettono un potenziale sviluppo di produzione in larga scala. Le nanoparticelle lipidiche sono dei sistemi costituiti da una matrice di lipidi solidi con una conformazione pressoché sferica e diametro compreso tra i 50 nm ed i 1000 nm e sono state ottenute per la prima volta sostituendo il lipide liquido (olio) di una nano emulsione O/A con dei lipidi solidi<sup>100</sup>. Tali sistemi possono essere stabilizzati con una grande varietà di tensioattivi biocompatibili, da soli o in miscela (co-tensioattivi). I sistemi nanoparticellari sono convenzionalmente suddivisi in *SLN* (*Solid Lipid Nanoparticles*), *NLC* (*Nanostructured Lipid Carriers* e

*LDC (Lipid Drug Carriers)*. In ogni caso, sia i lipidi che i tensioattivi devono essere sostanze *GRAS (Generally Recognized As Safe)*, ossia sostanze completamente biocompatibili e non citotossiche approvate dalla FDA. Le SLN sono costituite da lipidi solidi cristallini, come ad esempio trigliceridi ad elevato grado di purezza, gliceridi complessi o cere. Tali componenti conferiscono alle SLN un'elevata stabilità fisica, un'ottima capacità di preservare i principi attivi incorporati da fenomeni di degradazione chimica in ambienti particolarmente sfavorevoli (sostanze proteiche in presenza di enzimi proteolitici, ecc...), la possibilità di avere delle cinetiche di rilascio controllate (veloci o lente in base al modello di incorporazione del principio attivo) e con un targeting specifico ed una buona biotollerabilità. Tuttavia la struttura cristallina della matrice lipidica rappresenta uno svantaggio importante sia perché non consentono una buona capacità di caricamento di farmaci sia a causa di fenomeni di espulsione del principio attivo caricato. Da studi diffrattometrici si è visto che il principio attivo va a collocarsi tra i diversi strati di catene lipidiche; tuttavia in fase di solidificazione, non è raro che ci si trovi di fronte alla formazione di imperfezioni strutturali e ciò si traduce in una bassa capacità di caricamento della sostanza attiva definita *LC (Loading Capacity)*<sup>101</sup>. Inoltre, durante i processi di stoccaggio, i lipidi cristallini vanno facilmente incontro a transizioni polimorfiche da conformazioni  $\alpha$  ad alto contenuto energetico a conformazioni  $\beta$  a più basso contenuto energetico. Queste transizioni conformazionali generano una “*contrazione*” della intera struttura che, soprattutto in fase di stoccaggio, tende ad espellere il principio attivo caricato (fig. 14).



**Figura 14:** Struttura cristallina ed espulsione del principio attivo tipici delle SLN

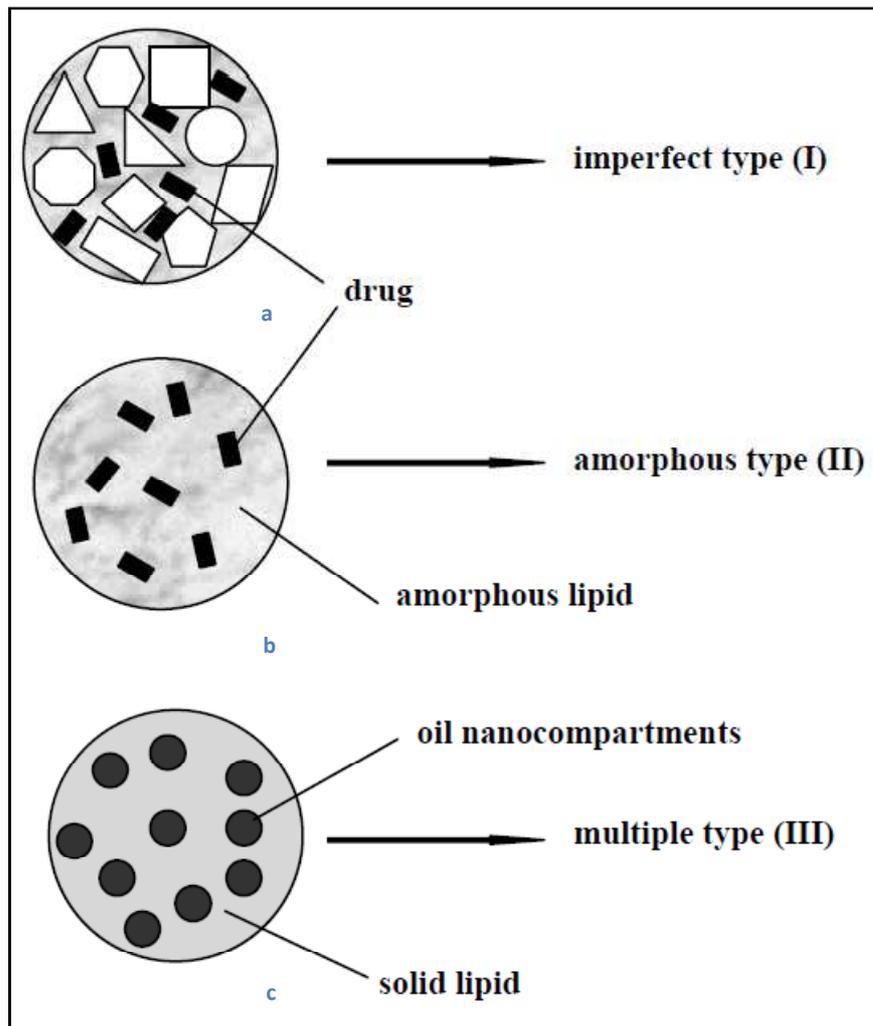
Per ovviare a tali problemi sono stati studiati e progettati dei sistemi nanoparticellari alternativi con lo scopo sia di migliorare la LC, che di evitare l'espulsione del principio attivo caricato. Tali sistemi sono definiti NLC e possono essere realizzati seguendo tre diversi approcci tecnologico-farmaceutici. Il primo modello è costituito dalla presenza di una matrice formata da lipidi di natura chimico-fisica diversa, come ad esempio lipidi con catene lipofile di lunghezza diversa o con numero e posizione di insaturazioni differenti oppure da di- o trigliceridi con diverso grado di esterificazione. L'impiego di lipidi strutturalmente differenti determina una loro diversa collocazione nello spazio e ciò si traduce in un aumento della distanza che intercorre tra le catene idrocarburiche dei gliceridi. Questo permette di ridurre le imperfezioni tipiche di una struttura cristallina e di aumentare lo spazio disponibile per accogliere le molecole da veicolare. Tali sistemi sono caratterizzati da valori sensibilmente più

elevati di LC e possono essere preparati anche miscelando ai tradizionali lipidi in forma solida piccole quantità di lipidi liquidi (oli) e sono comunemente definiti come NLC di tipo *imperfetto* (fig. 15a).

Se in fase di preparazione viene impiegata una quantità di lipidi liquidi che superi la soglia di miscibilità con i lipidi allo stato solido si assiste ad un fenomeno di separazione di fase in cui i lipidi liquidi si organizzano in nanostrutture secondarie nettamente separate da una fase continua allo stato solido<sup>102-104</sup>. Questi nanocompartimenti aumentano ulteriormente la capacità di caricamento dei sistemi in quanto numerosi principi attivi risultano più solubili in lipidi liquidi. Inoltre questa discontinuità strutturale della matrice lipidica impedisce i fenomeni di espulsione del principio attivo caricato descritti precedentemente e ciò si traduce in sistemi fondamentalmente più stabili. Tali sistemi sono definiti NLC di tipo *multiplo* (fig. 15b).

Il terzo modello è infine rappresentato dalle NLC di tipo *amorfo* (fig. 15c). Questi sistemi si distinguono per la presenza di una matrice lipidica progettata e realizzata in modo tale da prevenire la cristallizzazione dei lipidi. Questo è possibile impiegando delle sostanze lipidiche il cui punto di cristallizzazione sia ben al di sopra delle temperature di stoccaggio e, cosa molto più importante, delle temperature raggiunte in fase di preparazione. In questo modo la matrice avrà una conformazione strutturale di tipo amorfo e questo impedisce i fenomeni di contrazione e di espulsione del principio attivo caratteristici dei sistemi SLN. I lipidi più comunemente usati per la realizzazione di questi sistemi sono l'*idrossiottacosanilidrossistearato* o l'*isopropilmiristato*<sup>103, 104</sup>.

I sistemi LDC sono finora stati sfruttati per la veicolazione per rilascio topico anche se i loro vantaggi sulle più convenzionali hanno potenzialità molto elevate soprattutto per rilasci per via parenterale.



**Figura 15:** NLC di tipo *imperfetto* (a), *amorfo* (b) e *multiplo* (c)

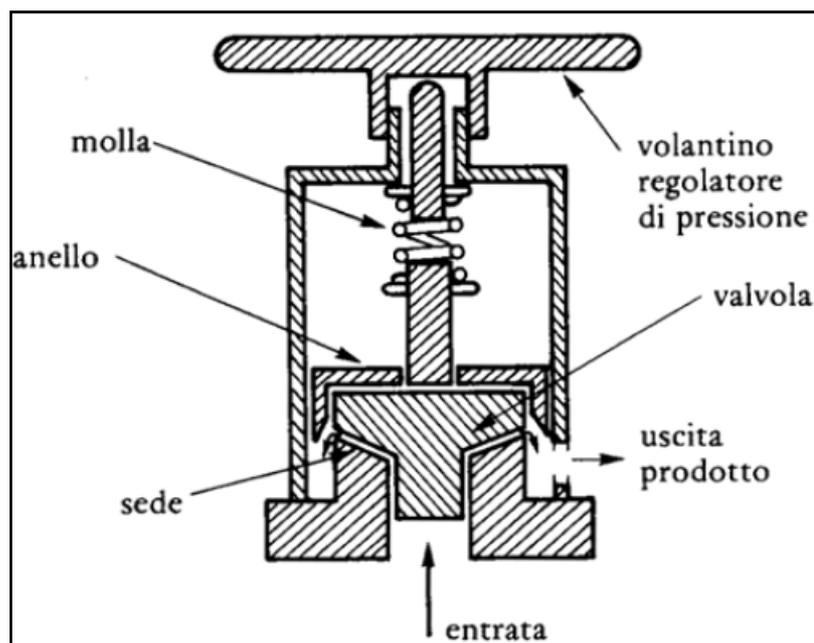
I sistemi *LDC* risultano molto utili quando si devono incorporare dei farmaci di origine idrofila. Tali sostanze, infatti, possono essere veicolate tramite SLN o NLC solo qualora essi siano attivi a

concentrazioni molto basse dal momento che i valori di drug loading di sostanze idrofile in tali sistemi è molto ridotto. Un esempio di farmaci idrofili molto attivi a basse concentrazioni sono il *fattore di rilascio dell'ormone luteinizzante* (LHLR), l'*eritropoietina* (EPO) o frazioni proteiche impiegati come antigeni ed attraverso l'impiego di LDC è possibile aumentare sensibilmente i valori di drug loading. La preparazione di questi sistemi prevede la formazione di legami chimici di tipo ionico (formazione di Sali) o di tipo covalente (esterificazione). Le procedure di preparazione più comuni prevedono o la formazione in bulk di un sale della sostanza idrofila con una porzione della catena idrofobica della matrice lipidica, oppure l'esterificazione della porzione carbossilica degli acidi grassi costituenti la matrice con gruppi funzionali delle molecole da veicolare. In questo modo è possibile ottenere valori di drug loading fino al 33%<sup>105, 106</sup>.

### ***1.7.1 TECNICHE DI PREPARAZIONE DELLE NANOSTRUTTURE LIPIDICHE***

Le possibili tecniche di preparazione dei sistemi nanoparticellari sono numerose e vengono scelte tenendo conto di differenti criteri. In primo luogo bisogna tenere conto della natura chimico-fisica del principio attivo che potrebbe degradarsi ad elevate temperature o non disperdersi adeguatamente a temperature troppo basse. Inoltre, la scelta di una tecnica di preparazione piuttosto che un'altra, può condurre alla formazione di sistemi con differenti profili di rilascio oppure caratterizzati da dimensioni diverse.

La tecnica dell'*omogeneizzazione ad alta pressione* si è rivelata una delle più affidabili e proficue tecniche di preparazione di sistemi SLN e si avvale dell'uso di un omogeneizzatore in grado di operare a pressioni elevate. L'impianto è costituito da un sistema di pompaggio ad alta pressione (100-2000 bar), capace di pressurizzare il fluido di processo e di forzarlo attraverso una valvola di rottura o di omogeneizzazione in serie. Qui il fluido è soggetto ad un'accelerazione istantanea fino a velocità molto elevate (più di 1000 km/h) su distanze molto ridotte. Tali stress fluido-meccanici estremamente intensi causano la rottura delle particelle sospese in frammenti sempre più piccoli fino a ridurle a dimensioni nanometriche (fig. 16).

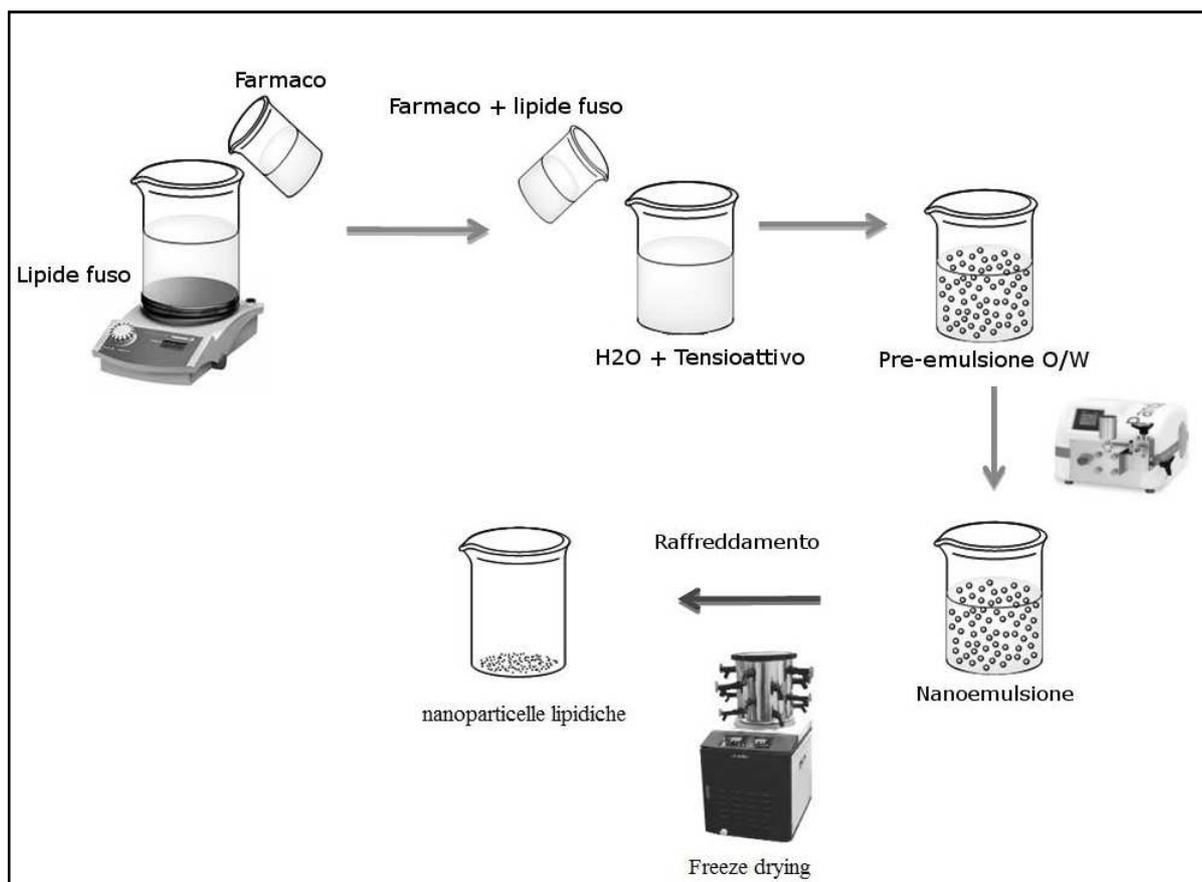


**Figura 16:** Rappresentazione schematica del funzionamento di un omogeneizzatore

Possono essere impiegati due diversi approcci alla tecnica dell'omogeneizzazione che sfruttano alte (*omogeneizzazione a caldo*) e basse temperature (*omogeneizzazione a freddo*), tuttavia, in entrambi i casi, lo step iniziale prevede l'incorporazione del principio attivo nel lipide attraverso dissoluzione o dispersione nel lipide fuso.

L'omogeneizzazione a caldo è condotta a temperatura al di sopra del punto di fusione del lipide (o della miscela di lipidi). Inizialmente viene preparata una pre-emulsione costituita dalla fase lipidica caricata con il farmaco e da una soluzione acquosa di tensioattivi alla stessa temperatura attraverso l'uso di un ultraturrax. Questa fase è molto importante in quanto la qualità della pre-emulsione di partenza influenza in larga misura il risultato finale, per questo è auspicabile che le dimensioni delle gocce siano di dimensioni micrometriche. L'omogeneizzazione ad alta pressione della pre-emulsione, come già

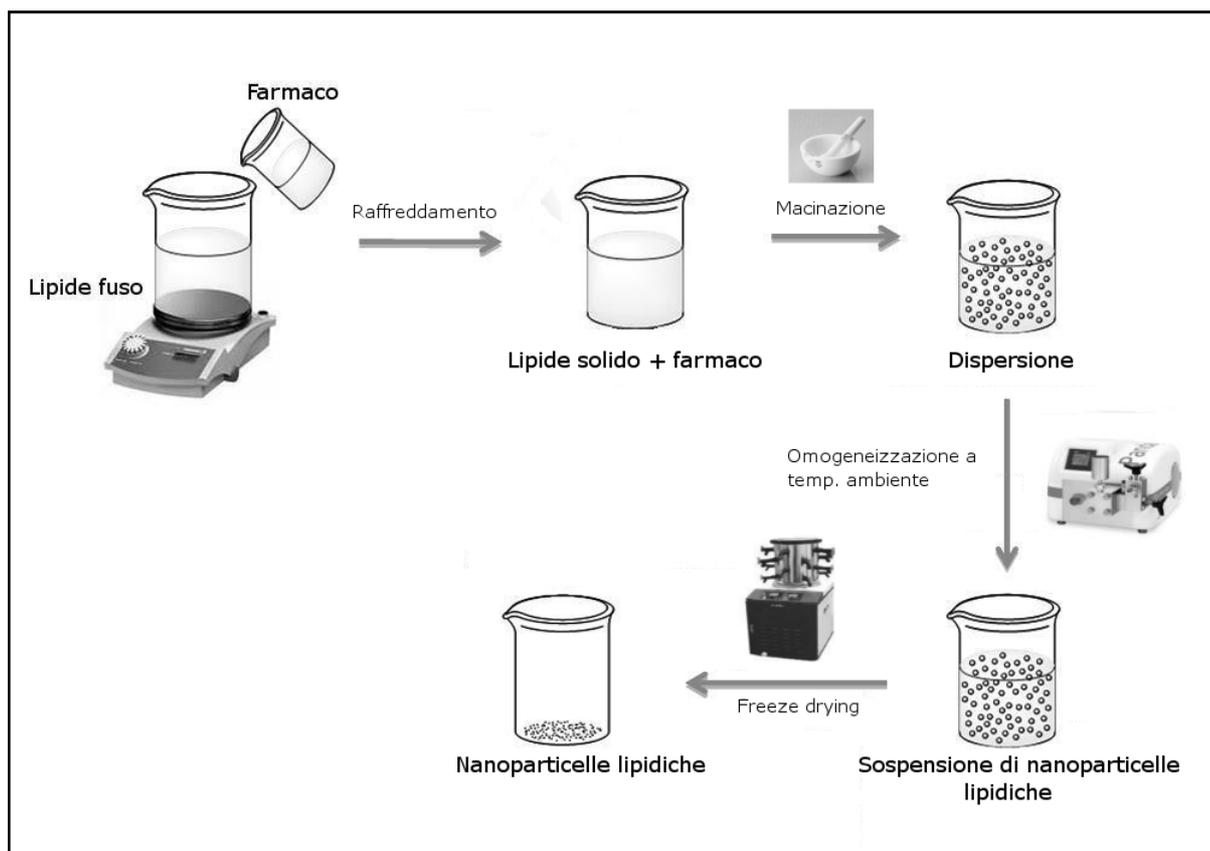
accennato, viene condotta a temperature superiori al punto di fusione del lipide in modo tale da favorire l'incorporazione del farmaco in maniera pressoché uniforme. Inoltre le alte temperature garantiscono una riduzione delle dimensioni del sistema dovute ad una riduzione della viscosità della fase interna<sup>107</sup>. In ogni caso si deve sempre tenere in conto un ulteriore aumento delle temperature dovuto agli stress fluido-meccanici in sé (approssimativamente 10 °C per 500 bar)<sup>108</sup>. Nella maggior parte dei casi sono sufficienti 3-5 cicli di omogeneizzazione a valori di pressione compresi tra 500 e 1500 bar, mentre un ulteriore aumento di temperatura o pressione si traduce in un aumento delle dimensioni delle particelle dovuto a fenomeni di coalescenza che sono conseguenza dell'elevata energia cinetica del sistema<sup>109</sup>. Il prodotto primario che si ottiene dopo i cicli di omogeneizzazione a caldo è una nano emulsione che, una volta raffreddata a temperatura ambiente, forma le nanoparticelle solide. Queste restano in genera stabili per diversi mesi in quanto la cristallizzazione del lipidi è sensibilmente rallentata<sup>110</sup> (fig.17).



**Figura 17:** Omogeneizzazione a caldo ad alta pressione

L'omogeneizzazione a freddo, a differenza di quella a caldo appena descritta, è condotta sul lipide solido ed i cicli di omogeneizzazione sono effettuati mantenendosi a temperature inferiori a quella di fusione del lipide. In queste circostanze un preciso controllo della temperatura si rivela di fondamentale importanza per assicurare il mantenimento dello stato solido del lipide che, durante i cicli di omogeneizzazione, potrebbe andare incontro a fenomeni di fusione dovuti ad un incremento di temperatura. L'omogeneizzazione a freddo è stata sviluppata per superare i problemi legati alle alte temperature quali la degradazione termo-indotta del principio attivo incorporato o

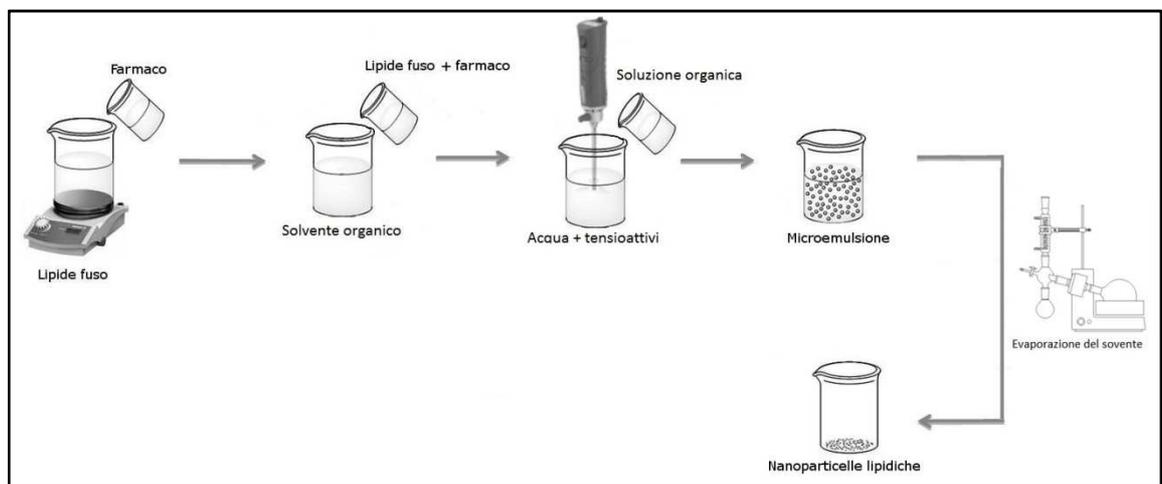
la distribuzione del farmaco nella fase acquosa. Il primo step del processo è lo stesso di quello descritto per l'omogeneizzazione a caldo e consiste nell'incorporazione del principio attivo in bulk nel lipide fuso. Successivamente questa soluzione viene rapidamente raffreddata impiegando ghiaccio secco o azoto liquido e questo shock termico favorisce la distribuzione omogenea del principio attivo. Questo residuo solido viene ridotto in particelle di dimensioni comprese tra i 50 ed i 100  $\mu\text{m}$  attraverso l'impiego di frese. Queste dimensioni sono facilmente ottenibili grazie alle bassissime temperature cui è sottoposto il campione. Le microparticelle solide ottenute sono sospese in una soluzione di tensioattivi refrigerata e, la sospensione ottenuta, viene sottoposta a cicli di omogeneizzazione a temperatura ambiente (o anche più basse). In generale le nanoparticelle solide ottenute hanno valori di dimensioni (*size*) e di indice di polidispersità (*PDI*) più elevati rispetto alla corrispondente tecnica a caldo<sup>111</sup> (fig. 18).



**Figura 18:** Omogeneizzazione a freddo ad alta pressione

La tecnica della *evaporazione del solvente* si avvale dell'impiego di un solvente organico per la formazione di sistemi nanoparticellari. Questo modo di procedere prevede la dissoluzione del materiale lipidico e del farmaco precedentemente incorporato in esso in un solvente organico immiscibile in acqua. Successivamente tale soluzione viene emulsionata tramite l'impiego di un ultraturrax in una fase acquosa contenente i tensioattivi. Tale microemulsione viene poi trattata in condizioni di pressione ridotte al fine di evaporare il solvente organico e fare precipitare le nanoparticelle lipidiche. La dimensione dei sistemi dipende dalla concentrazione del lipide nella

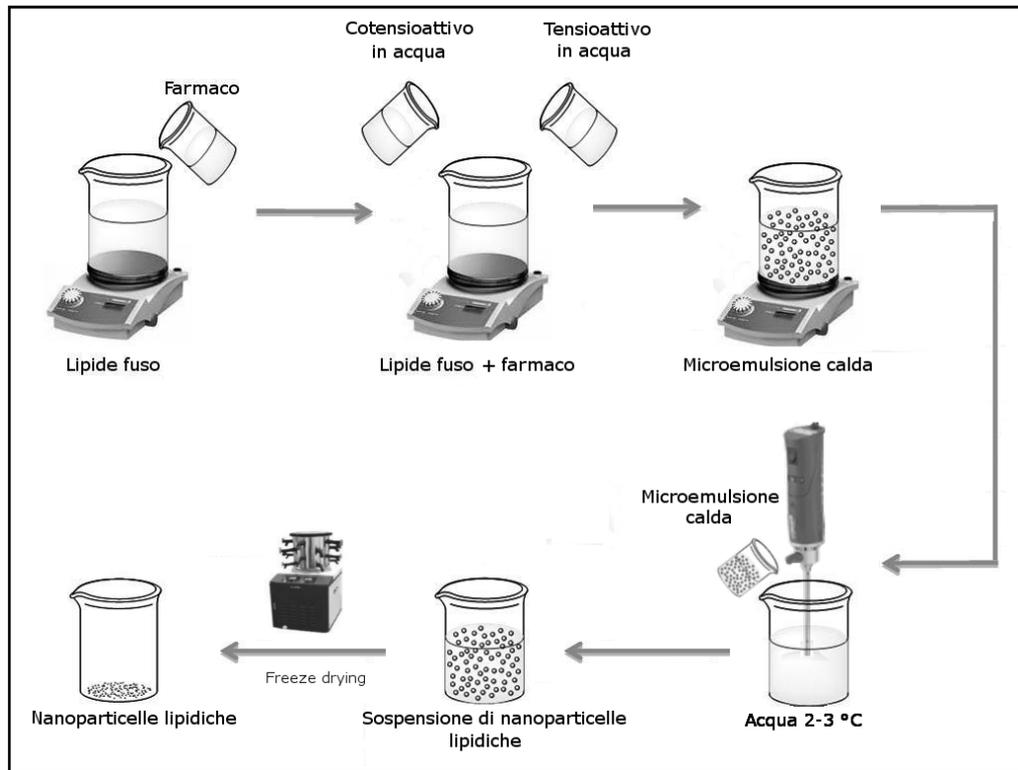
fase organica: particelle molto piccole possono essere ottenute da soluzioni a concentrazione di circa il 5% p/p<sup>112</sup> (fino a 25 nm ). Aumentando la concentrazione del lipide nel solvente organico le dimensioni aumentano a causa di un aumento della viscosità del sistema che peggiora la qualità della microemulsione intermedia (fig. 19).



**Figura 19:** Evaporazione del solvente

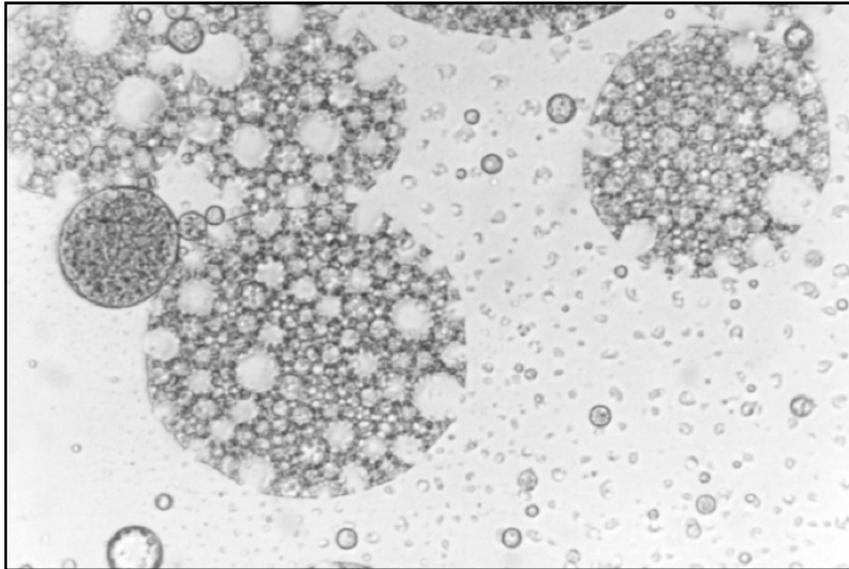
La tecnica *microemulsione* sfrutta la stabilità termodinamica delle microemulsioni. Si parte da una microemulsione calda preparata sotto costante agitazione magnetica e costituita dal lipide fuso (circa il 10%) e da soluzioni acquose di tensioattivo (circa il 15%) e di co-tensioattivo (circa il 10%). La microemulsione calda viene quindi dispersa, sempre sotto costante agitazione, in un eccesso di acqua a 2-3 °C e ridotta in nanoemulsione tramite l'impiego di un ultraturrax. L'eccesso di acqua vien poi eliminato tramite ultrafiltrazione o

attraverso liofilizzazione. In questo modo si possono isolare le nanoparticelle lipidiche (fig. 20).



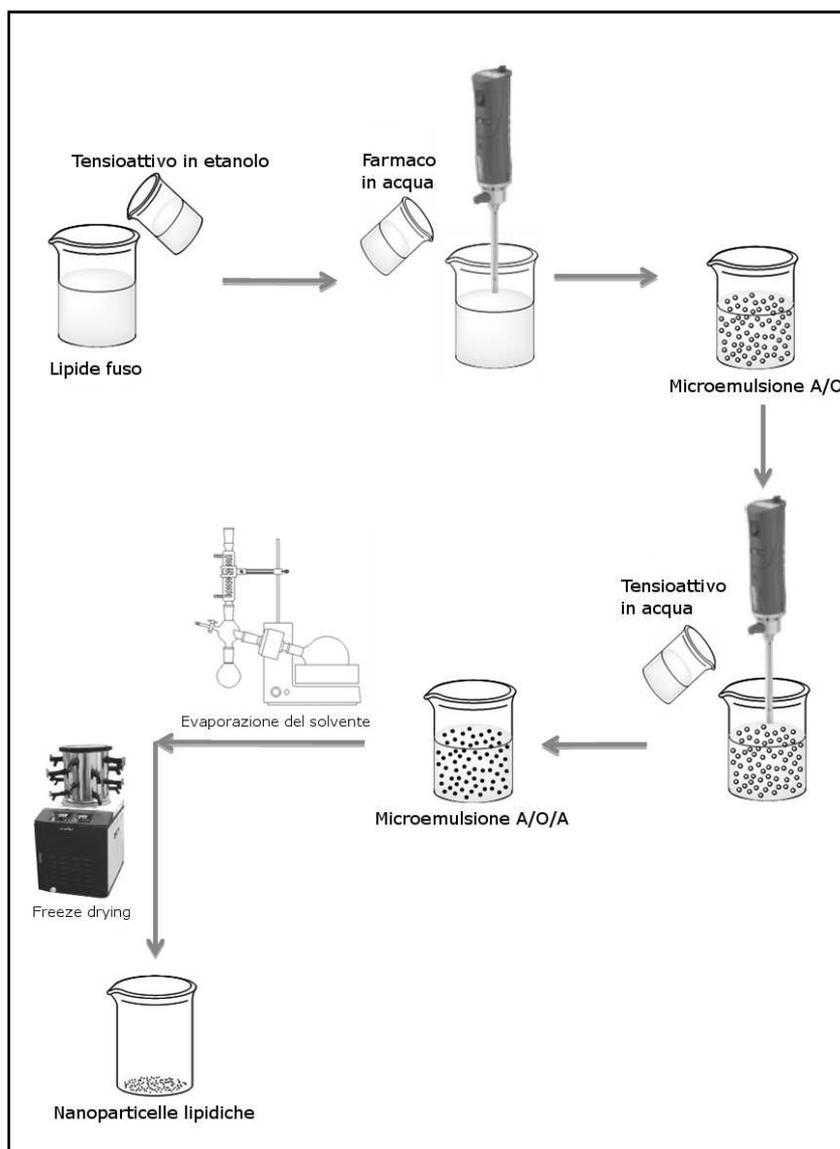
**Figura 20:** Microemulsione

A partire proprio dalla tecnica della microemulsione appena descritta, è stata introdotta una tecnica più innovativa, quella della *doppia emulsione A/O/A*. In questo modo è possibile incorporare e veicolare anche principi attivi di origine idrofila in quanto il nanosistema ottenuto è caratterizzato dalla presenza di compartimenti acquosi all'interno di compartimenti oleosi (fig. 21).



**Figura 21:** Struttura multi-compartimentale di una microemulsione multipla del tipo A/O/A

In questo caso il principio attivo viene incorporato nella fase acquosa interna della doppia emulsione e, attraverso l'impiego di tensioattivi, se ne impedisce la diffusione nella fase acquosa esterna durante la fase di evaporazione del solvente (fig. 22).



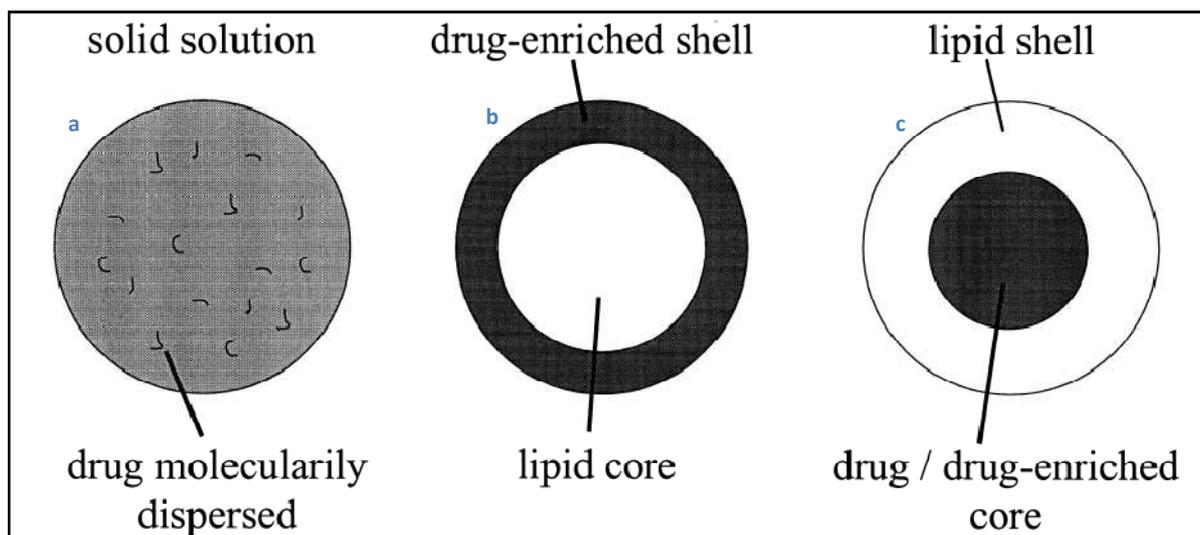
**Figura 22:** Microemulsione multipla A/O/A

Da diversi studi si evince che, a supporto di tutte le tecniche di preparazione, può essere impiegata la ultrasonificazione dei campioni per migliorarne la dissoluzione e generare delle microemulsioni più fini e, quindi, più stabili. Siekmann<sup>109</sup> ha preso in esame dei sistemi nanostrutturati con matrice lipidica costituita da tripalmitina e stabilizzati da lecitina di soia ed ha determinato che, le dimensioni dei

sistemi preparati con la tecnica dell'omogeneizzazione a caldo e ultrasonificati, erano di tre volte più piccoli (155 nm dei sistemi ultrasonificati contro 474 nm dei sistemi non ultrasonificati). In ogni caso la scelta di una tecnica a discapito di un'altra è sempre dettata dalle aspettative del tecnologo farmaceutico che, in fase di progettazione, determina quali sono le caratteristiche che il sistema deve possedere e le materie prime da impiegare.

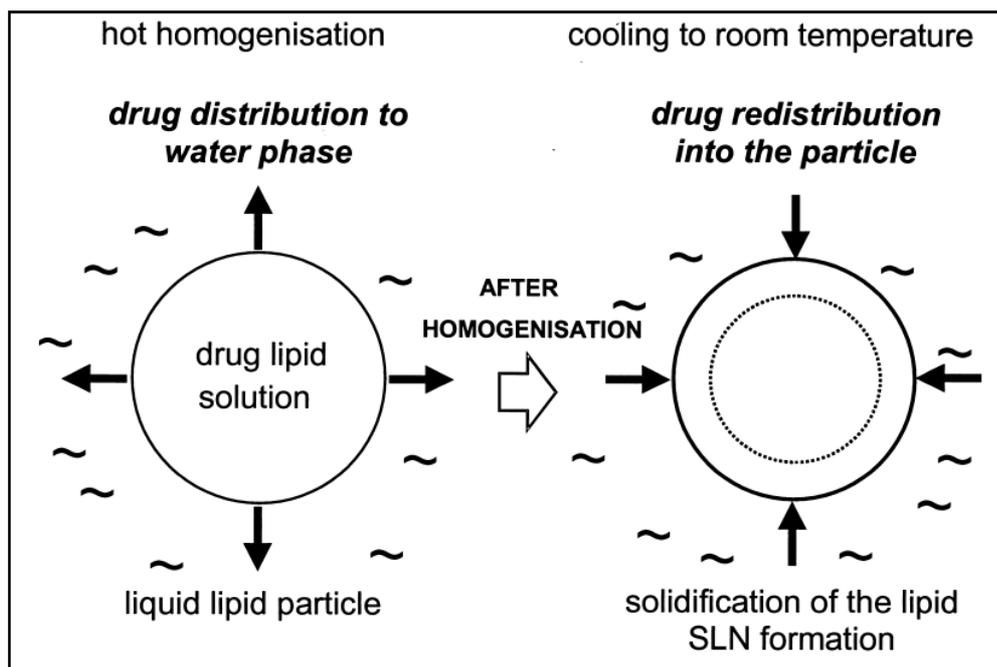
In uno studio condotto da Westesen<sup>112</sup> vengono paragonati due sistemi a base di Tripalmitina e stabilizzati con Lecitina di soia e Glicolato preparati con tecniche di Omogeneizzazione a caldo ed Evaporazione del solvente. I risultati dimostrano che quest'ultima tecnica è in grado di restituire dei sistemi sensibilmente più piccoli (24 nm contro 124 nm) perché l'omogeneizzazione risulta essere meno efficiente sulle materie prime rispetto al trattamento con solventi organici. Altri studi<sup>113</sup> dimostrano come, impiegando la tecnica della omogeneizzazione (sia a caldo che a freddo), le dimensioni delle nanoparticelle ottenute vada gradualmente diminuendo fino ad un optimum raggiunto con l'aggiunta di tensioattivi al 2-3 % p/p per poi riprendere ad aumentare.

In fase di formulazione è possibile anche prevedere la tipologia di cinetica di rilascio del principio attivo. In linea di massima le molecole biologicamente attive che si veicolano possono incorporarsi seguendo tre diversi modelli di distribuzione. Nel modello definito *solid solution* (fig. 23a) il farmaco si disperde uniformemente in tutta la matrice. In questo caso c'è da aspettarsi una cinetica di rilascio molto regolare che inizia immediatamente dopo i fenomeni di bioerosione della matrice e continua fino a quando tutta la matrice viene erosa.



**Figura 23:** Modelli di incorporazione dei farmaci in sistemi nanoparticellari

Il modello *drug-enriched shell* (fig. 23b) è caratterizzato da una concentrazione di farmaco nelle zone più esterna della matrice nanoparticellare ed avrà una cinetica di rilascio molto rapida con il classico effetto di rilascio immediato noto come *burst effect*. Questo modello è tipico della tecnica della omogeneizzazione a caldo. Alle elevate temperature di esercizio, infatti, aumenta gradualmente la solubilità nella fase acquosa del principio attivo, che diffonde in questo modo verso l'esterno. Quando le temperature scendono i valori di solubilità del principio attivo in acqua si abbattano velocemente e questo tende a ripartizionarsi sulla porzione lipidica (fig. 24).



**Figura 24:** Formazione del modello “drug-enriched shell” in seguito a omogeneizzazione a caldo

Il modello *drug-enriched core* è caratterizzato infine da un core ricco in principio attivo circondato da uno shell di matrice lipidica che lo protegge. Questo avviene quando la precipitazione del principio attivo è più veloce della cristallizzazione dei lipidi. Le cinetiche di rilascio, come è facilmente intuibile, saranno lente ed i sistemi si prestano agevolmente alla formulazione di forme di dosaggio a rilascio ritardato (fig. 23c).

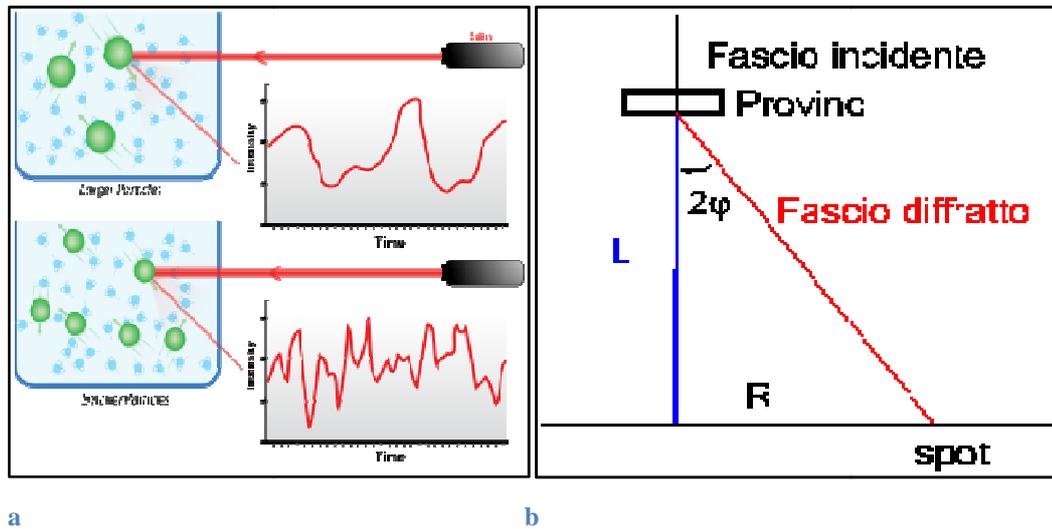
### **1.7.2 CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA**

Affinché sia possibile determinare le qualità del prodotto finale e capire se è idoneo agli scopi per il quale era stato progettato, tutti i nanosistemi sono soggetti a processi di caratterizzazione sensibili ai loro parametri chiave. Tuttavia tali processi di caratterizzazione si rivelano piuttosto complessi a causa delle dimensioni colloidali dei sistemi e della loro complessità intrinseca, compresi fenomeni dinamici. Grassi e lipidi, infatti sono dei materiali molto complessi caratterizzati non solo da semplice struttura statiche, ma bensì da sistemi sottoposti a continui fenomeni di riarrangiamento che spesso si organizzano in strutture supramolecolari. Tutto ciò è amplificato quando i lipidi sono in uno stato colloidale e proprio in questi casi una caratterizzazione meticolosa può rivelarsi molto complessa.

I parametri più importanti di cui bisogna tenere conto sono le dimensioni dei sistemi (*particle size*), il grado di cristallinità e la conformazione polimorfica.

La *photon correlation spectroscopy* (PCS) e la *laser diffraction* (LD) sono le più importanti tecniche che vengono impiegate di routine per la determinazione del *particle size*. La PCS, anche conosciuta come *dynamic light scattering* (DLS), misura la variazione dell'intensità della luce scatterata che è causata dal movimento di particelle in sospensione. Particelle di dimensioni più piccole generano una risposta strumentale nettamente diversa da particelle più grandi (fig. 25a) per cui, tramite una funzione di correlazione, è possibile risalire alle dimensioni dei sistemi dispersi e al valore del *polydispersity index* (PDI) che da un'idea di quanto il campione è omogeneo. Tale metodica è utile per definire campioni di dimensioni comprese tra

pochi nm e circa 3  $\mu\text{m}$  ma non è adatta a determinare dimensioni più grandi.



**Figura 25:** Schematizzazione di luce scatterata (a) e di luce diffratta (b) da un campione in soluzione

La tecnica LD è basata sul concetto teorico che mette in correlazione l'angolo di diffrazione della luce con il raggio delle particelle in soluzione. Particelle più piccole causano un diffrazione della luce con un'angolazione molto più elevata rispetto alla diffrazione determinata da particelle di dimensioni più elevate (fig. 25b). Attualmente la LD è stata nettamente migliorata grazie ad un approccio prettamente fisico che prevede l'impiego di luce polarizzata (Polarization Intensity Differential Scattering). L'impiego di questa tecnica, combinata con la giusta scelta della lunghezza d'onda d'esercizio, consente di riconoscere anche particelle che abbiano un diametro dell'ordine dei nanometri. Le misure di LD e PCS vengono spesso affiancate da analisi condotte attraverso l'impiego della microscopia che fornisce

immagini reali e tridimensionali. I tipi di microscopia sfruttati in questo campo sono la *Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)*, la *Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)* e la *Microscopia a Forza Atomica (AFM)*.

Oltre alle analisi dimensionali e morfologiche i sistemi nanoparticellari sono sottoposti a caratterizzazioni in termini di carica superficiale e ciò viene fatto attraverso misurazioni del potenziale Zeta ( $\zeta$ ). Esse servono a valutare la stabilità fisica dei sistemi in quanto, un elevato valore (in valore assoluto) di carica superficiale, evita l'avvicinamento di due particelle con cariche uguali e, quindi, impedisce l'instaurarsi di fenomeni di aggregazione. In altre parole particelle con elevata carica superficiale si respingono, rimanendo in sospensione mentre, qualora le cariche superficiali dovessero diminuire (per effetto ad esempio dell'adsorbimento di controioni), le forze repulsive diminuiranno di conseguenza e non saranno più sufficienti a contrastare le interazioni fisiche (forze di Van der Waals, ecc...), generando una destabilizzazione irreversibile.

La misura del potenziale Zeta fornisce dunque informazioni sulle caratteristiche fisiche e chimiche delle particelle in sospensione. Un valore elevato di Potenziale Zeta (maggiore di 30mV in valore assoluto) è di solito associato ad una elevata stabilità della dispersione. Un valore basso (tra -30 e +30 mV), invece, può indicare la formazione di aggregati, causando una instabilità colloidale. Si tratta, quindi, di una misura che consente al formulatore di selezionare e valutare le componenti più idonee da aggiungere alla sospensione. Come già accennato, la stabilità fisica delle dispersioni è fortemente influenzata dalla carica superficiale vista la tendenza a respingersi delle particelle di carica opposta. Se si applica un campo elettrico al

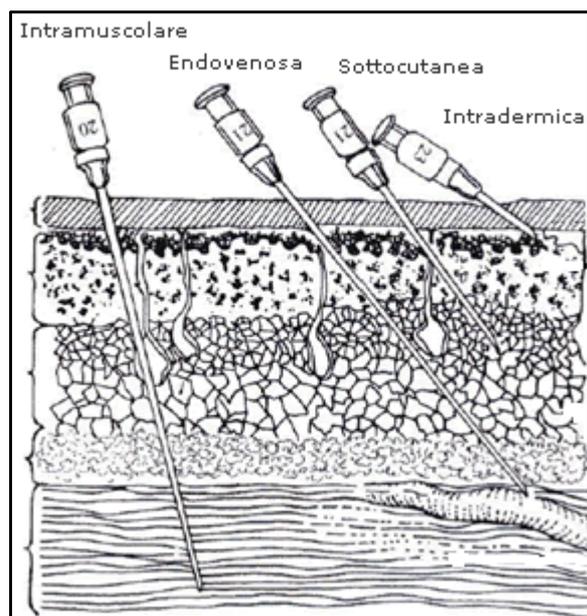
mezzo liquido le particelle colloidali si muoveranno verso il polo di carica opposta e la direzione dello spostamento indica chiaramente il segno della carica sulla superficie. La velocità con cui si muovono le particelle, invece, è proporzionale alla grandezza della carica e, misurando sia la velocità sia la direzione dello spostamento in un campo elettrico noto, è possibile calcolare la *Mobilità Elettroforetica* che viene convertito tramite una funzione di correlazione nel valore che definisce il Potenziale Zeta del sistema colloidale.

### ***1.7.3 VIE DI SOMMINISTRAZIONE***

I sistemi nanoparticellari si rivelano essere estremamente versatili dal punto di vista delle possibili vie di somministrazione in quanto sono potenzialmente somministrabili attraverso tutte le vie disponibili. Ovviamente la scelta di una via rispetto ad un'altra è dettata da numerose esigenze, ma soprattutto dai distretti che si vogliono raggiungere e dal tipo di effetto che si vuole ottenere (locale, sistemico, zonale, ecc...).

#### ***VIA PARENTERALE***

L'espressione *via parenterale* si riferisce alla somministrazione di farmaci o forme di dosaggio con l'ausilio di iniezioni o attraverso i tegumenti (cute, mucose, epiteli, ecc...) o direttamente in circolo. In ogni caso la via parenterale consente di avere un' immediata biodisponibilità del principio attivo che raggiunge quasi immediatamente la massima concentrazione ematica e, per quanto riguarda la via endovenosa, rappresenta la via di somministrazione di elezione nel caso di emergenze che richiedano un intervento immediato. Le vie parenterali più comuni sono la *via intradermica* (I.D.), la *via sottocutanea* (S.C.), la *via intramuscolare* (I.M.) e la *via endovenosa* (E.V.) (fig. 26). Esistono tuttavia delle vie parenterali specializzate e sfruttate in condizioni particolari come ad esempio la *via intraarteriosa*, la *via intratecale*, la *via intracardiaca* o la *via intrasinoviale*.

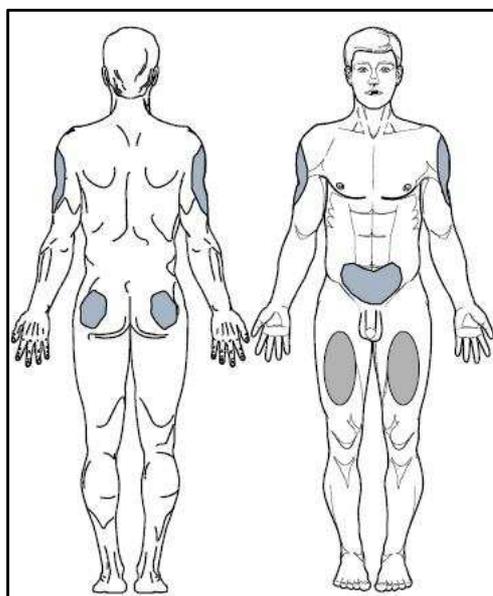


**Figura 26:** Principali vie parenterali

La via intradermica consiste nell'iniettare un farmaco o un diagnostico subito sotto l'epidermide, facendo penetrare l'ago con una angolazione di 10-15° ed è utilizzata soprattutto per scopi diagnostici (es. tuberculina) o per la somministrazione di anestetici locali. La via sottocutanea è molto utilizzata per la somministrazione di vaccini e di insulina ed i volumi in genere somministrati sono di 0,5–1 ml.

I vantaggi correlati alla somministrazione sottocutanea sono diversi: innanzitutto l'assorbimento delle soluzioni acquose è costante e garantisce un effetto duraturo del farmaco, è possibile rallentare (o impedire del tutto) l'assorbimento aggiungendo un vasocostrittore (es. somministrazione di anestetici locali), e' inoltre una via adatta all'impianto di compresse o pellets e ed adatta per somministrazioni ripetute (es. somministrazione di insulina). A tali vantaggi però sono correlati anche degli aspetti negativi dati dall'impiego di farmaci

irritanti che possono provocare dolore e necrosi nel punto di inoculo (es. insulina). Inoltre non è possibile la somministrazione di grandi volumi e non è del tutto prevedibile la velocità di assorbimento del farmaco. In ogni caso i punti di inoculo sfruttati per la via sottocutanea e la via intradermica sono simili e comprendono la zona lombare, la zona superiore delle cosce e la porzione esterna del braccio (fig.27).



**Figura 27:** Punti di inoculo per le vie intradermica e sottocutanea

La via intramuscolare permette la somministrazione di volumi più grandi (da 2 a 5 ml) ma presenta una variabilità della quota di farmaco assorbito che dipende dalla quantità di tessuto adiposo dell'individuo. I punti di inoculo sono simili a quelli descritti per le vie intradermica e sottocutanea, tuttavia una somministrazione a livello del sito deltoideo

presenta una cinetica di assorbimento più rapida rispetto alla somministrazione attraverso i muscoli dei glutei. Attraverso la via intramuscolare è possibile somministrare sostanze che si rivelano irritanti per via sottocutanea e la velocità di assorbimento risulta nel complesso più elevata. Tuttavia l'impiego regolare della via I.M. può condurre ad un danno muscolare che aumenta i livelli di Creatinin Chinasi (CK) e può indurre ad un falsamento di indagini cliniche specifiche come ad esempio la determinazione di marker di danno cardiaco.

La somministrazione endovenosa consiste nell'iniettare un farmaco direttamente in circolo, e viene utilizzata quando è necessaria un'azione immediata o nel caso di farmaci estremamente irritanti. In alcuni casi, come ad esempio nell'induzione dell'anestesia totale, la dose somministrata non è prestabilita ma viene via via aggiustata in base alla risposta del paziente.

Si possono somministrare fino a 20 ml in bolo, oppure quantità di oltre 50 ml per infusione lenta e continua. La via endovenosa non richiede la fase di assorbimento, ed il farmaco somministrato è prontamente e totalmente biodisponibile. Inoltre alcuni farmaci estremamente irritanti (come ad esempio alcuni antitumorali) possono essere somministrati solo per via E.V., perché le pareti vasali sono poco sensibili ed il farmaco può essere iniettato molto lentamente ed essere così notevolmente diluito. In ogni caso una preparazione che deve essere impiegata per via parenterale deve sottostare a rigidi requisiti di isotonia, sterilità e apirogenicità.

Le tecniche di sterilizzazione più comunemente usate sono la filtrazione, l'irradiazione con raggi  $\gamma$  o il calore. In ogni caso la "*condicio sine qua non*" di tali procedure è quella di lasciare inalterate

le proprietà chimico-fisiche e le cinetiche di rilascio delle formulazioni.

Grazie alle loro dimensioni nanometriche i sistemi basati su tecnologie nanoparticellari lipidiche possono essere somministrate per via endovenosa, intramuscolare o sottocutanea con rischi praticamente nulli: da numerosi studi condotti in vivo su cavie da laboratorio non sono stati osservati fenomeni di aggregazione o coagulazione ematica, fenomeni che porterebbero a danni irreparabili scaturiti da formazioni emboliche<sup>114-116</sup>. I capillari più periferici, infatti, sono caratterizzati da una fisiologia molto particolare: il loro diametro è di circa 5  $\mu\text{m}$  e ciò consente agli eritrociti (che hanno una dimensione di circa 6-8  $\mu\text{m}$ ) di passare uno per volta. Nel corso di questo passaggio forzato l'eritrocita si deforma, entra in contatto con le pareti capillari e può effettuare lo scambio di nutrienti e di gas con i tessuti circostanti. I sistemi nanoparticellari hanno dimensioni molto più ridotte dei capillari, tali da non interferire con questo delicato meccanismo vitale. Una volta raggiunto il torrente ematico le nanoparticelle vanno incontro a destini metabolici e farmacocinetici molto vari che ne determinano sia il distretto tissutale in cui andranno ad accumularsi, che l'emivita media ed il tempo di eliminazione. Normalmente i sistemi prevalentemente lipofili sono responsabili di fenomeni di adsorbimento nei confronti delle proteine ematiche (albumine, ecc...), meccanismo che sembra stare alla base di fenomeni di uptake nei distretti cerebrali e del sistema nervoso centrale in generale<sup>117, 118</sup>. Tuttavia tali sistemi vanno anche incontro a fenomeni di opsonizzazione da parte di proteine del complemento e ciò comporta un rapido attacco da parte del Sistema dei Fagociti Mononucleari (MPS)<sup>119</sup>. Tale sistema è costituito da monociti e macrofagi circolanti

ubiquitari ma molto più presenti in particolari distretti come milza, fegato (cellule di Kupffer), polmoni (macrofagi alveolari) e sistema nervoso centrale (microglia) ed è responsabile della eliminazione di particelle non-self presenti nel torrente ematico. Da numerosi studi<sup>117, 118</sup> emerge come l'esposizione di catene di PEG sulla superficie più esterna dei sistemi aumenti l'idrofilia dello shell esterno e limiti enormemente l'attacco da parte delle proteine del complemento e la conseguente eliminazione: tali sistemi sono definiti stealth in quanto risultano praticamente invisibili dall' MPS.

Questi sistemi possono essere ottenuti impiegando copolimeri a blocchi come il poli(ossietilene/polioossipropilene) in fase di preparazione. In questo modo il core lipidico della nanoparticella sarà rivestito da uno shell idrofilico esterno. Sistemi di questo tipo sono in grado di resistere ai fenomeni di opsonizzazione appena descritti e presentano un maggiore tempo di permanenza nel torrente ematico. In alcuni studi condotti dal gruppo di Gasco<sup>120, 121</sup> sono stati messi a confronto dei sistemi nanoparticellari stealth caricati con l'antitumorale Paclitaxel con gli equivalenti sistemi non stealth. I risultati dimostrano che l'adsorbimento di proteine ematiche dei sistemi stealth è selettivo verso particolari tipi di proteine che limitano drasticamente la captazione da parte di macrofagi splenici ed epatici e, di conseguenza, dimostrano un profilo farmacocinetico nettamente migliorato grazie a tempi di permanenza più lunghi. Inoltre, come aveva già ipotizzato Kreuter<sup>118-122</sup>, i sistemi stealth adsorbono particolari proteine che conferiscono loro una certa selettività verso il sistema nervoso centrale e che favoriscono la loro adesione alle cellule endoteliali della barriera emato-encefalica, rendendo possibile una veicolazione site-targeted in questi distretti.

Questi risultati sono in accordo con dati di distribuzione di SLN stealth caricate con Camptotecina<sup>123</sup> che dimostrano come tali sistemi abbiano promosso l'uptake soprattutto a livello cerebrale.

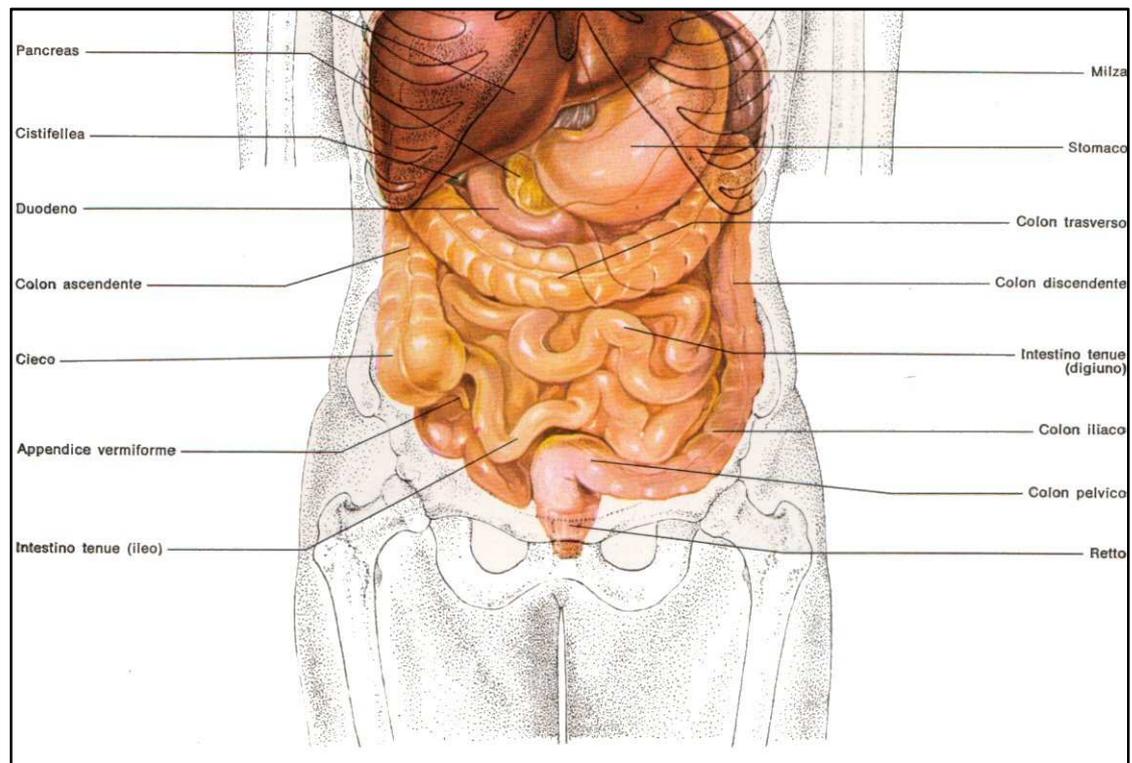
## ***VIA ORALE***

La somministrazione orale dei farmaci rappresenta senz'altro la via più semplice e la più accettata dai pazienti soprattutto per quanto riguarda il trattamento di patologie croniche, tuttavia essa rappresenta una sfida continua per chi studia nuove forme farmaceutiche atte a garantire il raggiungimento di un buon profilo farmacocinetico in seguito ad assorbimento di farmaci nel tratto GI<sup>124</sup>. Tale via presenta una serie di ostacoli come le barriere morfologiche date dai microvilli e dallo strato di muco presenti sia nello stomaco che in diverse porzioni dell'intestino<sup>125</sup>, le differenze di pH, le differenze di pressione del lumen e da altri fattori di varia origine<sup>126</sup>. Per esempio lo stato di salute del lumen, la somministrazione contemporanea di più farmaci, la posizione del corpo, il tipo di cibo possono essere fattori che influenzano l'assorbimento dei farmaci.

L'assorbimento dei farmaci somministrati attraverso la via orale può avvenire nello stomaco oppure nell'intestino. Quest'ultimo può essere distinto in due parti principali, intestino tenue e intestino crasso. L'intestino tenue fa seguito allo stomaco in corrispondenza del piloro e giunge fino alla valvola ileo-ciecale, dove continua con l'intestino crasso. E' il più lungo tratto del canale alimentare ed è costituito da due parti di differente lunghezza: una prima parte chiamata duodeno che misura circa 25-30 cm ed una seconda parte, detta intestino mesenterico, lunga poco meno di 7 m. L'intestino crasso fa seguito al tenue in corrispondenza della valvola ileo-ciecale e termina in corrispondenza dell'ano. E' lungo circa 1,70 m ed ha un calibro maggiore dell'intestino tenue, raggiungendo un diametro di circa 7-8 cm (contro i 4 cm del tenue). Esso risulta suddiviso in 3 parti:

intestino cieco, colon e retto. A sua volta il colon è suddiviso in cinque porzioni principali: colon destro (o ascendente), colon trasverso, colon sinistro (o discendente), colon iliaco e colon pelvico (o sigma)<sup>127</sup> (fig.28). La mucosa dell'intestino crasso si differenzia da quella del tenue in quanto non sono presenti i villi intestinali ma, al contrario, vi sono diverse ghiandole secernenti grandi quantità di muco con la funzione principale di unire e lubrificare le varie sostanze di scarto per garantirne il passaggio nel retto e la successiva espulsione.

Nell'intestino crasso vengono assorbiti principalmente sali e acqua e lo scarto solido forma le feci.

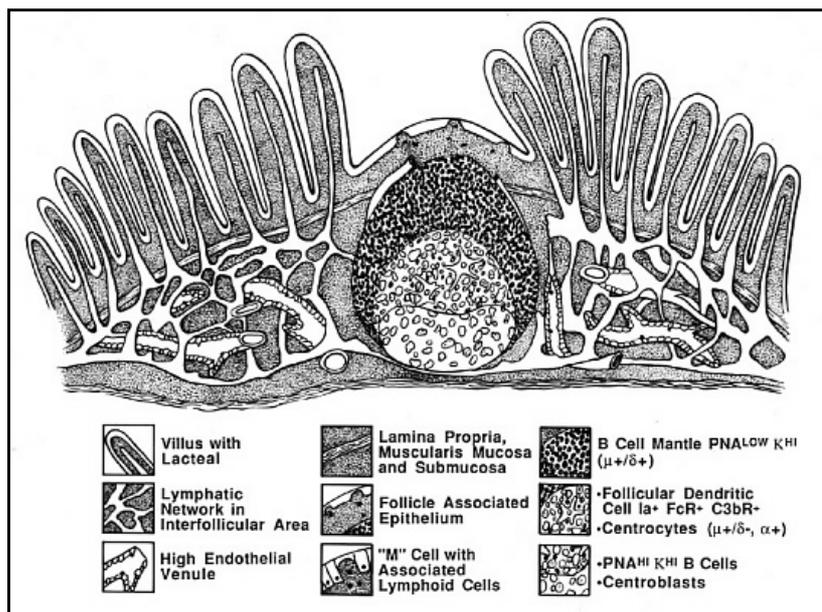


**Figura 28:** Anatomia dell'apparato digerente umano

La complessità dell'intestino non è legata esclusivamente alle caratteristiche morfologiche ma anche a diversi fattori quali il pH, il tempo di transito del cibo, la pressione intestinale, gli enzimi e la presenza di batteri che hanno un ruolo fondamentale nell'omeostasi intestinale e nell'assorbimento dell'acqua. Diversi studi hanno dimostrato che all'interno dell'intestino sono presenti un notevole numero di batteri sia aerobi che anaerobi. I generi predominanti negli umani sono *bacteroidi*, *bifidobatteri*, *eubatteri*, *clostridi*, *peptococchi*, *peptostreptococchi* e *ruminococchi*, mentre *escherichia*, *klebsiella*, *lactobacilli* e *proteus* fanno parte di specie non dominanti. La microflora batterica svolge diverse funzioni. In primis ha un ruolo metabolico in quanto favorisce la fermentazione di residui di nutrienti non digeribili lungo il tratto superiore dell'intestino e contribuisce alla produzione della vitamina K ed all'assorbimento di ioni. Inoltre ha una funzione trofica e protettiva poiché controlla e garantisce l'omeostasi del sistema immunitario e limita la proliferazione di specie batteriche patogene (effetto barriera)<sup>128</sup>.

Un'altra caratteristica delle mucose intestinali è la presenza di particolari zone costituite da aggregati linfoidi (MALT), costituenti noduli solitari o riuniti in complessi, definite *placche di Peyer*.

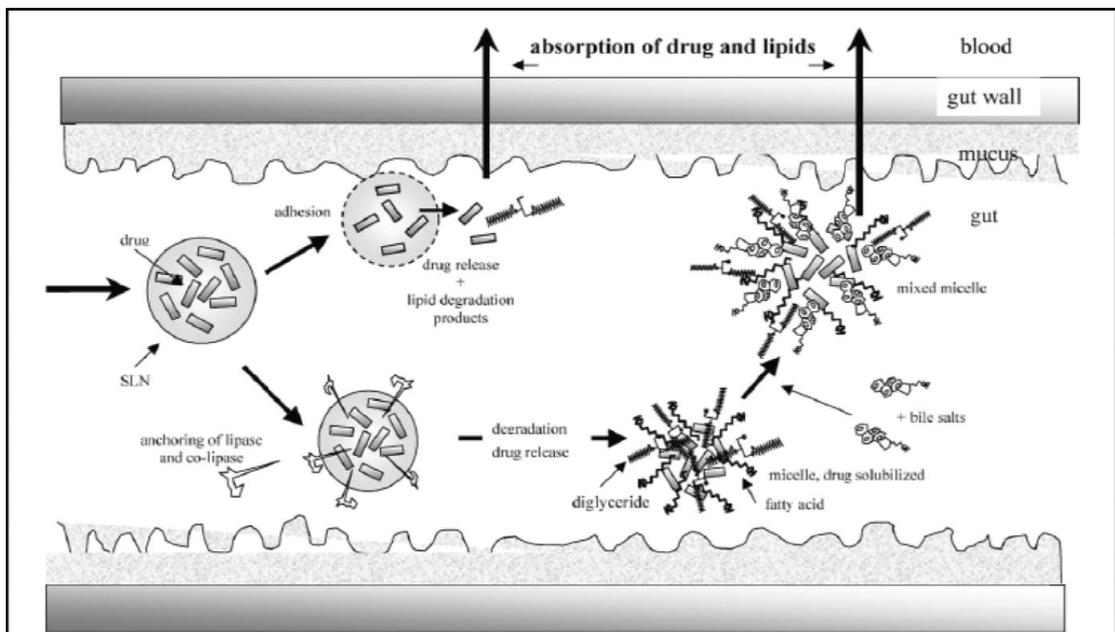
Dove è presente il nodulo o la placca, la parete intestinale è sprovvista di villi e fra le cellule epiteliali di rivestimento sono presenti *cellule M*. Ogni nodulo contiene diversi follicoli secondari e ogni placca è formata da 10 a 200 noduli. La ricca rete di capillari linfatici che permea noduli e placche manda la linfa a seni linfatici perifollicolari e da qui ai collettori linfatici della sottomucosa (fig.29).



**Figura 29:** Anatomia di un placca di Peyer

Proprio a causa di questa complessità anatomo-fisiologica dell'intestino l'assorbimento di un farmaco attraverso la mucosa intestinale è molto complesso e deve possedere delle caratteristiche chimico-fisiche ben definite. Lipinski ha determinato alcune di queste peculiarità che influenzano l'assorbimento dei farmaci dopo somministrazione orale riassumendola in una regola empirica (*Lipinski's rule of drug-likeness*)<sup>129</sup>. Tale regola stabilisce che uno scarso assorbimento a livello gastro-intestinale si verifica quando nella molecola ci siano più di cinque sostituenti donatori di H o ci siano più di dieci sostituenti accettori di H per la formazione del legame idrogeno, quando la molecola abbia un peso molecolare superiore a 500 kDa o quando il suo logaritmo del coefficiente di ripartizione (log P) sia maggiore di 5.

Al fine di ottenere il rilascio colon-specifico di farmaci somministrati attraverso la via orale e necessario veicolarli all'interno di formulazioni in grado di inibire il rilascio del farmaco all'interno dello stomaco e dell'intestino tenue e di garantirne il rilascio all'interno del colon stesso. I sistemi nanoparticellari possiedono enormi potenzialità in questo contesto in quanto sono in grado di proteggere il principio attivo incorporato dall'azione degli acidi delle secrezioni cloridropetichhe gastriche. Successivamente, una volta raggiunti i distretti intestinali, vengono assorbite a livello delle placche di Peyer attraverso meccanismi endocitotici o per via transcellulare. In alternativa il principio attivo viene veicolato all'interno delle cellule intestinali attraverso micelle di acilgliceroli o per mezzo di micelle miste formate da Sali biliari (fig.30).



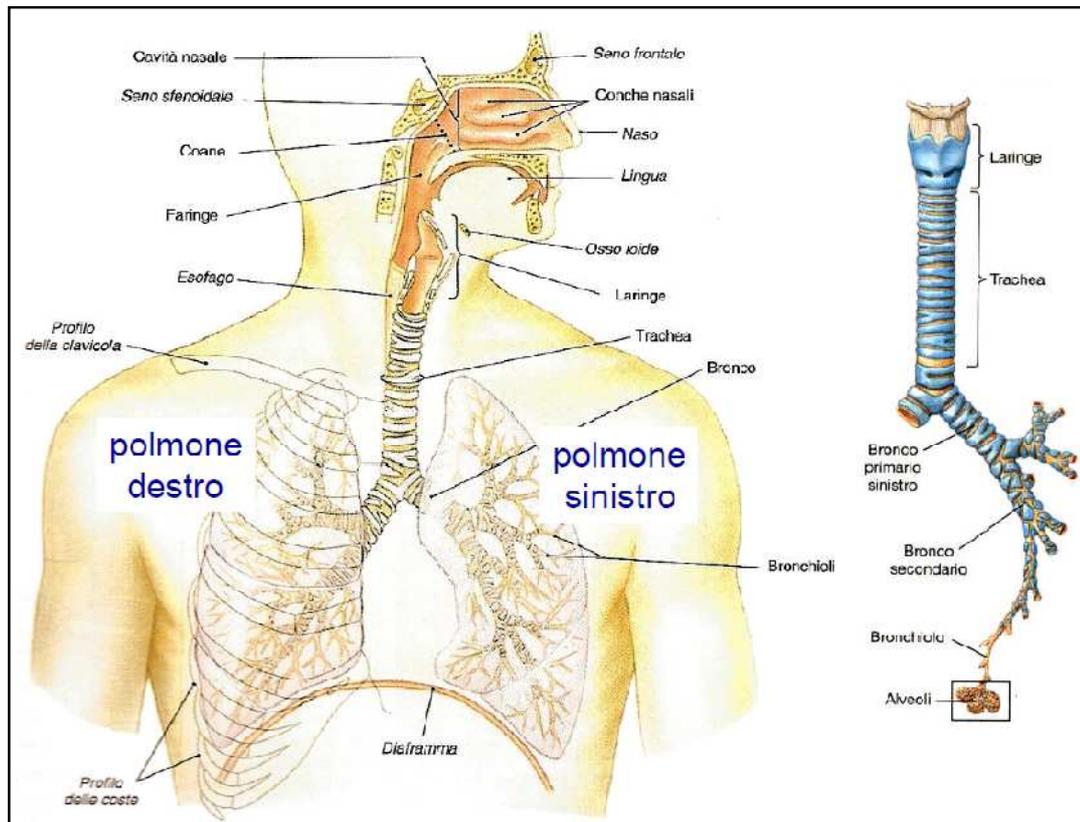
**Figura 30:** Assorbimento intestinale mediata da veicolazione in nanosistemi

## **VIA INALATORIA**

La somministrazione di principi attivi attraverso le vie respiratorie è una delle tecniche più antiche sfruttate per la cura di diverse patologie. L'apparato respiratorio, infatti, è costituito da più di 300 milioni di alveoli con una superficie di esposizione superiore ai 100 m<sup>2</sup> e con un epitelio spesso meno di 0,1 µm. Ciò stimola la progettazione di nuove forme di dosaggio in quanto queste caratteristiche morfologiche consentono un agevole assorbimento di sostanze<sup>130</sup>.

Già fin dal 1500 A.C. gli antichi Egizi usavano tali metodiche per inalare vapori di sostanze naturali<sup>131</sup>. Oggi la ricerca ha compiuto notevoli passi avanti nello sviluppo di tecnologie in grado di veicolare e rilasciare principi attivi direttamente a livello polmonare, sia con lo sviluppo di apparati inalatori (distanziatori, ecc...) che in campo tecnologico-farmaceutico con lo sviluppo di innovativi sistemi di rilascio.

Le vie aeree sono costituite da vie respiratorie e da organi respiratori. Le vie respiratorie hanno il compito di trasportare l'aria dall'esterno dell'organismo fino agli organi respiratori e sono costituite da un tratto superiore, che comprende cavità nasali e faringe, ed uno inferiore, formato da laringe, trachea e bronchi. Gli organi respiratori sono costituiti dai polmoni e sono responsabili dello scambio gassoso. Essi occupano completamente lo spazio toracico ad eccezione del mediastino, occupato dal cuore. Le basi dei polmoni poggiano sul diaframma, le facce mediali delimitano il mediastino, quelle laterali o costali (convesse) sono a contatto con le coste (fig. 31).



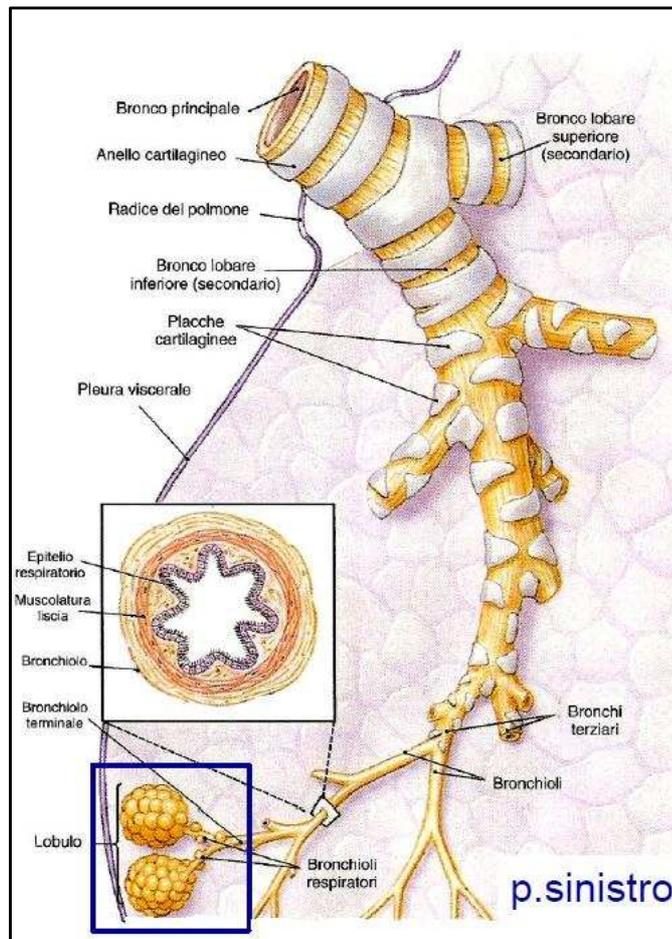
**Figura 31:** Anatomia dell'apparato respiratorio

La funzionalit  di tutto l'apparato va ben oltre l'atto respiratorio, esso infatti   implicato nella conduzione dell'aria da e verso le superfici polmonari di scambio, fornisce un'ampia area per lo scambio di gas tra aria e sangue circolante, protegge le superfici respiratorie da disidratazione, sbalzi di temperatura e altre variazioni ambientali, difende l'apparato stesso e gli altri tessuti dall'invasione di microorganismi patogeni, produce suoni, regola il volume e la pressione del sangue e controlla il pH dei fluidi corporei. Dal punto di vista tecnologico-farmaceutico la somministrazione per via inalatoria ha come obiettivo sia un'azione locale a livello delle vie aeree

superiori ed inferiori che un assorbimento sistemico del principio attivo. Per questo secondo scopo la formulazione deve essere in grado di raggiungere agevolmente le vie aeree inferiori, in particolar modo i bronchi, senza disperdersi in altri distretti dell'apparato.

I bronchi sono costituiti da componenti connettive e cartilaginee del tutto simili a quella della trachea che, man mano che si addentrano nel parenchima polmonare e si ramificano e si differenziano: le fibre elastiche nella tonaca avventizia aumentano, mentre gli anelli cartilaginei si

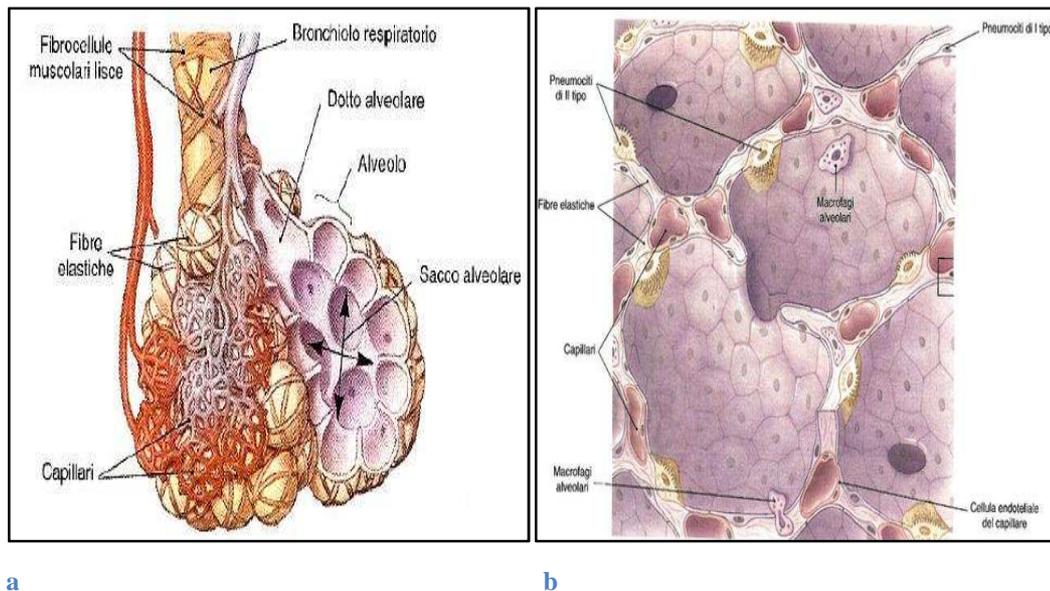
frammentano fino a scomparire. I bronchi continuano a ramificarsi fino a differenziarsi in bronchioli terminali e respiratori che sboccano nei lobuli polmonari che costituiscono gli alveoli. Ogni diramazione corrisponde ad una precisa porzione del polmone. I bronchioli sono caratterizzati da un lume di diametro di 0,3-0,5 mm e da pareti sostenute da tessuto muscolare (fig. 32). Tali pareti sono rivestite da un strato sieroso fluido (cilia) su cui è adeso uno strato mucoso che intrappola le particelle più fini evitando di farle giungere agli alveoli. Il movimento coordinato e ritmico di questo tessuti ciliato riporta verso l'esterno tutto ciò che viene bloccato (clearance mucociliare)<sup>131</sup>.



**Figura 32:** Diramazione dei bronchi e differenziazione tissutale

Nel polmone, i rami dell'arteria polmonare decorrono parallelamente alle diramazioni dell'albero bronchiale e lo stesso fanno i rami delle vene polmonari. I capillari che si originano circondano gli alveoli per poi ritornare alla vena polmonare (fig.33a). Gli alveoli polmonari sono caratterizzati da estrema riduzione dello spessore della parete, ridotta al solo epitelio alveolare e alla lamina basale. La parete dei capillari è costituita dal solo endotelio e dalla lamina basale. Un particolare tipo di pneumociti di tipo II (fig.33b) produce il surfactante polmonare, tensioattivo che riduce la tensione superficiale del fluido che riveste la

superficie alveolare. Gli scambi gassosi avvengono a livello delle membrane respiratorie, aree in cui la lamina basale dell'epitelio e i capillari adiacenti sono fusi tra loro.



**Figura 33:** Fisiologia degli alveoli (a) e differenziazione cellulare (b)

La deposizione di una forma di dosaggio a livello polmonare può avvenire con meccanismi differenti, ossia per impatto inerziale, per sedimentazione o per diffusione. Sistemi con un diametro superiore ai 10  $\mu\text{m}$  si depositano a livello orofaringeo per impatto inerziale o, tutt'al più, raggiungono la porzione superiore dei bronchi per sedimentazione. In ogni caso non c'è da aspettarsi un effetto sistemico in quanto le elevate dimensioni non consentono di raggiungere la camere alveolari. Inoltre particelle molto grandi, una volta aderite alle pareti dell'endotelio, si dissolvono molto lentamente e vengono rimosse prima che riescano a rilasciare il farmaco. Questo tipo di sistemi può essere auspicabile qualora si voglia veicolare un principio

attivo ad azione locale in uno di questi distretti. Se i sistemi hanno dimensioni inferiori ai 100 nm, invece, raggiungeranno agevolmente gli alveoli polmonari ma è molto probabile che non riescano a depositarsi e, quindi, che vengano espirate prima di riuscire a rilasciare il principio attivo. Le dimensioni ideali per riuscire a veicolare correttamente un principio attivo a livello polmonare ed ottenere un effetto sistemico sono comprese tra 200 nm ed 1  $\mu$ m. In questo caso i sistemi riescono ad oltrepassare le mucose buccali e si depositano efficacemente a livello alveolare<sup>132, 133</sup>, dove vengono captati dal sistema macrofagico alveolare e riversati nel torrente ematico. Tuttavia, una volta depositati, i sistemi incontrano un'ampia varietà di barriere biologiche e fisico-chimiche. Queste includono lo strato di muco e la presenza di enzimi catabolici tracheo-bronchiali. In alcune formulazioni possono essere impiegati degli *enhancers* di penetrazione per favorire l'attraversamento dell'endotelio, tuttavia la tossicità a lungo termine di questi composti non è stata ancora studiata. La via inalatoria rappresenta anche una valida alternativa alla somministrazione parenterale di farmaci a struttura proteica. Anche se in questo caso è necessario tenere conto di alcuni parametri come ad esempio il peso molecolare del peptide (che non dovrebbe superare i 150 kDa) che potrebbe contribuire alla formazione di strutture terziarie e quaternarie che renderebbero difficoltoso l'assorbimento a livello sistemico.

Attualmente essa rappresenta la via di elezione per il trattamento locale di patologie a carico dell'apparato respiratorio come ad esempio l'asma cronico, l'enfisema polmonare, la bronco pneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) o l'ipertensione polmonare primaria. Il vantaggio in questo caso si traduce in un limitato *first pass*

*effect* ed in una circoscrizione degli effetti secondari legati all'azione sistemica di particolari principi attivi<sup>134</sup>.

## VIA DERMICA E TRANSDERMICA

La pelle rappresenta un'ulteriore via di somministrazione di farmaci o di DDS. Fa parte dell'apparato tegumentario del quale rappresenta l'organo più esteso con i suoi 2 m<sup>2</sup> di estensione. E' suddivisa in tre strati distinti in base alla distanza dalla porzione esterna che sono l'*epidermide*, il *derma* e l'*ipoderma*. La parte meno vascolarizzata è l'*epidermide*, composta da cellule dermiche invecchiate che regolarmente vengono portate in superficie (fig. 34).

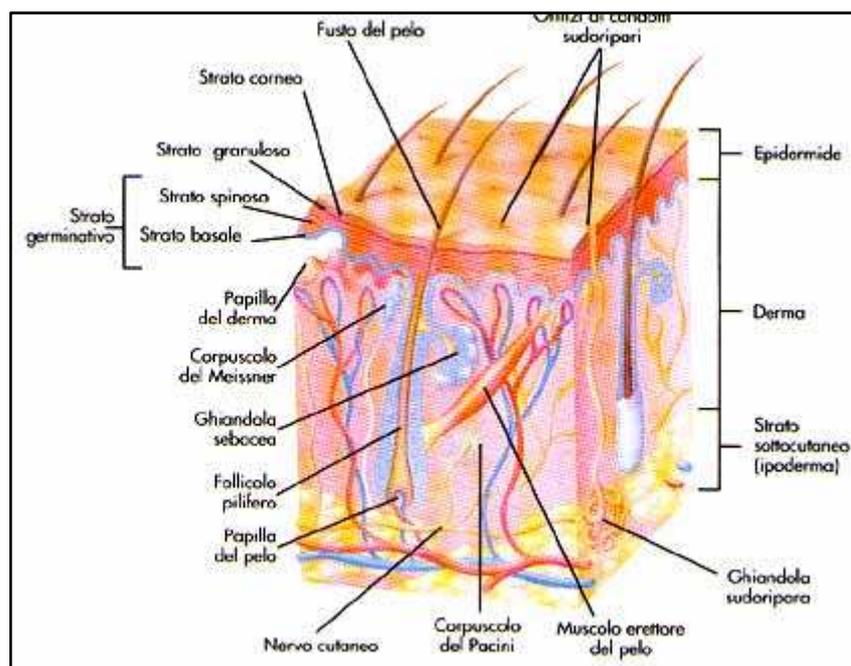


Figura 34: Anatomia della pelle

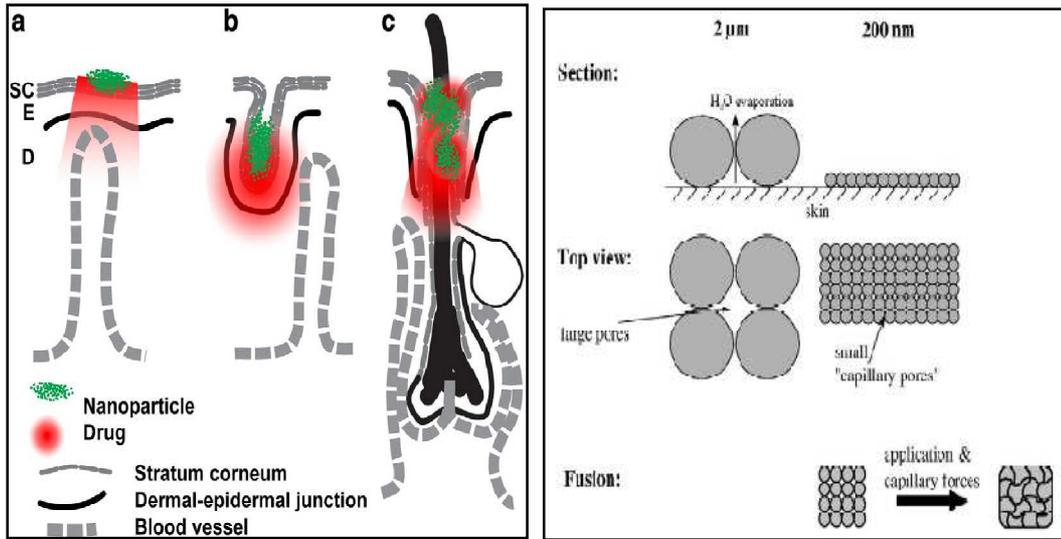
Le funzioni della pelle sono di fondamentale importanza per l'organismo umano che abbracciano settori fisiologici molto ampi. Innanzitutto essa rappresenta una barriera anatomica contro potenziali agenti patogeni ed eventuali agenti nocivi e, per questo motivo, costituisce la prima linea di difesa dell'organismo contro le aggressioni esterne. Contiene inoltre le cellule di Langerhans, con la funzione di presentare l'antigene, che fanno parte del sistema immunitario acquisito<sup>135, 136</sup>, infatti la pelle costituisce la prima barriera di difesa contro l'azione di potenziali patogeni. Un altro ruolo di fondamentale importanza è rappresentato dalla sensibilità tattile. Nella cute, infatti, sono presenti numerose terminazioni nervose che rilevano le variazioni termiche (termocettori), le pressioni (pressocettori), le vibrazioni e le sensazioni dolorose (algocettori), che mediano il senso del tatto.

La pelle costituisce una barriera asciutta e relativamente impermeabile contro la perdita di liquidi<sup>136</sup>, regolando anche l'escrezione di elettroliti tramite il mantenimento del delicato meccanismo omeostatico del contenuto idrico (*perspiratio sensibilis* e *perspiratio insensibilis*).

La pelle è anche responsabile della regolazione termica. Essa, infatti, possiede un afflusso ematico ben superiore a quelle che sono le sue effettive necessità metaboliche e ciò ne fa un mezzo ideale per la regolazione della temperatura corporea. La vasodilatazione provoca un incremento del flusso ematico locale che favorisce la cessione dell'energia termica all'ambiente esterno, viceversa la vasocostrizione, riducendo la quantità di sangue in transito, preserva le dispersioni termiche. La sudorazione stessa facilita invece la dispersione del

calore, quindi funge da isolante termico, da regolatore della temperatura corporea e previene l'eccessiva dispersione idrica<sup>136</sup>.

Inoltre la pelle costituisce un serbatoio di lipidi ed acqua e consente la sintesi di alcune sostanze necessarie come la vitamina D. La somministrazione di farmaci attraverso la pelle consente di ottenere sia un effetto sistemico che un effetto locale. In entrambi i casi è stata studiata la veicolazione attraverso carrier nanoparticellari. Alcuni studi riportano che è stata dimostrata sperimentalmente la capacità di carrier lipidici di penetrare attraverso i follicoli piliferi epidermici e di ottenere un rilascio sistemico (fig. 35a)<sup>137</sup>. Tuttavia attualmente l'impiego più diffuso dei carrier nanostrutturati per la veicolazione attraverso la pelle riguarda l'applicazione topica per ottenere un effetto locale. Da questo punto di vista le formulazioni a base di nanoparticelle lipidiche consente un largo impiego in campo cosmetico in quanto, grazie alle loro ridotte dimensioni, riescono ad interrompere la *perspiratio insensibilis* generando una marcata idratazione della pelle e, quindi, un effetto emolliente (fig. 35b)<sup>138</sup>.



a

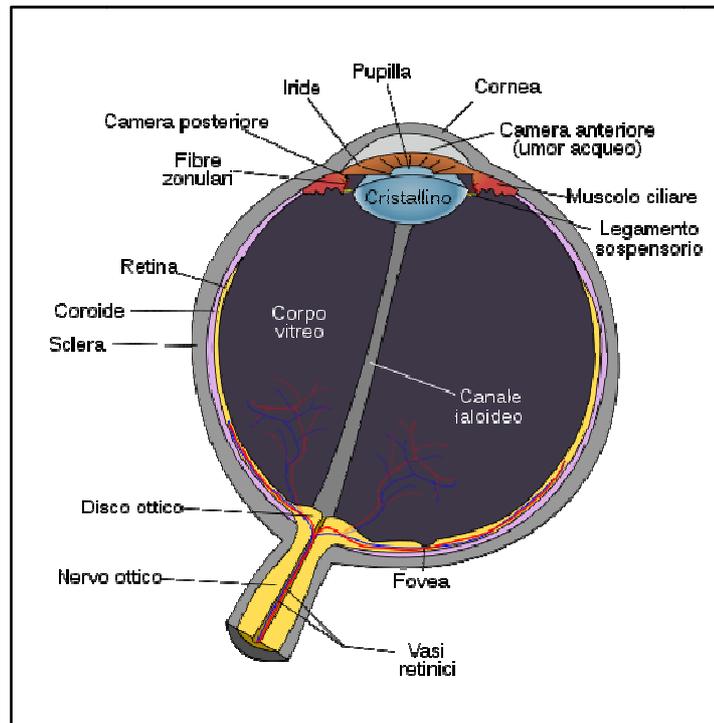
b

**Figura 35:** Azione transdermica di carrier nanostrutturati (a) e modelli di film per applicazione topica a confronto (b)

## ***VIA OCULARE***

L'occhio ci garantisce la visione trasformando la luce che lo colpisce in informazioni che, sotto forma di impulsi elettrici, arrivano al cervello. La visione da sola rappresenta circa il 70% delle percezioni che l'uomo riceve dal mondo esterno e per questo l'occhio rappresenta l'organo di senso principale dell'apparato visivo, che ha il compito di ricavare informazioni sull'ambiente circostante attraverso la luce. L'occhio umano (e degli organismi superiori) raccoglie la luce che gli proviene dall'ambiente, ne regola l'intensità attraverso un diaframma (*l'iride*), la focalizza attraverso un sistema regolabile di lenti per formarne un'immagine e trasforma questa immagine in una serie di segnali elettrici che attraverso il nervo ottico vengono inviati al cervello per l'elaborazione e l'interpretazione (fig. 36). La *cornea* è la prima lente naturale che la luce incontra, misura circa 0.5 mm di spessore, è trasparente e di forma sferica. Esistono difetti di curvatura della sua superficie che sono responsabili dell'astigmatismo. Poiché la cornea non è vascolarizzata respira per lo più l'ossigeno atmosferico e tale funzione è resa meno agevole dalle lenti a contatto che vengono posizionate proprio sulla superficie corneale. La cornea è l'organo con la maggiore densità di fibre nervose per unità di superficie del nostro corpo, per questo motivo anche il più piccolo trauma determina dolore violento. La *pupilla* è letteralmente un foro al centro dell'iride, è cioè un diaframma naturale di diametro variabile il cui compito è quello di modulare la quantità di luce che va a colpire la retina. Al buio si dilata mentre in condizioni di elevata luminosità si restringe. L'iride è responsabile del colore degli occhi, che dipende dalla pigmentazione

naturale più o meno intensa a cui corrispondono rispettivamente gli occhi scuri o chiari che abbiamo geneticamente ereditato.



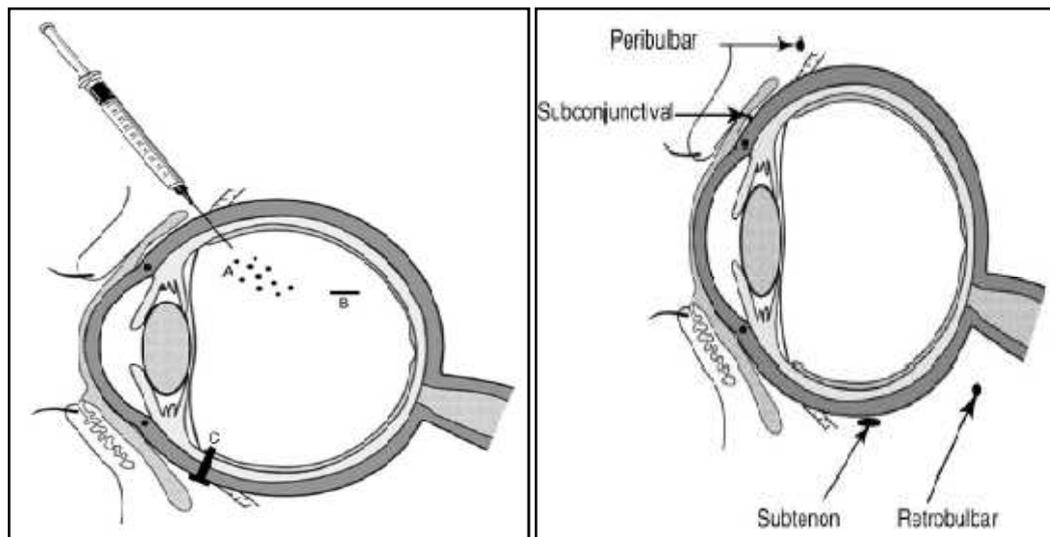
**Figura 36:** Anatomia dell'occhio

Il cristallino è la seconda lente naturale che la luce incontra immediatamente dopo la cornea, prima di raggiungere la retina. È una lente elastica, può cioè variare il suo spessore ed il suo potere convergente consentendo la visione e la messa a fuoco per gli oggetti vicini. Con il passare degli anni il cristallino perde elasticità irrigidendosi e dando luogo alla condizione patologica nota come presbiopia. A causa di una degenerazione spesso legata all'età, caratterizzata da meccanismi non ancora del tutto noti, il cristallino in

alcuni casi perde la sua normale trasparenza determinando la cataratta. Il corpo vitreo è una sostanza gelatinosa, trasparente che occupa la cavità oculare compresa tra il cristallino e la retina. Esso è trasparente ed aderisce perfettamente alla retina ed al suo interno possono formarsi, con il passare degli anni, piccole opacità puntiformi o filiformi che prendono il nome di corpi mobili vitreali e sono spesso responsabili della visione di miodesopsie (comunemente note come mosche volanti) spesso riferite dai pazienti. La retina è una sottile membrana formata da cellule nervose, adagiata sul fondo dell'occhio, il cui ruolo è quello di trasformare gli impulsi luminosi che riceve in impulsi elettrici, che attraverso il nervo ottico vengono trasmessi al cervello. La porzione centrale della retina prende il nome di macula ed è caratterizzata da una densità cellulare decisamente più elevata, e dalla presenza di 2 tipi di cellule, i coni e i bastoncelli, che sono responsabili della visione diurna e notturna. La macula consente la visione distinta, la lettura e la percezione netta dei colori ma per funzionare correttamente richiede una discreta quantità di luce. La restante porzione periferica di retina, inadatta a garantire la visione per vicino, permette al paziente di orientarsi e di muoversi discretamente nello spazio, garantendogli la percezione periferica del campo visivo e la visione in scarse condizioni di luminosità. La retina è connessa ad una fibra nervosa filiforme che trasmette impulsi elettrici all'encefalo. L'insieme di tali fibre fascicolate in un unico fascio nervoso formano il nervo ottico. Un suo danneggiamento a causa ad esempio di traumi accidentali, tumori, emorragie, porta alla perdita completa della capacità di vedere attraverso un occhio. L'interesse farmacologico e tecnologico-farmaceutico è sempre più rivolto verso lo sviluppo di forme di dosaggio adeguate alla

veicolazione di sostanze biologicamente attive alla porzione posteriore dell'occhio. Questo consentirebbe il trattamento di retinopatie per le quali ancora oggi non è previsto alcun protocollo terapeutico come ad esempio le retinopatie diabetiche o la retinite pigmentosa.

Le metodiche attualmente impiegate per la somministrazione a livello oculare sono rappresentate dalle iniezioni intravitree o da impianti applicati sul corpo vitreo o sulla sclera (vie intravitree) (fig. 37a) oppure da somministrazioni peribulbari, sub congiuntivali o retrobulbari (vie periorculari) (fig. 37b).



a

b

**Figura 37:** Vie di somministrazione oculare intravitrea (a) e periorculari (b)

La principale difficoltà sta nel riuscire ad attraversare tutti gli strati che precedono la retina, caratterizzati da grandi differenze sia di tipo chimico (pH, equilibrio idrofilico/lipofilico) che di tipo fisico (spessore dei singoli strati). Tuttavia il più grande ostacolo è rappresentato dalla *barriera emato-retinica* costituita dall'endotelio

dei vasi retinici e dall'epitelio pigmentato retinico. Essa è formata da cellule strettamente legate insieme per impedire a certe sostanze di entrare nel tessuto della retina. Inoltre, la presenza di capillari non fenestrati della circolazione retinica e di giunzioni occludenti (definite anche *tight junction*) tra le cellule retiniche epiteliali, impediscono il passaggio di grandi molecole dai vasi coriocalillari alla retina<sup>139</sup>.

Alcuni studi preclinici dimostrano come la somministrazione di nanoparticelle per via periorbitale limitino l'uptake e la successiva eliminazione dei principi attivi e ne preservano la struttura chimica dall'azione enzimatica specifica dell'ambiente oculare. Saishin et al. hanno testato dei sistemi nanostrutturati per la veicolazione di un inibitore chinasi al segmento posteriore dell'occhio per il trattamento della *neovascolarizzazione coroidea* in un modello porcino<sup>140</sup>, mentre Gomes dos Santo et al. hanno sperimentato un sistema nanostrutturato somministrato per via sub congiuntivale per il trattamento del glaucoma in cavie di coniglio<sup>141</sup>.

In linea di massima, al di là della via di somministrazione scelta, bisogna sempre considerare che esistono grandi discrepanze tra analisi di rilasci in vitro e saggi di rilascio in modelli in vivo. Il rilascio del farmaco in vitro dipende esclusivamente dalla sua diffusione dalla fase solida (compartimento donatore) ad una fase liquida (compartimento accettore). I fenomeni coinvolti nelle cinetiche di rilascio in vivo, invece, dipendono sia dalla diffusione dalla matrice lipidica solida che dalla degradazione della matrice stessa. In definitiva il destino delle nanoparticelle in vivo non dipende solo dalla via di somministrazione scelta, ma anche dalle interazioni che queste possono instaurare con l'ambiente biologico circostante, compresi processi di biodistribuzione e catabolismo enzimatico. Gli enzimi

coinvolti nei processi di degradazione delle nanoparticelle lipidiche sono solitamente le lipasi, presenti in vari organi e tessuti. Tali enzimi sono in grado di idrolizzare i legami esterei presenti tra le catene di acidi grassi e gli scheletri centrali portando alla formazione di miscele di mono- e digliceridi parziali, di glicerolo e di acidi grassi liberi<sup>142</sup>. Per avvicinarsi alle condizioni biologiche in vivo è possibile effettuare degli studi in vitro che siano in grado di determinare in maniera approssimativa la velocità di degradazione della matrice. A questo scopo si opera mediante test enzimatici usando complessi di lipasi/colipasi pancreatici<sup>143</sup>. In generale, la degradazione è più lenta per matrici lipidiche costituite da lipidi che contengono acidi grassi a catena lunga<sup>143-147</sup>. Inoltre i tensioattivi possono sia accelerare che rallentare i processi degradativi. I sali sodici dell'acido colico, per esempio, promuovono l'adesione del complesso lipasi/colipasi accelerando la degradazione della matrice, al contrario, i poloxameri (copolimeri del poliossietilene e del polioossipropilene) diminuiscono tale velocità di degradazione comportandosi da stabilizzanti sterici e impedendo l'ancoraggio degli enzimi sulle nanoparticelle. Questo fenomeno sembra correlato al numero di unità ossietileniche presenti nel tensioattivo che potrebbero ostacolare l'adsorbimento del complesso enzimatico prima citato e di conseguenza ridurre l'entità del processo di degradazione.

## ***2.SCOPO DELLA TESI***

Il lavoro che costituisce lo scopo di questa tesi è volto allo sviluppo di forme di dosaggio basate su sistemi nanoparticellari solidi di natura lipidica per la veicolazione di principi attivi in diversi distretti per il trattamento innovativo di diverse patologie. La prima tipologia di sistemi è volta al trattamento degli epatocarcinomi e del neuroblastoma e sfrutta la buona attività biologica di molecole innovative come *Tyrphostin* AG1478 o il *Curcumino*. Entrambi i principi attivi possiedono spiccate attività di soppressione nei confronti di diversi meccanismi che stanno alla base dello sviluppo e della proliferazione di cellule tumorali, tuttavia la loro somministrazione *free*, ossia senza alcun sistema veicolante, ne impedisce l'impiego a causa di una scarsa biodisponibilità (nel caso del curcumino) e di una elevata tossicità sistemica (nel caso di *Tyrphostin*).

La seconda tipologia di sistemi è stata progettata e realizzata allo scopo di ottenere un approccio terapeutico innovativo al morbo di Alzheimer che si discosti dagli attuali protocolli terapeutici, i quali, per altro, riguardano quasi esclusivamente il trattamento sintomatico o il rallentamento della progressione della malattia. In questo caso la molecola cui è stato rivolto l'interesse è l'enantiomero R del *Flurbiprofen*, che ha mostrato avere una potenzialità molto spiccata nel ripristinare alcune condizioni anatomo-fisiologiche che vengono alterate a causa della cascata di eventi che coinvolgono i tessuti cerebrali e nervosi dei soggetti affetti da Alzheimer.

Infine, sono stati realizzati ulteriori sistemi con il fine ultimo di veicolare a livello sistemico l'allergene responsabile dell'instaurarsi di

ipersensibilità ai pollini delle graminacee, una forma allergica molto diffusa soprattutto nelle regioni del bacino del Mediterraneo che, frequentemente, si presenta con sintomi importanti che riguardano l'apparato respiratorio (asma, riniti, ecc...) ed oculare (congiuntiviti croniche, ecc...). In particolare è stato impiegato il principale allergene denominato *ParJ 2*, una proteina ottenuta con tecniche di DNA ricombinante con lo scopo di instaurare un'aumentata tolleranza a tale allergene da parte del sistema immunitario e, conseguentemente, di eliminare o ridurre l'insorgenza di fenomeni allergici.

### **3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### **3.1 APPROCCIO TERAPEUTICO A EPATOCARCINOMI E NEUROBLASTOMI CON NANOPARTICELLE LIPIDICHE SOLIDE**

##### **3.1.1 CENNI GENERALI SULL'EZIOPATOLOGIA DEI TUMORI**

Il *tumore* è una patologia nota da millenni da tutte le popolazioni più civilizzate. Diversi focolai tumorali sono stati ritrovati in alcuni frammenti osteomandibolari rinvenuti in Africa ed in alcune mummie egiziane ed anche i Greci erano a conoscenza delle principali caratteristiche dei tumori ed adottavano procedure terapeutiche chirurgiche radicali non molto diverse da quelle attuali. Il termine cancro (dal latino *cancer*, ossia granchio) è attribuibile a Galeno, che assimilava le zampe dell'animale ai vasi che irrorano le cellule tumorali.

Il galoppante aumento dell'aspettativa di vita e la continua esposizione ad agenti chimico-fisici predisponenti tipici dello stile di vita moderno hanno incrementato enormemente l'incidenza dei tumori, che oggi rappresentano una delle principali cause di morte nei paesi sviluppati.

Tuttavia è bene fare un po' di chiarezza circa i termini che attualmente definiscono tutto ciò che concerne la branca oncologica. Il termine *tumore* (dal latino "*tumor*") non definisce la patologia vera e propria, ma sta ad indicare la tipica tumefazione tissutale che contraddistingue un focolaio tumorale e comprende una serie di aspetti anatomico-fisiologici caratteristici delle cellule tumorali che appaiono come una

massa dimensionalmente e morfologicamente diversa dall'intorno cellulare sano che le circonda. Con il termine *neoplasia*, che spesso viene erroneamente impiegato come un sinonimo di tumore, si intende una neo-formazione cellulare che compare in un tessuto e che non ha un apparente ruolo funzionale; molto spesso le neoplasie rappresentano dei tumori di origine benigna. Il termine *cancro*, invece, viene adoperato per distinguere i tumori di origine maligna, ossia quella tipologia di cellule tumorali aggressive che sono in grado di metastatizzare. L'*iperplasia* è una caratteristica generale delle cellule tumorali che descrive la abnorme crescita cellulare in termini quantitativi. Questo aumento incontrollato del numero di cellule è dovuto ad un'alterazione del fisiologico ciclo cellulare che normalmente regola la proliferazione.

Il ciclo cellulare è un processo geneticamente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro, dai quali dipende la corretta proliferazione delle cellule eucariotiche. Gli eventi molecolari che controllano il ciclo cellulare sono ordinati e direzionali ed ogni processo è la diretta conseguenza dell'evento precedente ed è la causa di quello successivo. È caratterizzato da cinque fasi:  $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$ , *mitosi* e *citodieresi* (fig. 38).

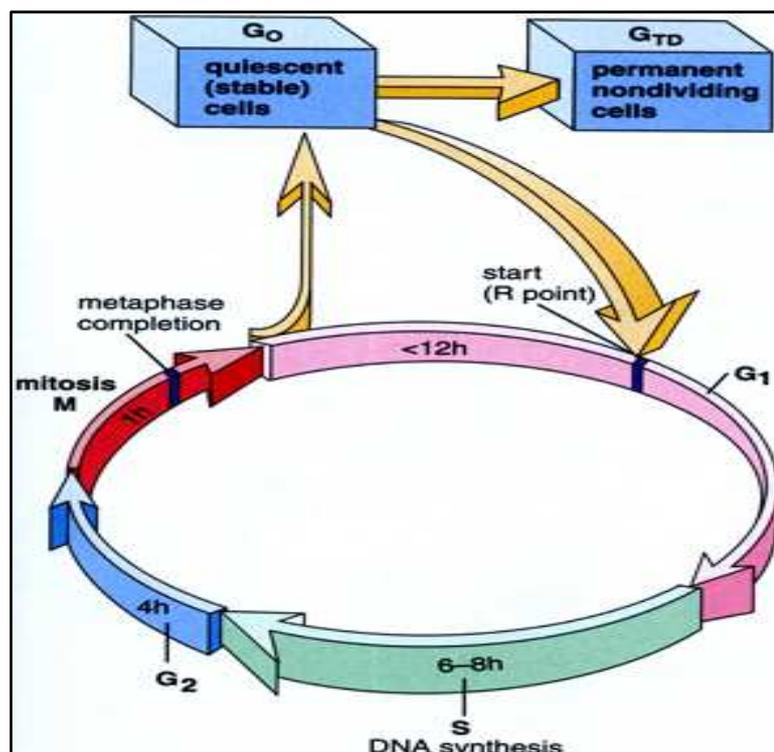


Figura 38: Fasi del ciclo cellulare

Tale processo è di estrema importanza ed eventuali errori al suo interno compromettono la vitalità e la funzionalità cellulare. Per questo motivo sono presenti dei punti di controllo fisiologici (*checkpoints*) localizzati a livello delle transizioni  $G_1/S$  e  $G_2/M$ . Più nel dettaglio l'insieme delle fasi  $G_1$ ,  $S$  e  $G_2$  è globalmente identificato come *interfase* ( $I$ ). La fase  $G_1$  (fra la fine della mitosi e l'inizio della fase  $S$ ) e la fase  $G_2$  (fra il termine della fase  $S$  e l'inizio della fase  $M$ ) hanno una durata variabile e sono le parti del ciclo cellulare in cui si ha la maggior parte della sintesi proteica con conseguente accrescimento della massa cellulare. In particolare la fase  $G_1$  rappresenta l'intervallo in cui le cellule rispondono agli stimoli extracellulari e decidono se procedere alla duplicazione del DNA ed

andare incontro a mitosi, o se uscire dal ciclo cellulare ed entrare in uno stato di quiescenza in modo temporaneo o irreversibile (fase  $G_0$ ).

In una cellula sana il ciclo cellulare è regolato e gestito dall'interazione con messaggeri di origine proteica. Alcuni di questi promuovono il passaggio da una fase cellulare alla successiva, altri, se durante un checkpoint sono stati riscontrati dei difetti genici a carico del filamento di DNA, arrestano il ciclo cellulare per consentire la riparazione della sequenza genica oppure, qualora non sia possibile una riparazione, inducono la morte della cellula (*apoptosi*).

La sintesi di questi messaggeri proteici è regolata da particolari porzioni geniche definite *oncogeni* e *oncosoppressori*. I primi derivano da mutazioni genetiche di sequenze geniche precursori (*proto-oncogeni*) e codificano per proteine in grado di stimolare la crescita cellulare. Gli oncosoppressori, invece, sono dei geni che promuovono la sintesi proteica di messaggeri che inducono la morte cellulare. Risulta chiaro, quindi, che l'esposizione di una cellula all'azione degli oncogeni indirizza la cellula stessa verso lo sviluppo di un fenotipo neoplastico.

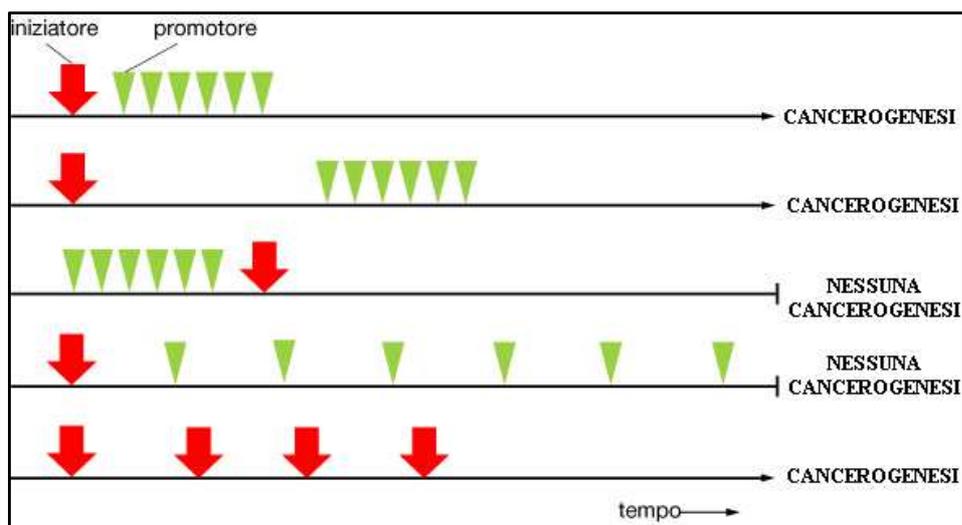
Certamente il cancro non è determinato da una sola causa e non insorge per l'improvvisa comparsa di una cellula neoplastica. La conversione di una cellula normale in una tumorale richiede invariabilmente la somma di più fattori che raramente agiscono contemporaneamente e che manifestano la loro azione durante un periodo piuttosto lungo di mesi o anni, determinando un accumulo di effetti che sfocia nello sviluppo e nella progressione della neoplasia. Durante questa evoluzione del tumore le cellule che proliferano più velocemente e si adattano meglio all'ambiente subiscono un processo di espansione clonale e sostituiscono gradualmente le cellule dello

stadio precedente. In tal modo, all'intervento di ogni nuovo agente causale, il tumore avanza progressivamente dagli stadi iniziali più benigni alle forme più maligne dotate di capacità invasiva e metastatizzante. In ogni caso, il punto di partenza del processo che porta alla formazione di una massa tumorale, interessa proprio il delicato equilibrio del ciclo cellulare appena descritto e le cellule perdono la loro capacità di regolazione. Una cellula tumorale, infatti, presenta alterazioni proliferative e differenziative che si traducono in una alterazione globale delle normali funzionalità cellulari come ad esempio la perdita del controllo proliferativo dovuto ad insensibilità ai meccanismi che regolano la sua attività, la perdita del controllo del potenziale replicativo cellulare per cui la cellula diventa immortale, la perdita della corretta informazione posizionale con conseguenze sulle capacità di differenziamento o la perdita del controllo della distribuzione territoriale con il superamento dei limiti territoriali della popolazione di origine.

Il danneggiamento del corredo genetico avviene nella maggior parte maggior parte dei casi in seguito ad esposizioni ad agenti ambientali chimici e fisici che agiscono con un meccanismo genotossico, cioè provocando mutazioni, riarrangiamenti e delezioni nel genoma cellulare. Per questa ragione il cancro è definito dalla maggior parte degli oncologi come una malattia a carattere genetico.

Gli agenti responsabili della cancerogenesi possono essere radiazioni ionizzanti ad alto contenuto energetico (raggi  $\alpha$ , raggi  $\gamma$ , raggi UV, ecc...) o agenti chimici (alchilanti, ossidanti, ecc...), in ogni caso la cancerogenesi si sviluppa attraverso due stadi. L'*iniziazione* è lo stadio durante il quale avviene la mutazione che genera il danno genico, tuttavia non tutte le sostanze *mutagene* sono cancerogene

poiché, affinché si sviluppi un tumore, è quasi sempre necessario che la mutazione genica avvenga su particolari siti genomici. Soli in pochi casi alcuni l'esposizione prolungata e ripetuta ad alcuni agenti iniziatori induce cancerogenesi. La *promozione*, invece, è lo stadio che avviene in seguito all'esposizione cellulare ad un agente iniziatore. Gli agenti promotori, infatti, non sono di per sé cancerogeni se agiscono su una cellula che non ha subito mutazioni geniche, ma, se il corredo genico cellulare è stato precedentemente intaccato dall'azione di un iniziatore, inducono cancerogenesi aumentando la proliferazione di cellule iniziate (fig. 39).



**Figura 3:** Relazione tra esposizione ad iniziatori e promotori e cancerogenesi

Il danno genetico, inoltre, oltre che essere di origine ambientale, può anche essere congenito ed in questo caso l'alterazione genomica colpisce la linea germinale di un individuo ed è trasmessa

ereditariamente alla progenie. In questo caso una singola lesione ereditaria conferisce la predisposizione alla neoplasia anche se richiede l'associazione di altre concause per lo sviluppo del tumore.

L'approccio terapeutico innovativo delle patologie tumorali basato su sistemi nanostrutturati è mosso dalla possibilità di veicolare il farmaco direttamente sul sito bersaglio, limitandone la distribuzione in altri distretti. La *veicolazione attiva* verso un target cellulare neoplastico è possibile grazie all'esposizione di molecole direzionanti sulla superficie dei sistemi che le rendono affini verso quei distretti. La *veicolazione passiva*, invece, sfrutta i cambiamenti morfologici che caratterizzano l'intorno anatomico di un focus tumorale e rende agevole l'accumulo del farmaco aumentandone il tempo di permanenza. Questo fenomeno viene comunemente descritto dalla comunità scientifica come *effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention)*. Un sito tumorale è caratterizzato dalla presenza di fenestrature nell'endotelio vasale che, quindi, diventa discontinuo e più permeabile in paragone ad un vaso sanguigno che irrori un tessuto sano. Al contrario, il sistema di drenaggio linfatico prossimo ad una formazione neoplastica diventa meno permeabile, condizione che si traduce in una funzione linfatica ridotta. Queste caratteristiche morfologiche possono essere interpretate come una risposta di adattamento fisiologica all'aumentato fabbisogno nutrizionale delle cellule tumorali, ma contemporaneamente possono essere sfruttate per la veicolazione di molecole ad attività antineoplastica. Le fenestrature endoteliali, infatti, consentono il passaggio di farmaci chemioterapici (sia free che veicolati) che si allontanano dal torrente ematico per accumularsi nei tessuti tumorali. Successivamente il ridotto drenaggio linfatico genera una riduzione dell'eliminazione ed un conseguente

accumulo in loco, specialmente per i farmaci veicolati in sistemi nanostrutturati (fig. 40).

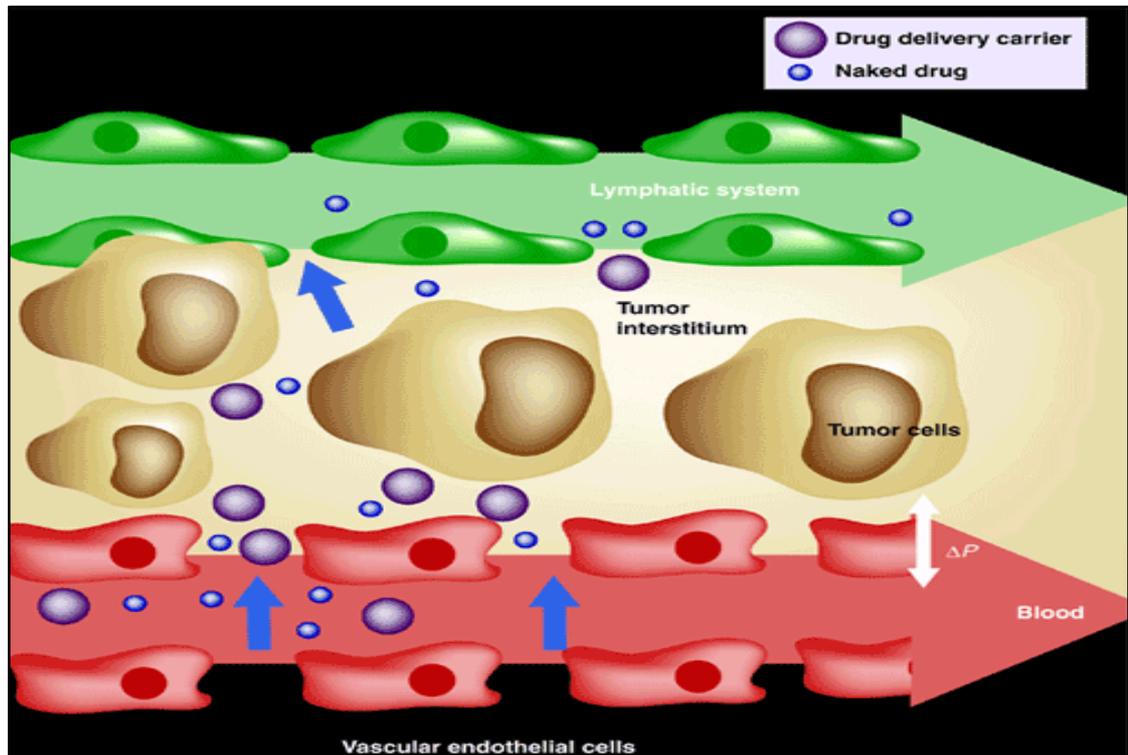


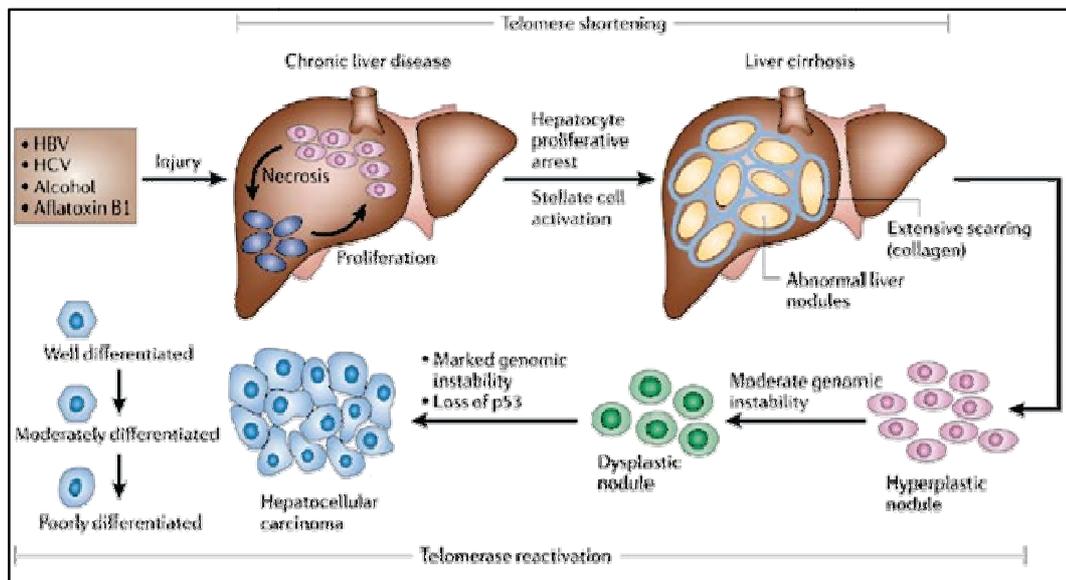
Figura 40: Effetto EPR

### **3.1.2 EPATOCARCINOMI**

Il *carcinoma epatocellulare* (HCC) rappresenta oltre il 90% di tutti i tumori epatici maligni. Presente in elevata incidenza in alcune aree Africane (Mozambico 103 casi /100.000 abitanti /anno) e nel Sud-Est Asiatico (Cina, Giappone, Taiwan) è relativamente raro in Europa e Nordamerica tuttavia, negli ultimi decenni, ha fatto registrare un notevole incremento di frequenza, tanto da rappresentare fino al 3-6% di tutti i tumori solidi negli USA e in Europa e fino al 20-40% in Africa e Sud-Est Asiatico. Il sesso maschile è più frequentemente colpito (4:1). Raro al di sotto dei 40 anni, in Occidente presenta picchi di incidenza massima nella 3° e 4° decade. In Occidente e in Giappone il carcinoma epatocellulare si associa alla cirrosi epatica nel 70-80% dei pazienti.

Dal punto di vista eziologico grande rilievo viene dato all'associazione con il virus dell'epatite B (HBV), sia in pazienti cirrotici che non cirrotici. In ampie casistiche di epatocarcinomi, infatti, sono state segnalate positività per i markers dell'epatite B nel 37% dei pazienti non cirrotici e nell'87% di quelli cirrotici ed alcuni studi hanno documentato l'integrazione del DNA virale nel genoma delle cellule neoplastiche, evento<sup>148, 149</sup> che potrebbe rivestire grande importanza nella oncogenesi degli epatocarcinomi. Agenti chimici come le nitrosamine (derivate dai nitrati presenti nei diversi alimenti), il cloruro di vinile, l'alcool, gli androgeni ad alte dosi o le aflatossine B1 dell'*Aspergillus Flavus* sono considerati fattori di rischio specifici. L'epatocarcinoma è un tumore a lento accrescimento che può insorgere su fegato sano o su fegato cirrotico. Insorge nella maggior parte dei casi (70%) come nodulo singolo tuttavia non é chiaro se, la

restante minoranza (30%) che sembra svilupparsi come tumore plurifocale, prenda origine da un unico clone di cellule neoplastiche, che precocemente metastatizza nel fegato, oppure, come sembra più probabile, da più cloni cellulari che si sviluppano indipendentemente. Il nodulo primitivo tende ad accrescersi indefinitamente ed è in grado di dare luogo ad una germinazione neoplastica extracapsulare definita *satellitosi* che spesso è responsabile dell'insorgenza di metastasi in altri distretti epatici per diffusione venosa (fig. 41).



**Figura 41:** Sviluppo di un epatocarcinoma

Nella progressione neoplastica compaiono metastasi nei linfonodi del peduncolo epatico ed a distanza soprattutto nel polmone, mentre sono meno frequenti le localizzazioni ossee, cerebrali, surrenaliche. L'accrescimento per contiguità, invece, coinvolge spesso il diaframma e le vene sovraepatiche e la vena porta e può determinare trombosi

progressive sino alla cava, embolie polmonari, occlusione completa dell'atrio destro e trombosi del tronco portale con gravi emorragie conseguenti a varici esofagee. La causa più frequente di morte è rappresentata dall' insufficienza epatica nel 35%, da metastasi polmonari nel 21%, da emorragia più varici esofagee nel 16% e da emoperitoneo nel 9%. L'epatocarcinoma è una neoplasia a prognosi molto sfavorevole: più del 90% dei pazienti con diagnosi di HCC muore in conseguenza della patologia. La diagnosi precoce è molto rara e spesso occasionale dal momento che la localizzazione della neoplasia nel fegato, il suo volume, e la riserva funzionale epatica la rendono spesso asintomatica.

La diagnosi è possibile grazie al dosaggio di markers specifici o attraverso tecniche ecografiche. Spesso sono presenti livelli elevati di *Gamma GT*, *Fosfatasi Alcalina* e la *Alfaferroproteina*, un marker che presenta un'affinità per la diagnosi di HCC nel 69% dei casi.

Gli esami strumentali comprendono invece l'*Ecografia* (EG), la *Tomografia Assiale Computerizzata* (TAC), la *Risonanza Magnetica* (RM), l'*angiografia* e gli *esami citologici ed istologici* di campioni di tessuto prelevati attraverso tecniche laparoscopiche.

Il trattamento degli HCC è molto complesso in quanto dipende da numerosi fattori come ad esempio la presenza da altre patologie (cirrosi, epatiti, ecc...), la natura della neoplasia (singola, multifocale, ecc...), la quantità di organo compromesso o la presenza di metastasi. La terapia medica si avvale di una chemioterapia sistemica basata sull'impiego di diverse tipologie di farmaci.

Circa il 20% dei pazienti con epatocarcinoma risponde in modo obiettivo al trattamento endovenoso con chemioterapici, in particolare le *Antracicline*. Tuttavia, in nessuno studio è stato dimostrato un

aumento di sopravvivenza dopo trattamento mentre è frequente la comparsa di segni clinici di tossicità da farmaco in termini di mielosoppressione e riattivazione dell'infezione HBV<sup>150</sup>. Un altro approccio farmacologico consiste nell'impiego di *Tamoxifene*, una molecola ad attività antiestrogena. E' stato infatti ipotizzato un controllo ormonale della crescita dell'epatocarcinoma grazie ai risultati favorevoli di alcuni studi clinici condotti su pazienti trattati con terapia di farmaci antiestrogeni<sup>151-154</sup>. Recenti studi<sup>155</sup> suggeriscono l'espressione di diverse forme di recettori per estrogeni in diverse fasi del tumore, con implicazioni prognostiche diverse in quanto il tumore avrebbe una distinta sensibilità a estrogeni e progestinici a seconda che esprima o no recettori specifici. L'approccio non farmacologico comprende diverse tecniche più o meno invasive che hanno come scopo primario quello di raggiungere chirurgicamente il sito tumorale e di eliminare fisicamente la massa tumorale, cercando di lasciare inalterato il tessuto epatico funzionale. L'*alcoholizzazione percutanea ecoguidata* (PEI) è una delle prime tecniche messe a punto ed attualmente la più diffusa e si è imposta pertanto come valida alternativa terapeutica nel trattamento dell'epato-carcinoma in cirrosi. La tecnica di esecuzione è basata sull'elevata sensibilità all'etanolo da parte di cellule tumorali rispetto agli epatociti sani. Essa consiste nell'introduzione di un ago molto piccolo (meno di 1 mm di calibro) attraverso la cute sotto costante visione ecografica, fino al nodulo epatico. Verificato il corretto posizionamento dell'ago nel nodulo si procede all'iniezione lenta di piccole quantità di alcool puro (1-10 ml) che distrugge le cellule tumorali. Questa tecnica consente di ottenere la necrosi totale dei noduli tumorali nel 70%-75 % dei casi di tumori a singole cellule ma

solo del 36% nel caso di tumori a multifocali<sup>156</sup>, inoltre i costi annui basati sull'incidenza di HCC trattabili con PEI, si aggirerebbero intorno a cifre non indifferenti di circa 2 miliardi.

Un'altra tecnica adoperata è l'*ipertermia interstiziale*, che consiste in una tecnica endoscopica ecoguidata che sfrutta l'abbassamento della soglia di sopportazione termica delle cellule tumorali rispetto a quelle sane. Possono essere impiegate delle sonde basate su impulsi a radiofrequenze, su impulsi a microonde o su frequenze laser che, in ogni caso, sono in grado di aumentare la temperatura in maniera molto precisa. Questa tecnica consente di eliminare i focolai tumorali in maniera relativamente poco invasiva, ma studi di follow-up hanno dimostrato che, nella maggior parte dei casi (41%), i pazienti trattati vanno incontro alla comparsa di recidive (recidive locali nel 5% dei casi e nuove lesioni nel 36% dei casi)<sup>157</sup>.

La *chemioembolizzazione arteriosa transcatetere* è un trattamento che combina l'azione antineoplastica di un chemioterapico iniettato direttamente nell'arteria epatica, con l'effetto ischemico determinato dalla embolizzazione arteriosa dell'arteria afferente al tumore. L'effetto ischemico colpisce selettivamente la lesione neoplastica poiché questa, a differenza del parenchima epatico, è quasi esclusivamente vascolarizzata da una arteria. Il trattamento di chemioembolizzazione può essere esteso a tutto il parenchima epatico (o ad un intero lobo), iniettando farmaco e agente embolizzante in corrispondenza del ramo destro e/o sinistro dell'arteria epatica (*chemioembolizzazione convenzionale*), o limitato ad un singolo segmento o subsegmento epatico mediante cateterismo superselettivo della diramazione arteriosa afferente alla neoplasia, (*chemioembolizzazione segmentaria*). Le due procedure hanno

indicazioni, efficacia e tollerabilità diverse. Un alto limite all'analisi dei risultati della chemioembolizzazione è rappresentato dalla estrema diversità tra i vari studi, relativa alla scelta del farmaco antiproliferativo, dell'agente embolizzante e del numero di trattamenti effettuati nel singolo paziente<sup>158-161</sup>. Inoltre tale intervento può determinare un peggioramento degli indici di funzionalità epatica spesso associato ad effetti collaterali minori quali dolore addominale, febbre, nausea e vomito o condurre ad uno scompenso epatico anche fatale.

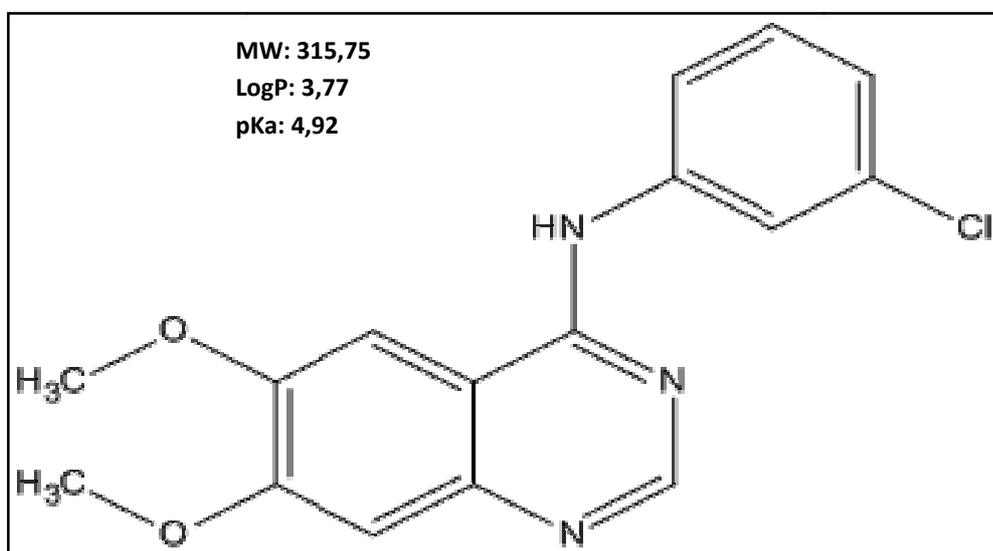
A fronte delle tecniche all'avanguardia appena citate, la terapia migliore di cui si può attualmente disporre sembra essere la chirurgia che prevede la resezione della parte di organo invasa dalla massa tumorale. Grazie all'elevatissima capacità rigenerativa del tessuto epatico, infatti, è possibile asportare fino al 70% del tessuto epatico. Recenti progressi nell'ambito della chirurgia epatica, come l'embolizzazione portale preoperatoria, hanno permesso di estendere i limiti delle epatectomie, rendendo operabili tumori per i quali la resezione era controindicata fino ad alcuni anni fa<sup>162</sup>. Restano in ogni caso una controindicazione alla chirurgia la presenza di metastasi extraepatiche o la diffusione intraepatica a noduli multipli. La cirrosi epatica, presente nel 90% dei pazienti con epatocarcinomi, costituisce il limite maggiore alla chirurgia resettiva, sia per la ridotta capacità rigenerativa del fegato cirrotico, sia per l'alterazione della riserva funzionale epatica.

In questo contesto, un approccio alternativo che potrebbe rappresentare innumerevoli vantaggi nei confronti delle terapie attuali, potrebbe essere costituito dalla somministrazione di formulazioni farmaceutiche basate su nanostrutture lipidiche caricate con principi attivi a spiccata attività antitumorale. Ciò permetterebbe di aggirare gli

aspetti negativi correlati all'invasività delle attuali terapie chirurgiche ed ai costi elevati delle terapie laparoscopiche.

### 3.1.3 NLC CARICATE CON TYRPHOSTIN AG1478

Tyrphostin AG1478 [N(3-Clorofenil)-6,7-dimetossi-4-chinazolinammina] è caratterizzata da una struttura chinazolinica con gruppi elettron-attrattori in posizione 6 e 7 ed un alogeno in posizione 3 dell'anilina (fig. 42).



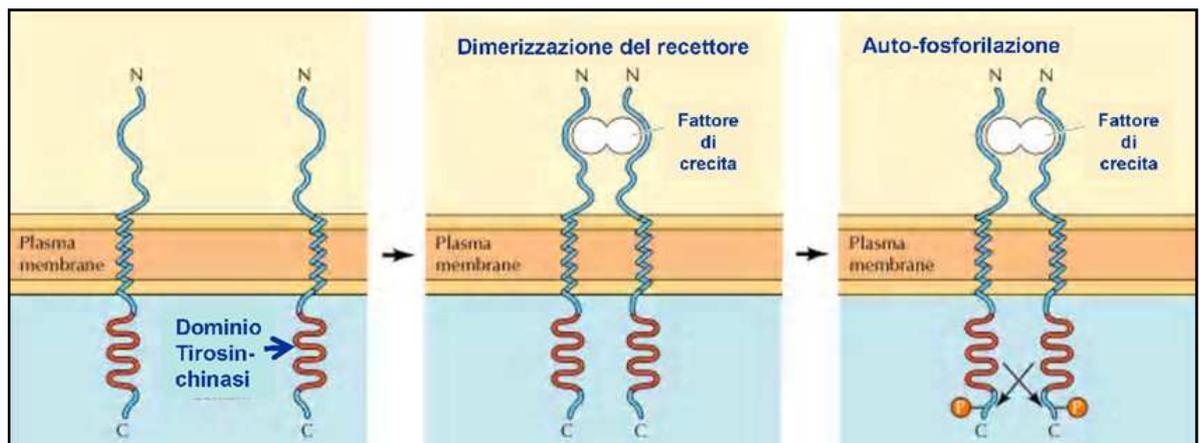
**Figura 42:** Struttura e caratteristiche chimico-fisiche di Tyrphostin AG1478

Essa possiede una spiccata attività antitumorale in quanto è un potente inibitore della *tirosinchinasi* associata al pathway correlato all'attivazione del *recettore EGFR* (*epidermal growth factor receptor*). Tale recettore si configura come un proto-oncogene a monte di una valle molto numerosa di possibili bersagli patogenetici la cui alterazione può portare ad una crescita cellulare aberrante e

incontrollata. Il recettore EGFR, infatti, fa parte dei recettori ad attività tirosin-chinasica intrinseca e possiede una struttura di base costituita da una singola catena polipeptidica che attraversa la membrana plasmatica. Tali recettori sono organizzati in diversi domini funzionali:

- il ***dominio extracellulare*** comprende il sito di legame per il fattore di crescita e presenta diverse combinazioni di motivi strutturali, rappresentando la parte più variabile del recettore.
- il ***dominio transmembrana*** è costituito da circa 25 amminoacidi idrofobici che attraversano il doppio strato lipidico e funge da connessione tra il dominio extracellulare e quello intracellulare.
- il ***dominio iuxtamembrana***, comprende una cinquantina di amminoacidi, separa il dominio transmembrana da quello catalitico, ed è sede di importanti funzioni regolatorie. Questa regione è presente in tutti recettori appartenenti alla stessa sottofamiglia, ed è coinvolta nella modulazione della trasduzione del segnale da parte di segnali extrarecettoriali.
- il ***dominio catalitico***, responsabile dell'attività tirosin-chinasica, è formato da 250 amminoacidi e ha un'elevata omologia fra tutti i recettori per fattori di crescita.
- la ***coda C-terminale*** ha lunghezza e funzioni variabili e rappresenta il segmento che, nel recettore attivato, lega i trasduttori intracellulari del segnale.

Il ligando fisiologico per il recettore EGFR è rappresentato dal *fattore di crescita epidermico* (EGF), anche se spesso possono fungere da ligandi anche altre proteine (TNF- $\alpha$ , ecc...). Il legame tra EGF ed il recettore determina un cambiamento conformazionale del dominio extracellulare che promuove il processo di omo-dimerizzazione del recettore che passa così da uno stato quiescente ad uno stato attivo. A questa attivazione segue un processo di transfosforilazione (*autofosforilazione*) a livello dei residui tirosinici che conduce alla formazione di siti di ancoraggio specifici che vengono riconosciuti dai trasduttori dei segnali intracellulari (fig. 43).



**Figura 43:** Processo di attivazione di EGFR in seguito all'interazione con EGF

Il recettore attivato lega la *fosfolipasi C* che, a partire dal *fosfatidilinositolo bifosfato* (*PIP2*), porta alla formazione di *diacilglicerolo* (*DAG*) e *inositolo trifosfato* (*IP3*). Il primo è confinato nella membrana, dove attiva una proteina chinasi definita *proteinchinasi C* sensibile ai fosfolipidi e al calcio. L'altro messaggero, *IP3*, è

idrosolubile e diffonde attraverso il citoplasma, dove regola il rilascio di calcio da parte del reticolo endoplasmatico<sup>163</sup>. In alternativa, il recettore attivato può legare il dominio *SH2* della *proteina adattatrice Grb2*, che svolge il suo ruolo senza essere fosforilata. Il suo dominio *SH2* si lega alla *proteina SOS* attivandola, senza che ci siano reazioni di fosforilazione. Il complesso Grb2-SOS attivato stimola l'attivazione della proteina *Ras* che funziona come interruttore cellulare, alternando uno stato attivo in cui è legato al GTP, ad uno stato inattivo in cui è legato al GDP. Poiché *Ras* è molto più affine per il GDP che al GTP, il complesso inattivo Ras-GDP è quello che prevale e si accumula nella cellula. L'attivazione recettoriale genera un aumento della produzione del complesso Ras-GTP ed a ciò consegue l'attivazione delle MAP chinasi che possono determinare innumerevoli risposte cellulari. La MAP chinasi attiva passa dal citosol al nucleo, dove può fosforilare diversi substrati. Tra di essi i più importanti sono i fattori di trascrizione che consentono la produzione di nuovi mRNA che codificano per proteine coinvolte nella replicazione cellulare (fig. 44).

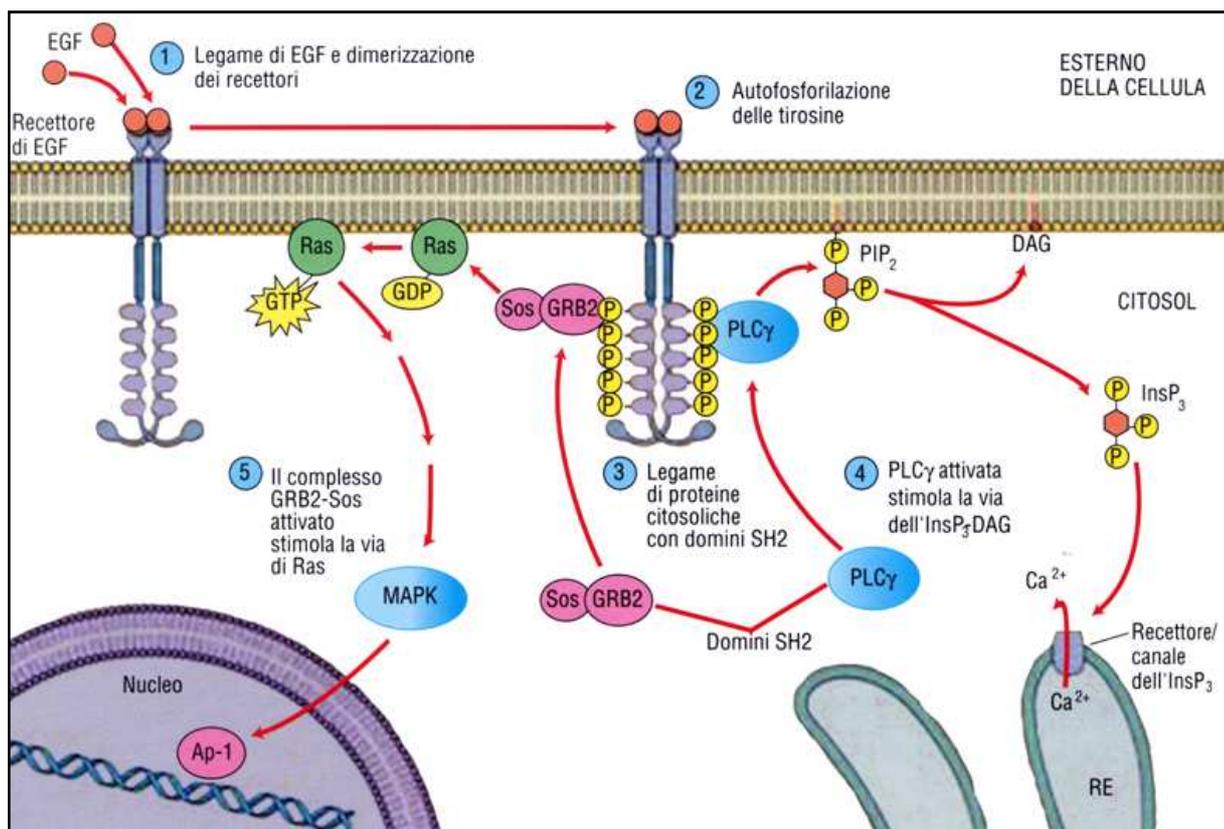
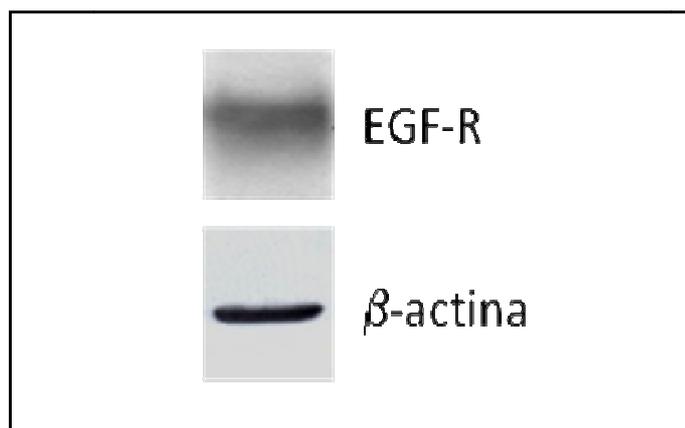


Figura 44: Pathway conseguente dall'attivazione di EGFR

Alcuni studi su linee cellulari di tumori epatici hanno dimostrato tramite *western blotting* che EGFR è sovraespresso in molti casi di HCC e questa espressione è correlata soprattutto all'aumento della proliferazione cellulare ed al grado di differenziazione tumorale<sup>164, 165</sup> (fig. 45).



**Figura 45:** Western blotting su linee cellulari HA22T/VGH che evidenzia l'espressione di EGFR

Vista l'importanza di EGFR nello sviluppo di forme tumorali è chiaro che l'impiego di Tyrphostin ha come fine ultimo l'inibizione della sua funzione, determinando un'inibizione della crescita e della progressione delle neoplasie che lo esprimono. Sulla base della struttura e della funzione dell'EGFR, recentemente sono state sviluppate due differenti strategie terapeutiche. Una strategia utilizza degli anticorpi monoclonali che colpiscono il dominio extracellulare del recettore, bloccando così il sito di legame con EGF con conseguente inibizione dei processi di crescita incontrollata. Una seconda strategia prevede il blocco intracellulare di EGFR mediante impiego di molecole in grado di legarsi alla tirosin chinasi del recettore, che è l'enzima responsabile della trasduzione del segnale post-recettoriale all'interno della cellula. Tyrphostin agisce proprio secondo quest'ultimo meccanismo, inattivando la tirosin-chinasi e bloccando il pathway biochimico che ne consegue.

Il lavoro sperimentale che riguarda questo contesto ha previsto la realizzazione di diversi carrier lipidici nanostrutturati (NLC) sia vuoti

che caricati con Tirfostina AG 1478 utilizzando la tecnica della precipitazione, ottenendo così dei nanosistemi tecnologicamente avanzati in grado di incorporare buone quantità di farmaco. Tali sistemi sono stati successivamente caratterizzati sia da un punto di vista chimico-fisico che tecnologico-farmaceutico determinando le dimensioni delle nanoparticelle, i valori di potenziale zeta, le percentuali di capacità di carico e le cinetiche di rilascio del principio attivo dalla matrice lipidica. In particolare le cinetiche di rilascio sono state determinate mediante studi in vitro in condizioni sperimentali che mimano i fluidi biologici. Infine l'attività del composto è stata valutata, sia in forma free che in forma veicolata, attraverso studi di citotossicità in vitro su cellule *HA22T/VGH*, una linea cellulare di carcinoma epatico umano.

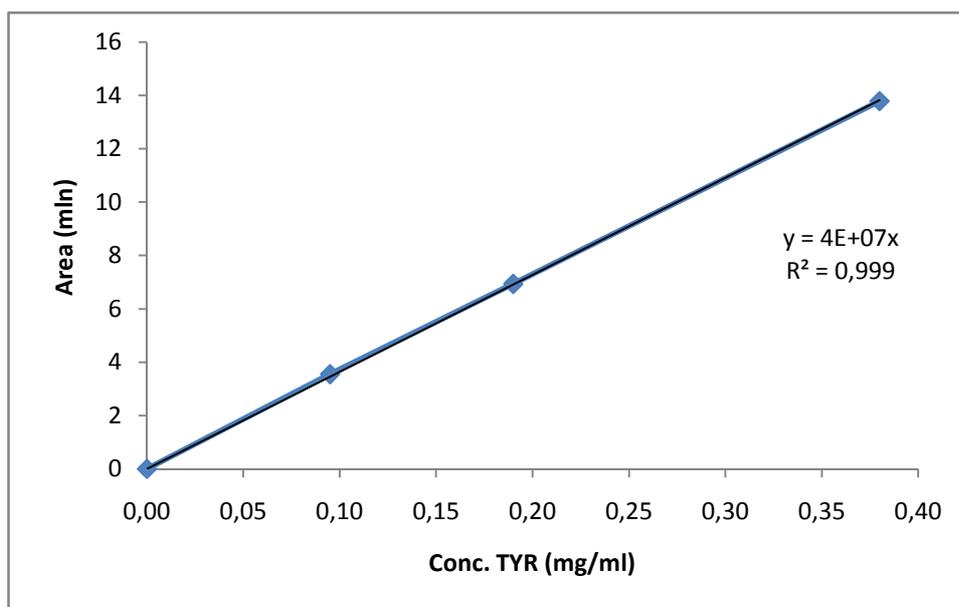
I materiali impiegati per la preparazione delle matrici solide delle NLC sono di origine lipidica solida o liquida totalmente biocompatibili ed atossici (Tab. 2). Il *Compritol 888 ATO* è una miscela di mono-, di- e trigliceridi dell'acido beenico, un acido carbossilico a 22 unità carboniose interconnesse da legami saturi. Esso è comunemente impiegato nella formulazione di prodotti cosmetici di uso comune ed è caratterizzato da una  $DL_{50}$  di 2000 mg/kg. Il *Compritol HD5 ATO* rappresenta la corrispondente forma PEGhilata del *Compritol 888 ATO* caratterizzata dalla presenza di otto unità poliossietileniche. La *Tripalmitina* è un trigliceride dell'acido palmitico, un acido grasso saturo contenuto nell'olio di palma ed in numerosi latticini. Il *Captex* è una miscela liquida di mono-, di- e trigliceridi degli acidi caproico e caprilico, acidi grassi saturi costituiti rispettivamente da sei e otto unità monocarboniose. L'*Acconon* è il corrispondente PEGhilato del *Captex* con sei unità di poliossimetilene.

Il *modus operandi* di questo lavoro è stato quello di preparare dei sistemi con matrici lipidiche simili con la sola differenza rappresentata dalla presenza del PEG. Questa differenziazione è stata operata per determinare eventuali differenze in termini di caricamento di farmaco, di cinetiche di rilascio e di tossicità cellulare. Come si evince dai valori riportati in tabella 1 è stata riscontrata una notevole differenza in termini di LC% e di EE% (*entrapment efficiency*) tra i sistemi basati su Compritol e quelli basati su Tripalmitina. Nel secondo caso, infatti, la presenza di lipidi liquidi determina la formazione di nanocompartimenti oleosi con la formazione di NLC di tipo multiplo che sono in grado di incorporare al meglio il principio attivo.

SISTEMA	MATRICE LIPIDICA	LC (%)	E.E.(%)
NLC C <sub>1</sub> vuote	Compritol 888 ATO 58.4%		
NLC C <sub>1</sub> piene	Compritol 888 ATO 58.4%	2.8	28
NLC D <sub>1</sub> vuote	Compritol HD5ATO 58.4%		
NLC D <sub>1</sub> piene	Compritol HD5ATO 58.4%	1.7	17
NLC V <sub>3</sub> vuote	Tripalmitina 39.1% Captex 50.9%		
NLC V <sub>3</sub> piene	Tripalmitina 39.1% Captex 11.7%	24	70
NLC V <sub>5</sub> vuote	Tripalmitina 39.1% Acconon 11.7%		
NLC V <sub>5</sub> piene	Tripalmitina 39.1% Acconon 11.7%	24	70

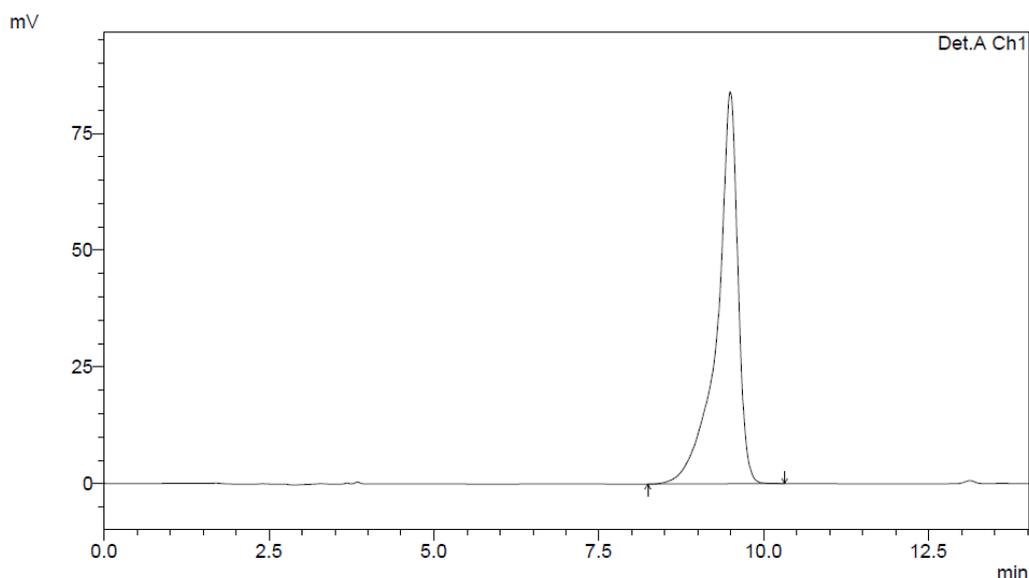
**Tabella 2:** Tabella riassuntiva delle preparazioni per la veicolazione di Tyrphostin AG1478

Tutte le preparazioni, una volta ottenute le nanoparticelle in sospensione colloidale, sono state purificate tramite dialisi esaustiva contro acqua impiegando tubi da dialisi con cut-off di 12.000÷14.000 Da al fine di eliminare eventuali residui di tensioattivi adsorbiti sulla superficie e sottoposte a processo di freeze-drying per favorirne la stabilità in fase di stoccaggio. La quantità di principio attivo caricata è stata determinata tramite analisi cromatografica via HPLC previa costruzione di una curva di taratura basata su standard a concentrazione nota (fig. 46).



**Figura 46:** Curva di taratura di Tyrphostin AG1478

Questo ha garantito una “visibilità” cromatografica ottimale del picco relativo a Tyrphostin (fig. 47) AG1478 che ha consentito un accurata determinazione della LC%.



**Figura 47:** Cromatogramma HPLC relativo a Tyrphostin AG1478

La determinazione tramite PCS delle dimensioni dei sistemi ha confermato la loro classificazione come nanosistemi, in quanto le misure hanno restituito valori compresi tra 60 e 210 nm e questo si traduce in un potenziale accumulo nei tessuti tumorali per il già citato effetto EPR. Gli studi sono stati condotti in tre mezzi disperdenti allo scopo di determinare eventuali variazioni del raggio idrodinamico al variare della concentrazione salina e/o dei valori di pH. Effettivamente le misure in soluzione fisiologica di NaCl 0,9 % v/v hanno dimostrato come ci sia una modificazione dell'intorno ionico con un conseguente aumento delle dimensioni. Variazioni di pH, determinate misurando le dimensioni in tampone fosfato a pH 7.4, invece, hanno lasciato le dimensioni sostanzialmente invariate (tranne in pochi casi) (tab.3).

<i>NLC</i>	Size in H <sub>2</sub> O (nm)	PDI	Size in NaCl 0,9% v/v (nm)	PDI	Size PBS pH 7.4 (nm)	PDI
<b>C<sub>1</sub> vuote</b>	139.7	0.379	146.2	0.427	122.1	0.587
<b>C<sub>1</sub> piene</b>	76.2	0.413	207.2	0.895	145.6	0.790
<b>D<sub>1</sub> vuote</b>	62.4	0.459	120.3	0.751	106.9	0.757
<b>D<sub>1</sub> piene</b>	80.7	0.493	108.4	0.491	180.1	0.578
<b>V<sub>3</sub> vuote</b>	175.9	0.343	129.2	0.331	117.9	0.406
<b>V<sub>3</sub> piene</b>	209.7	0.458	203.7	0.217	248.1	0.289
<b>V<sub>5</sub> vuote</b>	185.5	0.293	125.6	0.280	143.8	0.251
<b>V<sub>5</sub> piene</b>	189.3	0.415	248.1	0.648	181.5	0.523

**Tabella 3:** Analisi dimensionali tramite PCS nei diversi mezzi disperdenti

L'analisi del potenziale  $\zeta$  ha restituito valori che hanno un andamento leggermente diverso rispetto a quello appena descritto per le dimensioni in quanto, come poteva essere prevedibile, i sistemi risentono in maniera più marcata sia della variazione della concentrazione salina che della variazione di pH. In ogni caso i dati ottenuti (tab. 4) sono sempre compresi tra -9mV e -47 mV, valori che assicurano un'elevata stabilità dei sistemi ottenuti.

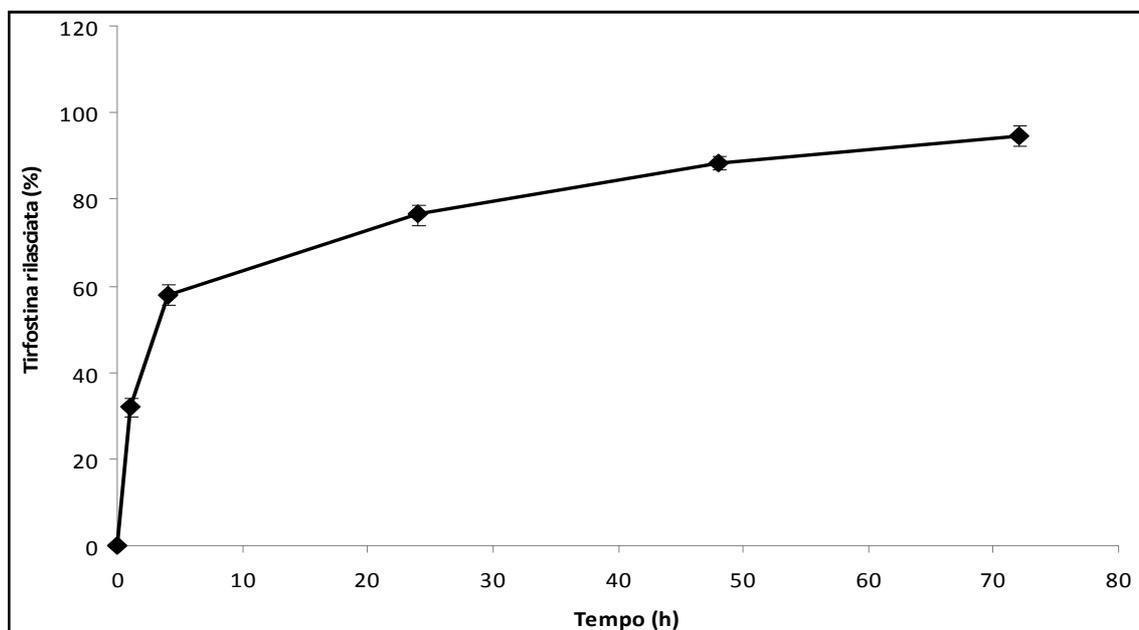
<i>NLC</i>	<i>Potenziale zeta (mV) in H2O</i>	<i>Potenziale zeta (mV) in NaCl</i>	<i>Potenziale zeta (mV) in PBS pH 7.4</i>
<b>C<sub>1</sub> vuote</b>	-20.1 ± 10.5	-12.3	-19.6
<b>C<sub>1</sub> piene</b>	-40.3 ± 7.7	-13.6	-20.4
<b>D<sub>1</sub> vuote</b>	-18.7 ± 4.6	-10.4	-15.4
<b>D<sub>1</sub> piene</b>	-28.5 ± 10.3	-13.2	-15.1
<b>V<sub>3</sub> vuote</b>	-35.7 ± 5.2	-15.9	-19.7
<b>V<sub>3</sub> piene</b>	-46.9 ± 8.4	-13.1	-19.6
<b>V<sub>5</sub> vuote</b>	-36.7 ± 5.9	-9.9	-16.6
<b>V<sub>5</sub> piene</b>	-38.4 ± 6.5	-11.4	-16.6

**Tabella 4:** Valori di potenziale  $\zeta$  dei diversi sistemi in diversi mezzi disperdenti

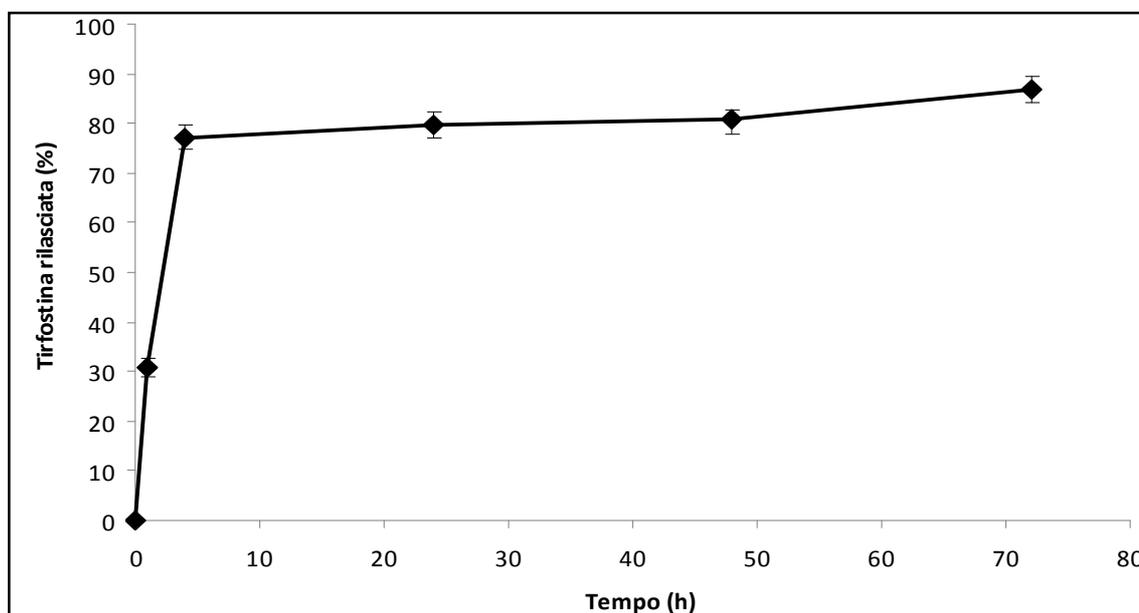
Alla luce dei risultati strumentali ottenuti, soprattutto per quanto concerne le analisi relative ai valori di LC% e di EE%, i sistemi V<sub>3</sub> e V<sub>5</sub> di tipo multiplo hanno dimostrato avere le migliori caratteristiche chimico-fisiche e per questo motivo sono stati scelti per effettuare i test di rilascio ed i saggi biologici in vitro.

Gli studi delle cinetiche di rilascio in vitro sono stati condotti in mezzo acquoso tamponato a pH 7.4 per determinare con che velocità il principio attivo riesce a diffondere attraverso la matrice lipidica e in che quantità. A questo scopo sono stati analizzati diversi campioni ad intervalli di tempo prefissati tramite analisi cromatografica HPLC ed i risultati ottenuti sono stati riportati in grafici che mostrano la

percentuale di Tyrphostin AG 1478 rilasciata in relazione al tempo (fig.48).



a)



b)

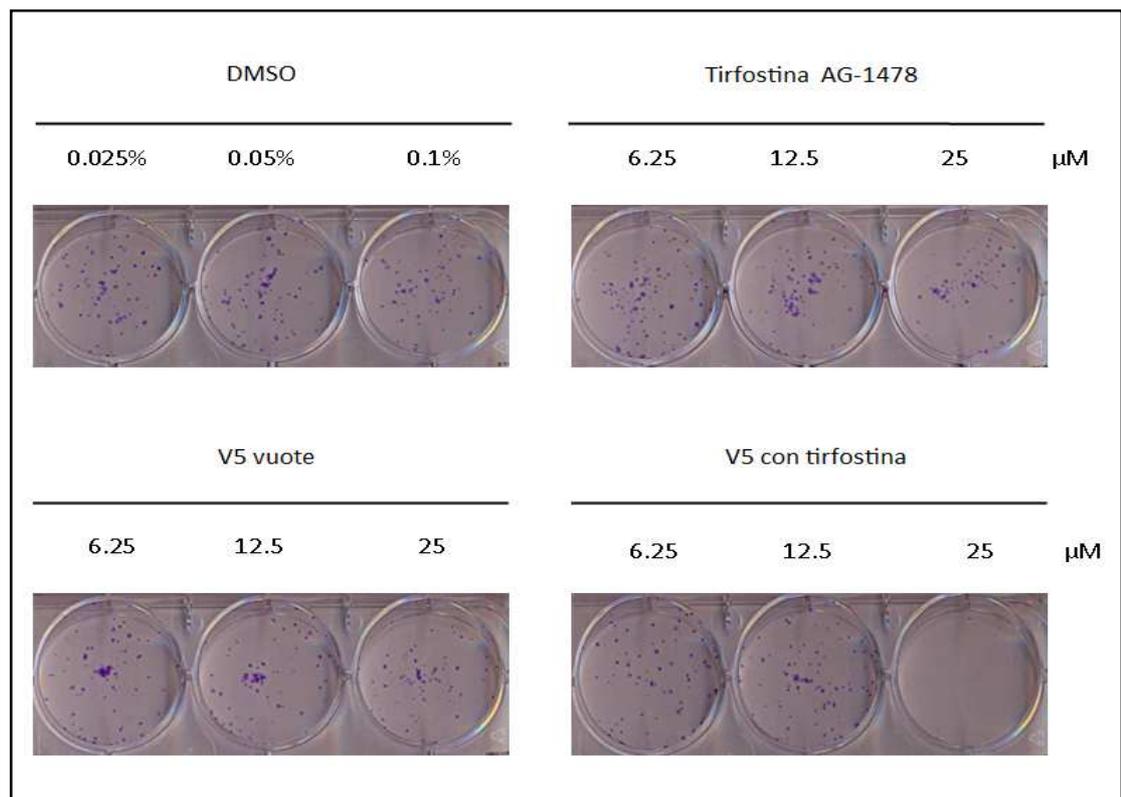
**Figura 48:** Cinetiche di rilascio di Tyrphostin AG1478 dai sistemi non PEGhilati V<sub>3</sub> (a) e PEGhilati V<sub>5</sub> (b)

I risultati ottenuti mostrano che i sistemi non PEGhilati V3 sono caratterizzati da un profilo di rilascio rapido entro le 4 ore di incubazione (60% circa di farmaco) e notevolmente più lento negli intervalli di tempi successivi fino a 72 ore di incubazione (90% circa di farmaco). Questo è probabilmente dovuto ad una piccola aliquota di Tyrphostin che, in fase di formulazione, si deposita negli strati matriciali più esterni e che determina un iniziale e breve burst release mentre, la restante parte di farmaco depositatasi nel core nanoparticellare, viene rilasciata con cinetiche più lente.

I sistemi PEGhilati V5, invece, mostrano un rilascio più rapido che determina il rilascio della quasi totalità di farmaco incorporato (circa l'80%) già entro 4 ore di incubazione in mezzo acquoso a pH 7.4. Questo è dovuto probabilmente alla natura idrofilia della matrice PEGhilata che diminuisce di fatto l'affinità del farmaco, di per sé molto lipofilo, per la matrice lipidica.

I saggi biologici sono stati condotti su linee cellulari di epatocarcinoma umano *HA22T/VGH* sensibili al cis-platino al fine di determinare se effettivamente, la veicolazione di Tyrphostin AG1478 tramite i sistemi NLC preparati, apportasse migliore nei profili di citotossicità cellulare. Per questo tipo di sistemi, visti i lenti profili di rilascio del farmaco soprattutto nel caso dei sistemi V<sub>3</sub>, è stato scelto l'impiego del *saggio clonogenico*. Precedenti saggi MTT, infatti, hanno consentito un tempo di contatto cellulare con i sistemi non superiore alle 24 h a causa della formazione di un aggregato cellulare che ne impediva la conta. Il saggio clonogenico è un test cellulare che determina la capacità di una cellula di generare nuove colonie cellulari. Il saggio viene condotto ponendo le cellule a contatto con la sostanza da testare che, dopo breve tempo (nel nostro caso 24 h),

viene rimossa. A questo punto le cellule vengono poste in terreno di coltura fresco e lasciate in condizioni di vita ottimali e, ad intervalli di tempo stabiliti, viene determinata se e in che quantità le cellule sono state in grado di generare nuove colonie. I risultati ottenuti, sia visivi (fig. 49) che strumentali (fig. 50), hanno dimostrato che le linee cellulari di HCC umano, trattate con Tyrphostin veicolata dai sistemi descritti (soprattutto i sistemi V<sub>5</sub>), avevano perso la loro capacità proliferativa rispetto a linee cellulari analoghe trattate con farmaco libero.



**Figura 49:** Saggio clonogenico dei sistemi V<sub>5</sub>-Tyrphostin AG 1478 rapportati ai corrispondenti sistemi vuoti ed a Tyrphostin AG1478 libera a diversi step di concentrazione

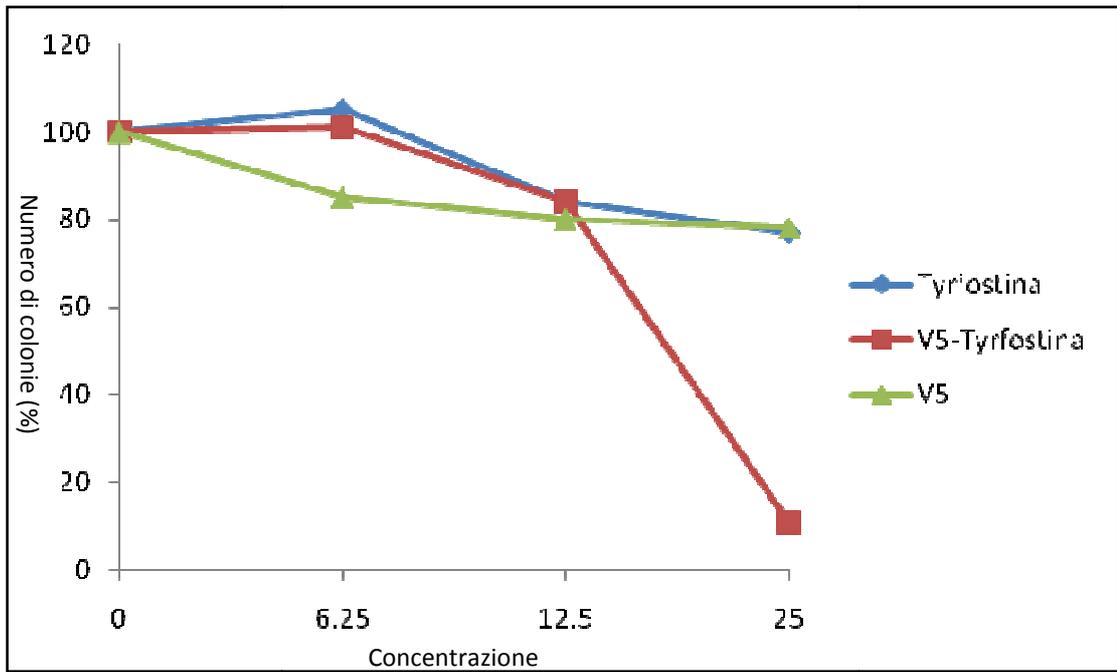
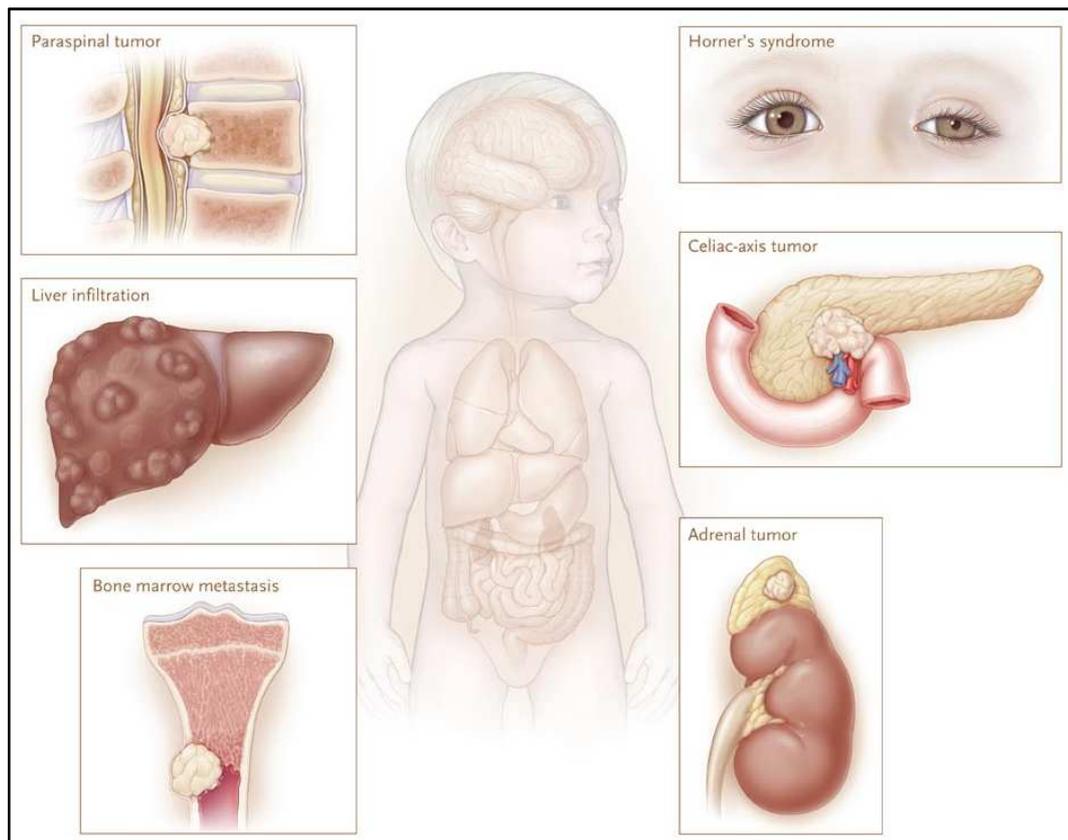


Figura 50: Rappresentazione grafica dei dati relativi al saggio clonogenico

### 3.1.4 NEUROBLASTOMI

Il Neuroblastoma si riferisce ad un gruppo di tumori maligni dei primi anni di vita originati dai residui del sistema nervoso autonomo che si sviluppa durante la vita embrionale e che colpisce le cellule nervose dei gangli simpatici. In particolare può colpire le ghiandole surrenali (presentandosi come una tumefazione addominale) e i gangli simpatici paraspinali (potendo comparire in qualsiasi tratto della colonna vertebrale: addominale e toracica) (fig. 51).



**Figura 51:** Principali sedi di diffusione dei neuroblastomi

L'incidenza complessiva nei bambini fino ai 15 anni è di 8-10 casi per milione all'anno e rappresenta il 10% di tutti i tumori maligni dei bambini che è di gran lunga il tumore più frequente nei primi 5 anni di vita con un età media alla diagnosi di circa 2 anni; inoltre più della metà dei tumori diagnosticati nel periodo neonatale (cioè nel primo mese di vita) sono Neuroblastoma. Rappresenta la terza neoplasia per frequenza nell'età pediatrica dopo le leucemie e i tumori cerebrali ed è la prima causa di morte per malattia in età prescolare. Spesso i sintomi iniziali dipendono dalla compressione che la massa tumorale esercita sugli organi vicini. Quando il tumore è palpabile, si presenta come una massa dura, fissa, a superficie irregolare non dolente nel 70% dei casi a origine addominale. Più della metà dei pazienti presenta malattia metastatica alla diagnosi, con il tumore che metastatizza principalmente allo scheletro ed al midollo. La presentazione può essere subdola e spesso i sintomi della malattia possono trarre in inganno poiché riconducibili a stati influenzali (quali pallore, anoressia, cambio d'umore, rifiuto a camminare); generalmente questi sintomi procedono di settimane o mesi la scoperta della malattia rappresentandone l'unica evidenza. Questo spiega perché la diagnosi di Neuroblastoma è così spesso ritardata, specialmente quando il tumore primitivo è di piccole dimensioni o localizzato nel retroperitoneo alto, sede molto difficile da raggiungere con l'esplorazione clinica. Il Neuroblastoma può infiltrare i forami vertebrali determinando compressione midollare: questa manifestazione della malattia è difficile da scoprire nei piccoli pazienti a meno che non si dia grande attenzione a sintomi aspecifici come irritabilità e ipotonia negli arti inferiori. In oltre in circa l'80% dei casi della malattia, il tumore produce quantità abnormi di amine

simpatiche (principalmente adrenalina e non adrenalina) che possono provocare ipertensione e che vengono evidenziate nelle urine tramite test specifici. La maggior parte dei tumori sia del bambino che dell'adulto viene classificata in stadi, in particolare il neuroblastoma è classificato in 5 stadi in base alla morfologia ed alla capacità di metastatizzare.

Nel *primo stadio (Stadio 1)* il tumore è per lo più piccolo e confinato in un'unica sede ed è possibile rimuoverlo chirurgicamente. Non ci sono metastasi in altri organi né tracce di cellule maligne ed a questo stadio la malattia non richiede una terapia postoperatoria. Nel *secondo stadio (Stadio 2)* il tumore è più esteso ma resta ancora circoscritto, tuttavia l'asportazione chirurgica lascia residui minimi che a volte riescono a raggiungere la colonna vertebrale. Inoltre alcune cellule tumorali possono penetrare nei linfonodi ed in tal caso è necessario un breve periodo di chemioterapia per ridurre al minimo il rischio di proliferazione di cellule tumorali. Nel *terzo stadio (Stadio 3)* il tumore è confinato nell'area di origine e non ci sono metastasi a distanza, ma è troppo grosso per essere asportato chirurgicamente ed in modo completo al primo intervento, per cui è indispensabile ricorrere alla chemioterapia preliminare per ridurre la massa tumorale e per poterla asportare chirurgicamente in un secondo momento. Nel *quarto stadio (Stadio 4)* il tumore ha capacità metastatizzanti, in particolar modo in distretti quali il midollo osseo, lo scheletro, il fegato, i linfonodi. In questo caso la malattia ha una notevole aggressività biologica ed necessario un intenso ed aggressivo trattamento chemioterapico. Infine, nello stadio definito *4S*, rientra una forma speciale di Neuroblastoma che insorge nei primi mesi di vita, con una particolare disseminazione che coinvolge soprattutto cute e fegato e non lo

scheletro. A questo stadio la malattia può regredire completamente in modo spontaneo e, solo in alcuni casi, può essere necessario un breve ciclo di chemioterapia. Il tumore primitivo, spesso piccolo, può essere asportato subito oppure dopo che le lesioni metastatiche siano almeno parzialmente regredite. Il trattamento di elezione dei neuroblastomi, come nella maggior parte delle patologie in ambito oncologico, è rappresentato dalla chirurgia che consente l'asportazione totale o parziale della massa tumorale. Quando ci sono le condizioni tali da permettere la completa asportazione si parla di un intervento radicale, che diventa terapia unica e sufficiente nei casi in cui non sono presenti lesioni metastatiche e lo studio biologico del tumore asportato dà risultati favorevoli. In alcuni casi, invece, l'intervento si limita all'asportazione di parte della neoplasia o solo di un suo piccolo frammento ed in questo caso si parla di biopsia. A volte un intervento di biopsia viene deciso per motivi diagnostici o per valutazione pre- o intraoperatoria dell'impossibilità di asportare la massa per intero. Altre volte ancora l'intervento chirurgico viene programmato in un momento successivo alla diagnosi e dopo alcuni cicli di chemioterapia aventi lo scopo di ridurre la massa tumorale (terzo stadio). Questa, a volte, non può essere asportata perché in rapporto troppo stretto con organi vitali (chirurgia differita) e la terapia ha proprio l'obiettivo di ridurla e rendere possibile l'operazione riducendo il più possibile i rischi per il paziente. La chirurgia tende a risparmiare menomazioni, tuttavia a volte si preferisce sacrificare un rene per rendere l'intervento radicale poiché il vantaggio a livello prognostico e terapeutico supera lo svantaggio della menomazione stessa. Quando non sussistono condizioni tali da permettere l'intervento chirurgico, la massa tumorale viene aggredita tramite

l'impiego di diverse tecniche. La *radioterapia* è una metodica attraverso la quale si eliminano le cellule tumorali con la somministrazione di radiazioni. Un intervento radioterapico tipico nel trattamento del neuroblastoma si attua attraverso la somministrazione endovenosa di un isotopo radioattivo ( $^{133}\text{I}$ ) coniugato ad un veicolo "selettivo" (guanidina - MIBG). In questo modo si cerca di colpire solo le cellule tumorali risparmiando la maggior parte di tessuto sano circostante. Questo tipo di radio terapia, tuttavia, richiede una particolare attenzione: viene eseguita in speciali stanze del reparto di medicina nucleare in cui il paziente resta in isolamento per alcuni giorni dopo il trattamento. Inoltre occorre un terapia orale di mantenimento a base di Iodio per evitare che la tiroide capti  $^{133}\text{I}$  generando importanti disfunzioni metaboliche.

La *chemioterapia* si basa sulla somministrazione endovenosa di farmaci antiblastici che agiscono con meccanismi citotossici colpendo, però, anche cellule sane come quelle del sangue e della mucosa gastrointestinale. Per questo la chemioterapia ha in genere una durata limitata nel tempo e, spesso, un dosaggio non troppo elevato quando si deve aggredire un neuroblastoma che colpisce un organismo di un soggetto molto giovane. Quando ciò non è possibile, perché la neoplasia è troppo sviluppata o vi sono metastasi, l'atteggiamento terapeutico, utilizzato pressoché da tutti, è quello di somministrare farmaci antiblastici in dosi importanti per un breve periodo (tre-quattro mesi), allo scopo di ridurre il più possibile la diffusione della malattia.

Poi, dopo aver ridotto al minimo possibile con tutte le armi terapeutiche il tumore primitivo e le metastasi e dopo l'accurata

esecuzione di molte indagini volte ad evidenziare nel modo più preciso

la quantità di tumore residuo, si usa somministrare dosi molto forti di farmaci antitumorali (megaterapia), eventualmente associate a radioterapia con MIBG terapeutica. Tuttavia la chemioterapia rappresenta senza dubbio un trattamento molto invasivo e spesso, per superarne gli effetti tossici, si rende necessario un autotrapianto di cellule staminali emopoietiche prelevate dal sangue in precedenti cicli di chemioterapia.

### 3.1.5 NLC CARICATE CON CURCUMINO

Un trattamento alternativo dei neuroblastomi può essere costituito dalla somministrazione endovenosa di sistemi nanoparticellari solidi, caratterizzati dalle già citate peculiarità chimico-fisiche che ne consentono un rapido e selettivo accumulo nel tessuto tumorale (effetto EPR) e che garantiscono una protezione del principio attivo nei confronti degli ambienti fisiologici ostili, aumentando di fatto la biodisponibilità del principio attivo stesso.

Il *curcumino* [(1E,6E)-1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-epta-1,6-dien-3,5-dione] (fig. 52), è un polifenolo di origine naturale estratto dal rizoma della *curcuma longa* con comprovate attività farmacologiche antiossidanti, antiinfiammatorie ed antitumorali. La sua applicazione clinica, tuttavia, è limitata a causa della sua bassa solubilità nei mezzi acquosi che ne rende difficile l'assorbimento e la conseguente biodisponibilità<sup>166-168</sup>.

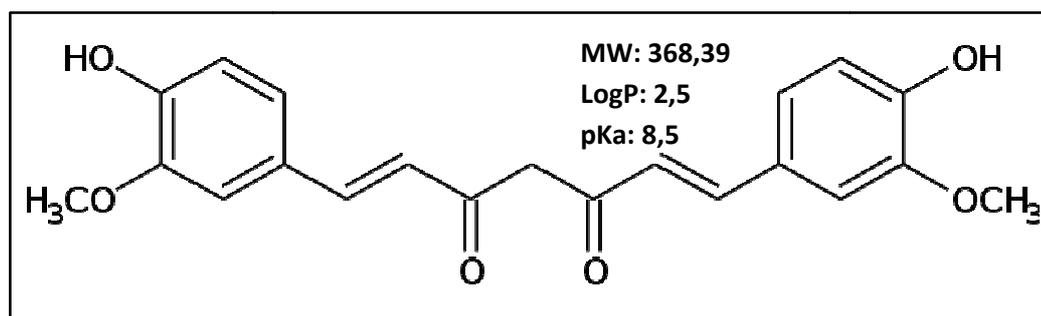
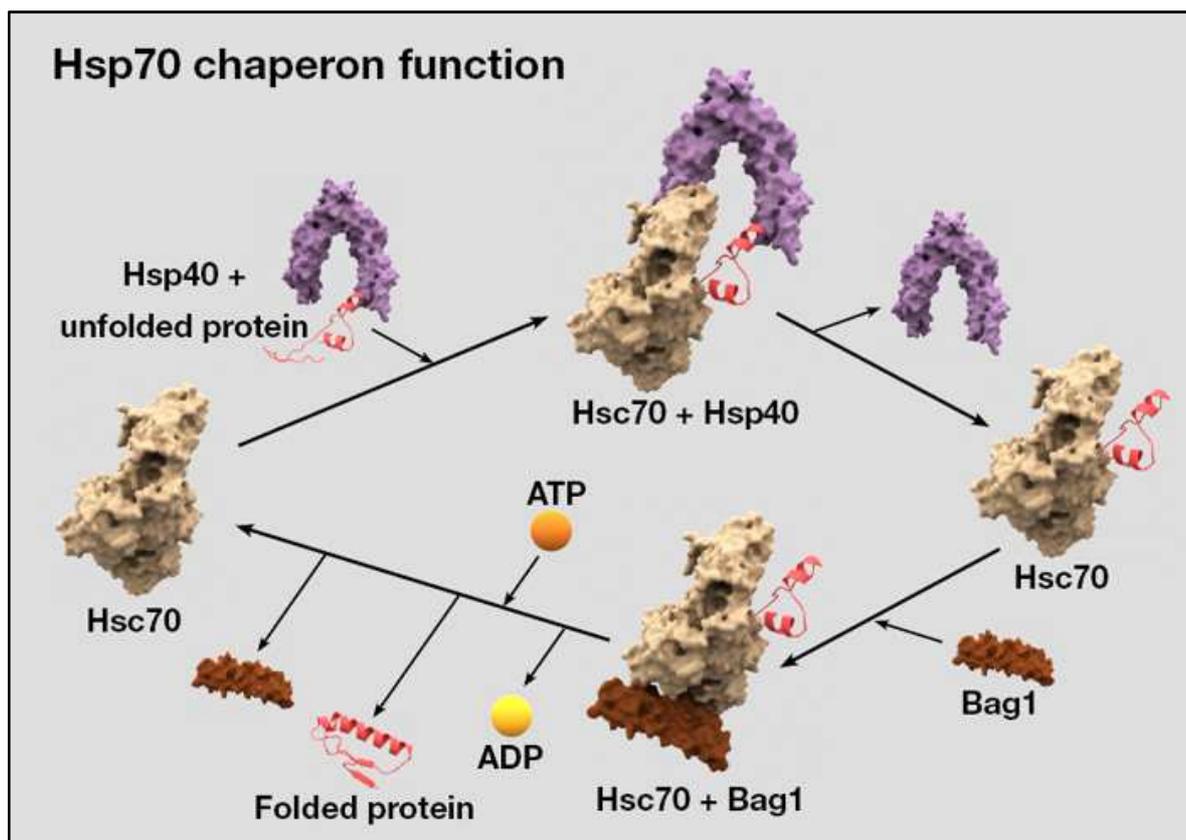


Figura 52: Struttura e caratteristiche chimico-fisiche del curcumino

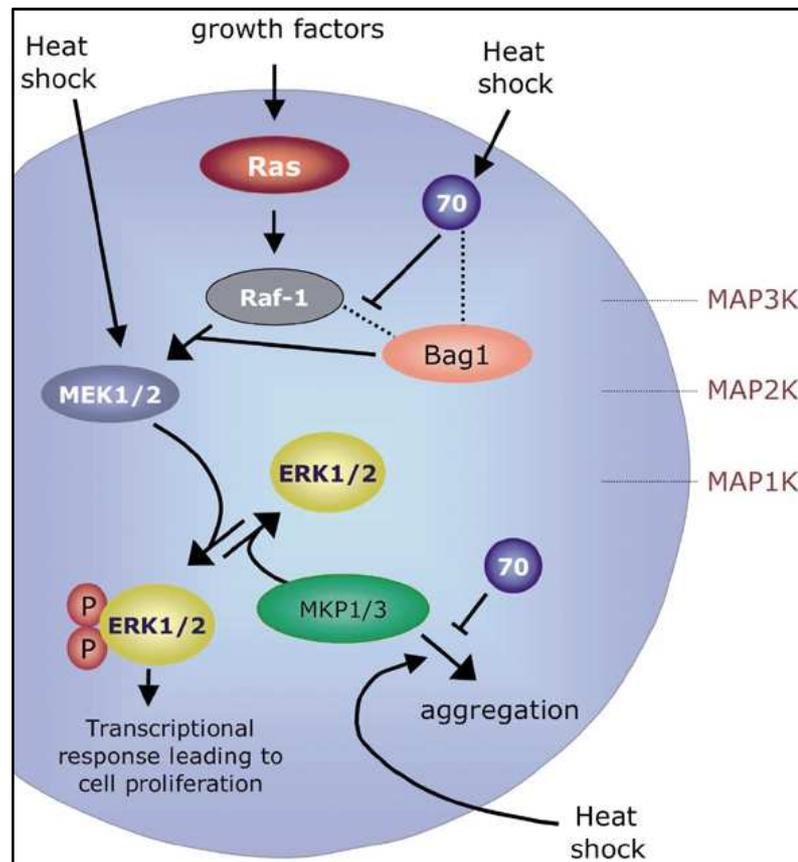
Il focus di questo lavoro scientifico è stato quello di sfruttare le potenzialità antitumorali del curcumino ed abbattere il più possibile gli aspetti negativi che lo caratterizzano attraverso la progettazione e la preparazione di carriers lipidici. Molti studi dimostrano che l'attività antitumorale del curcumino è legata ad un meccanismo biochimico che regola il ciclo vitale cellulare correlato all'espressione di particolari proteine definite *Hsp70 (Heat Shock Protein)*<sup>169</sup>. Queste proteine appartengono alla classe degli *chaperones molecolari*, una classe di famiglie proteiche la cui funzione predominante è quella di prevenire l'aggregazione di catene polipeptidiche non ripiegate e di promuoverne il ripiegamento (*foldings*) secondo i criteri corretti. Esse agiscono sia in condizioni fisiologiche che in condizioni di stress e devono il loro nome ad uno studio sulle condizioni di stress cellulare risalente agli inizi degli anni sessanta. In questo studio è stato osservato il comportamento delle ghiandole salivari di *Drosophila Melanogaster* a temperature leggermente al di sopra di quelle fisiologiche ed è stata notata la formazione di rigonfiamenti localizzati dei cromosomi politenici. Tale evidenza suggeriva uno specifico cambio di espressione genica con la trascrizione di geni codificanti per particolari proteine, definite per questo heat shock protein. In particolare le Hsp 70, dove il numero sta ad indicare il peso molecolare espresso in kDa, si ritrovano in tutte le specie e la loro funzione principale è quella di favorire l'assemblaggio di complessi multimerici proteici e di facilitare il folding proteico intracellulare (fig. 53)<sup>170</sup>.



**Figura 53:** Funzione principale delle Hsp70 coadiuvate da altri componenti cellulari

Tuttavia le Hsp70 sono coinvolte in altri meccanismi biochimici importanti, tra cui quello che è responsabile della regolazione del ciclo vitale cellulare attraverso l'attivazione di particolari fattori antiapoptotici. Più nel dettaglio questi meccanismi vedono coinvolto un fattore proteico definito *BAG-1* (Bcl-2-interacting protein) che attiva l'enzima *Raf-1 chinasi*<sup>171</sup>, responsabile della fosforilazione del fattore *Raf*. Il fattore *Raf* attivato è responsabile dell'attivazione di un terzo fattore denominato *ERK* (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) che promuove la sintesi di *Bcl-2*, un potente fattore anti-apoptotico<sup>172</sup> (fig. 54). Le Hsp70 inibiscono l'attivazione enzimatica di *Raf-1* chinasi mediata da *BAG-1*, inibendo a monte il pathway biochimico

appena descritto e, di conseguenza, promuovendo l'apoptosi cellulare<sup>173</sup>.



**Figura 54:** Pathway biochimico mediato da Hsp70

Per la veicolazione del curcumino sono stati progettati e preparati tre diversi sistemi caratterizzati da matrici lipidiche differenti. I sistemi *NLC-a* e *NLC-b* sono costituiti da una matrice lipidica a base di *IMWITOR 900*, una miscela di mono- e di gliceridi dell'acido stearico e palmitico. I sistemi *NLC-c* e *NLC-d*, invece, sono costituiti da *COMPRITOL 888 ATO*, una miscela di mono-, di- e trigliceridi

dell'acido beenico, un acido carbossilico a 22 unità carboniose interconnesse da legami saturi. I sistemi *NLC-e* e *NLC-f*, infine, sono costituiti da una matrice lipidica a base di *PRECIROL ATO*, una miscela di tripalmitina e tristearina. Ogni sistema è stato preparato con e senza farmaco allo scopo di definire eventuali modificazioni chimico-fisiche e per escludere una eventuale citotossicità data dalla sola matrice lipidica. Tutti i sistemi sono stati tecnologicamente stabilizzati tramite l'uso di Epikuron 200 e Taurocolato di sodio come tensioattivo e cotensioattivo rispettivamente. Per le preparazioni è stata usata la tecnica della precipitazione che prevede l'impiego dei lipidi a temperature di fusione ai quali viene aggiunto il principio attivo da caricare ed il tensioattivo. Questa soluzione lipidica calda viene poi dispersa in una soluzione acquosa fredda contenente il cotensioattivo e, dopo purificazione tramite dialisi esaustiva contro acqua, le nanoparticelle così ottenute sono state caratterizzate in termini di size, potenziale  $\zeta$ , indice di polidispersità (PDI) e loading capacity (LC%). I dati ottenuti dopo l'analisi dimensionale hanno confermato che tutti i sistemi, sia quelli carichi di farmaco che quelli vuoti, rientrano nel range della scala nanometrica essendo compresi tra i 105 nm ed i 135 nm (tab. 5). Inoltre tutti i sistemi possiedono bassi valori di PDI, il che sta ad indicare un'ottimale omogeneità dimensionale. Questa omogeneità, insieme alle dimensioni ridotte, rendono possibile la somministrazione attraverso qualunque via, anche tramite via endovenosa.

Sample	Lipid Matrix Composition	Mean Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV±S.D.)	LC% (w/w)
NLC-a	Imwitor	135.15	0.32	-24.1±1.5	21.1
NLC-b	Imwitor	127.23	0.31	-21.2±1.8	---
NLC-c	Compritol 888 ATO	110.42	0.26	-27.3±2.1	25.3
NLC-d	Compritol 888 ATO	105.15	0.28	-24.3±2.3	---
NLC-e	Precirol ATO	129.62	0.31	-21.5±2.0	27.4
NLC-f	Precirol ATO	117.14	0.26	-18.4±1.9	---

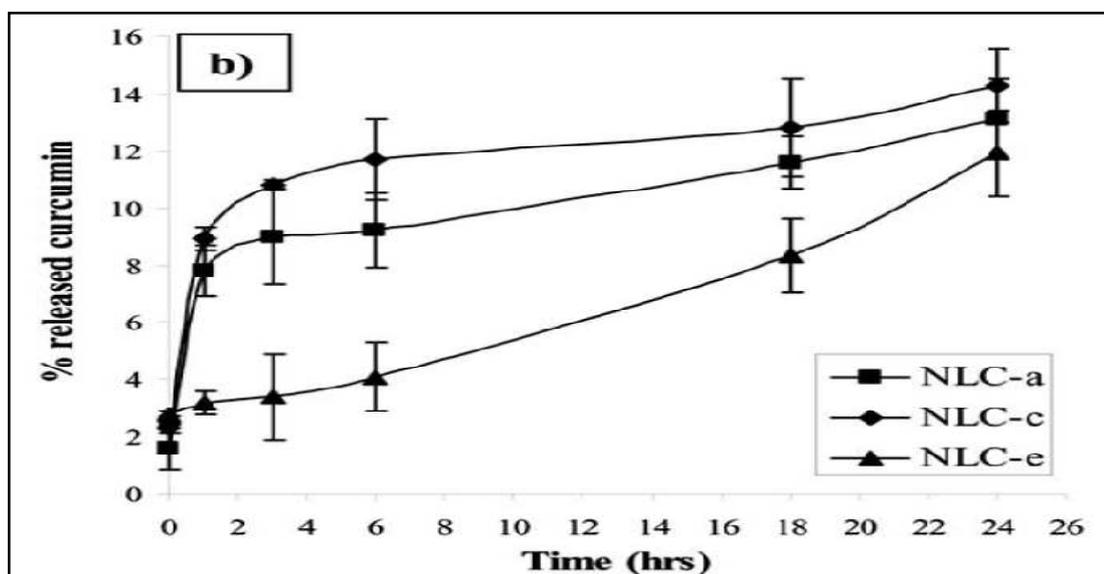
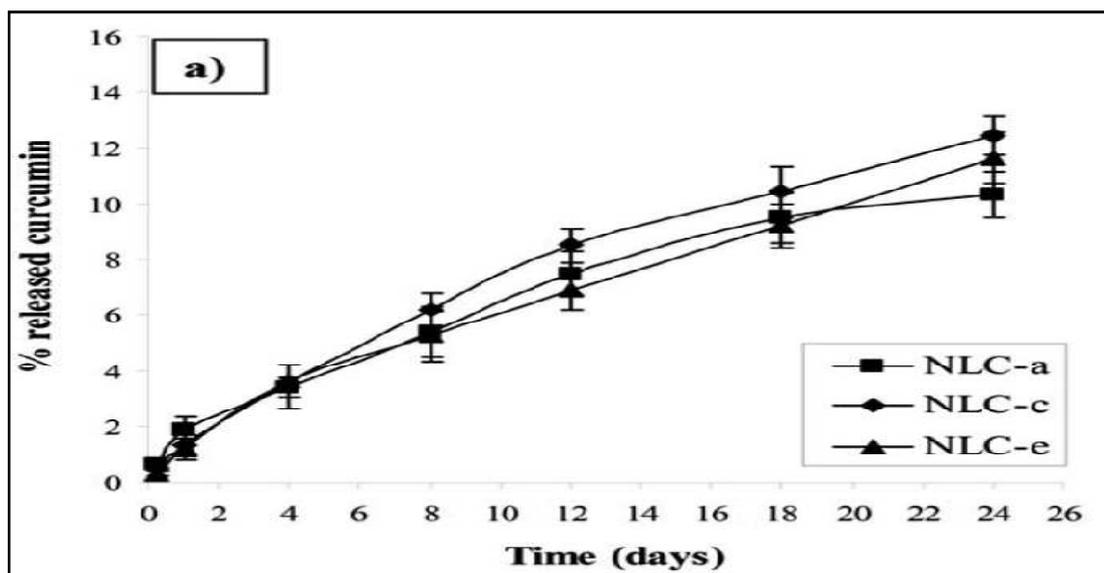
**Tabella 5:** Dati relativi alle analisi dimensionali, di carica superficiale e di LC% relativi ai sistemi NLC

I valori di potenziale  $\zeta$  (tab. 5) risultano essere sufficientemente elevati (in valore assoluto) da garantire un'adeguata stabilità dei sistemi. La piccola variazione che si osserva tra i valori di potenziale  $\zeta$  dei sistemi vuoti e quelli dei corrispondenti sistemi pieni può essere imputata ad una minima quantità di principio attivo che si deposita nello shell più esterno della matrice.

Le quantità di principio attivo incorporato, espresse come valori percentuali p/p, sono caratterizzati da valori abbastanza elevati compresi tra il 21% ed il 27% e sono stati determinati tramite analisi quali-quantitative HPLC.

Poiché i sistemi sono pensati per una somministrazione endovenosa, sono stati condotti degli studi di stabilità in soluzione acquosa tamponata a pH 7.4. Le analisi hanno dimostrato che i sistemi sono in grado di mantenere il principio attivo fino a 24 giorni, rilasciando in

questo periodo di tempo solo il 13% circa di curcumino (dati confermati dalla determinazione della quantità di curcumino rimasta all'interno delle nanoparticelle che si attesta intorno all'88 %) (fig. 55a). Questo è senza dubbio un dato positivo perché indica che la veicolazione tramite carrier è in grado di ovviare alla degradazione naturale cui il curcumino va incontro a valori di pH vicini alla neutralità. Sono stati condotti anche degli studi volti a definire le cinetiche di rilascio in plasma umano. I valori ottenuti (fig. 55b) mostrano un'iniziale burst effect predominante nei sistemi NLC-a e NLC-c, seguito da un rilascio lento e relativamente lineare che si attesta per tutti i sistemi su valori di circa 13%. Anche in questo caso sono state determinate le quantità residue rimaste all'interno dei sistemi che, sommate alla quantità rilasciato, hanno dato valori vicini al 100%.

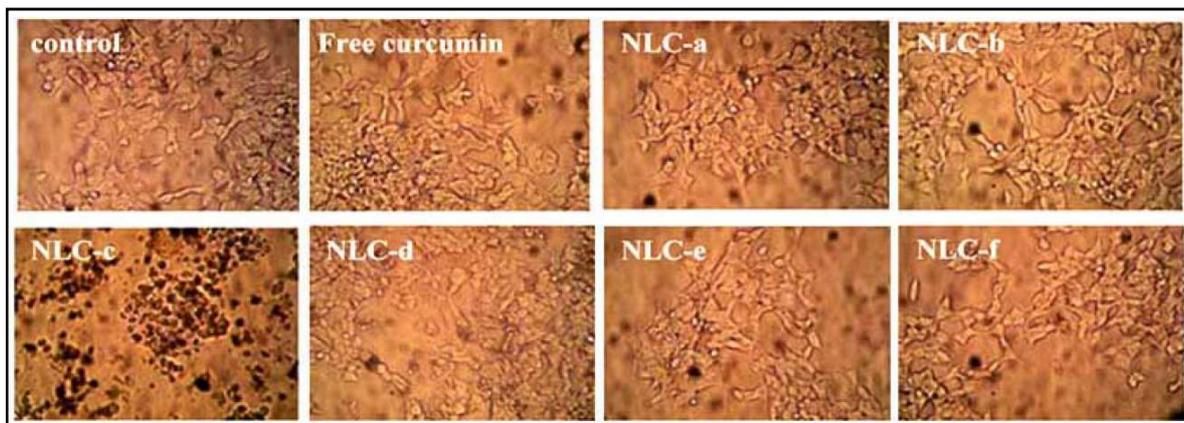


**Figura 55:** Studi di stabilità in soluzioni acquose a pH 7.4 (a) e cinetiche di rilascio in plasma umano (b)

I test di citotossicità sono stati condotti su linee cellulari di neuroblastoma LAN5 ed includono test di citotossicità e di uptake cellulare, analisi morfologiche e saggi volti a determinare

l'espressione proteica, comparando in ogni caso i sistemi carichi di farmaco con i sistemi pieni ed il farmaco free.

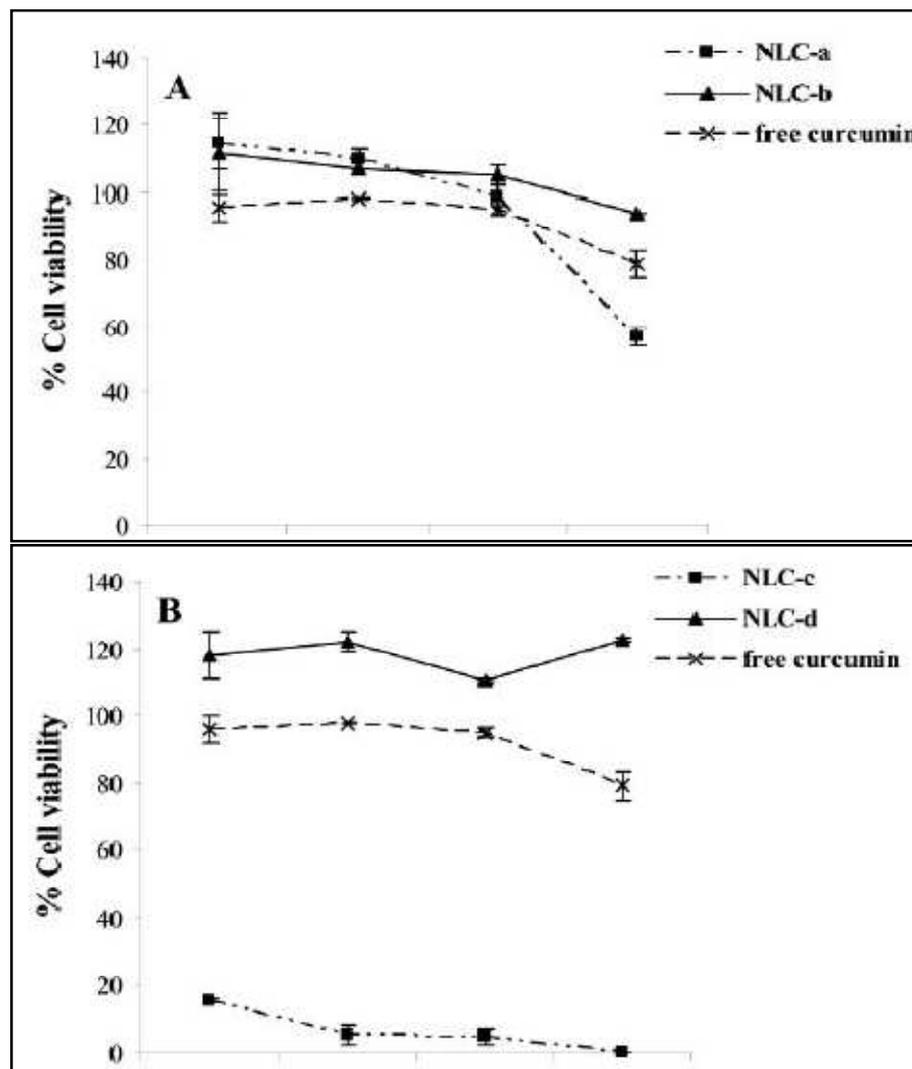
Il primo approccio biologico è stata l'analisi morfologica cellulare valutata tramite microscopia ottica. A concentrazioni di  $1\mu\text{M}$  la morfologia cellulare, se paragonata a quella di un campione di cellule di controllo, risulta immodificata quando è trattata con il farmaco libero, con i sistemi vuoti e con i sistemi NLC-a e NLC-e. Il campione trattato con il sistema NLC-c, invece, mostra un'alterazione morfologica cellulare evidente e ciò denota una spiccata capacità di veicolazione del farmaco all'interno del compartimento cellulare (fig. 56).

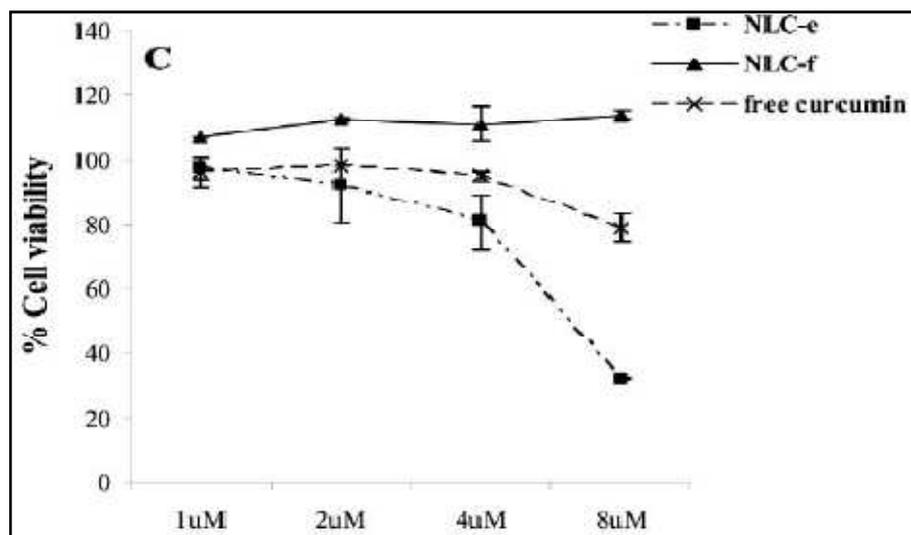


**Figura 56:** Analisi morfologica cellulare su cellule *LAN5*

Per confermare i risultati ottenuti dal saggio morfologico sono stati condotti dei test di vitalità cellulare con reattivi MTS impiegando diversi step di concentrazione (1, 2, 4 e  $8\mu\text{M}$ ) dei sistemi pieni e vuoti paragonati al farmaco libero ed a un controllo.

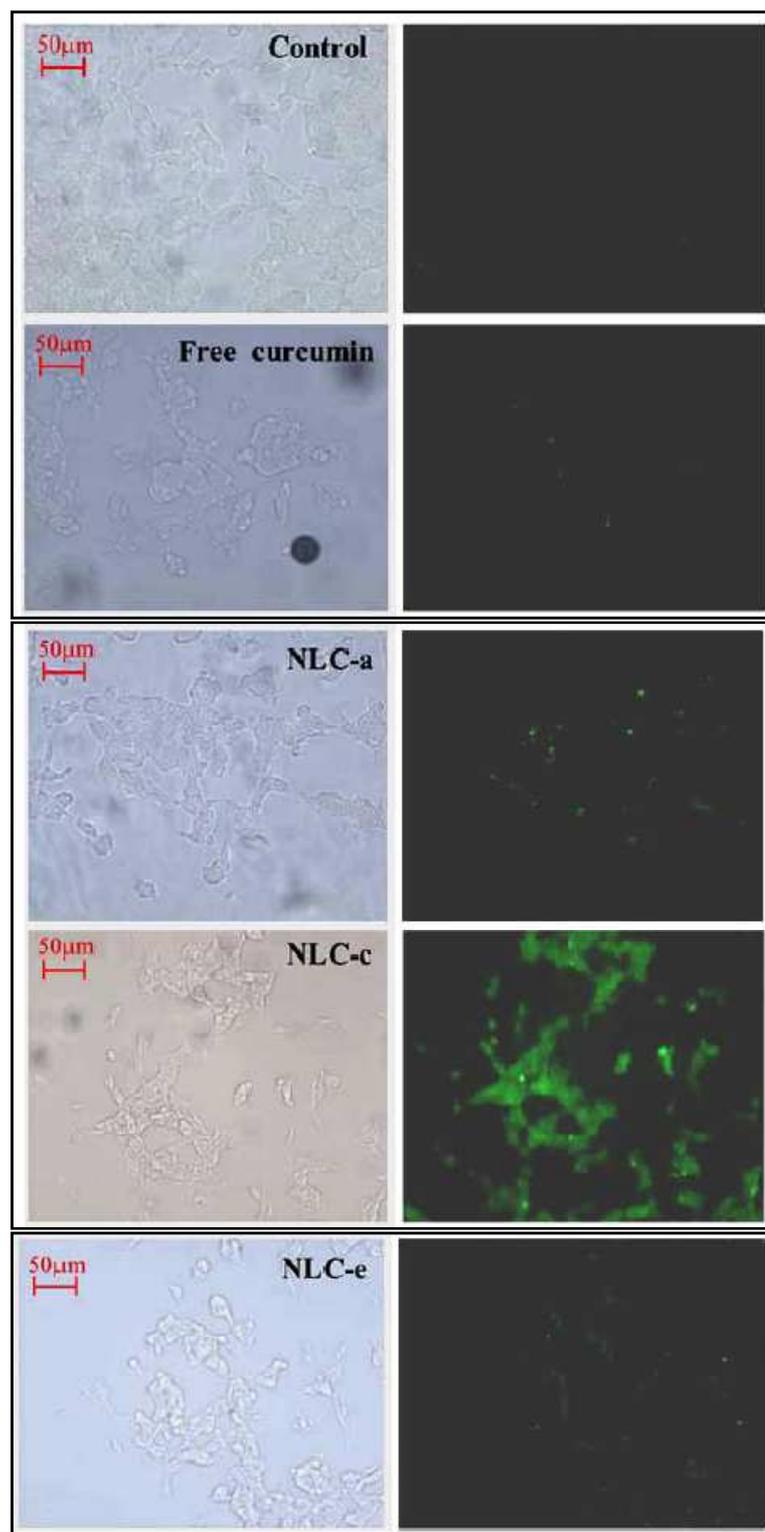
I risultati hanno confermato l'aumentata citotossicità dei sistemi pieni rispetto ai corrispondenti sistemi vuoti e rispetto al farmaco libero. Inoltre i sistemi NLC-c, i migliori al saggio morfologico, hanno mostrato avere maggiore attività citotossica rispetto agli altri (fig. 57)





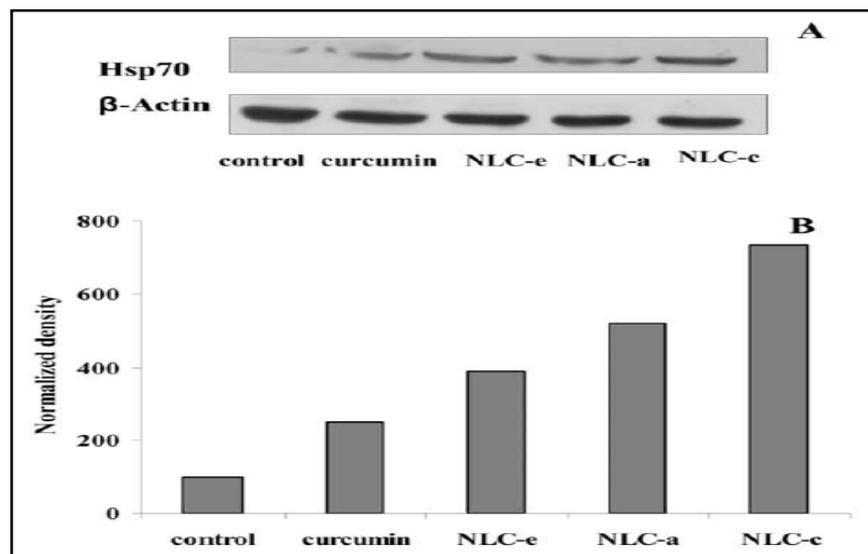
**Figura 57:** Saggi di citotossicità MTS

Sono stati condotti anche dei saggi di uptake cellulare per determinare la quantità di farmaco che riesce a raggiungere i distretti intracellulari quando questo è veicolato da sistemi nanoparticellari. I risultati, ottenuti tramite microscopia a fluorescenza, hanno confermato che i sistemi NLC-c riescono a veicolare al meglio il principio attivo all'interno della cellula che, per questa ragione, riesce ad esprimere la sua azione citotossica (fig. 58).



**Figura 58:** Saggi di uptake cellulare tramite microscopia a fluorescenza

Infine è stata determinata, tramite western blotting e tramite analisi sensitometriche, la capacità del curcumino veicolato nei sistemi descritti di indurre la sintesi proteica di Hsp70 in cellule di neuroblastoma umano LAN5 (fig. 59).



**Figura 59:** Western Blotting (a) ed analisi densitometrica (b) che determinano l'amplificazione della produzione di Hsp70

### **3.2 EZIOPATOLOGIA DEL MORBO DI ALZHEIMER**

La malattia di *Alzheimer* (*AD*) rappresenta una forma di demenza irreversibile caratterizzata da perdita di memoria, declino cognitivo progressivo, turbe del linguaggio nonché da alterazioni della personalità e del comportamento, con gravi ripercussioni sullo svolgimento delle attività della vita quotidiana. Sebbene si manifesti con alcuni mutamenti tipici dell'età senile, essa non può essere considerata in maniera assoluta una forma di invecchiamento fisiologico, in ogni caso l'età costituisce di certo un fattore di rischio per il suo sviluppo e per altre forme di demenza senile. La forma più comune di Alzheimer è caratterizzata da un esordio tardivo che insorge in genere dopo i 65 anni e presenta un andamento epidemiologico non associato a link genetici. La forma ad esordio precoce che insorge prima dei 65 anni, invece, è molto più rara (5-10% dei casi) ed è caratterizzata da fattori genetici che ne determinano familiarità<sup>174</sup>.

Sotto quest'ultimo punto di vista, sebbene molti aspetti siano ancora da chiarire, il morbo di Alzheimer sembra essere una patologia multifattoriale della quale sono già state identificate alcune componenti genetiche. In particolare, la forma precoce di Malattia di Alzheimer o *EOFAD* (*Early Onset Familiar Alzheimer Disease*), risulta associata ad alcune mutazioni geniche a carico di tre geni noti come *PSEN1*, *PSEN2* e *APP* ed in questi casi vi è un 50% di probabilità di sviluppo della malattia alla progenie conseguente ad ereditarietà del corredo genetico mutato. Esistono inoltre dei geni non direttamente responsabili della patogenesi ma in grado, comunque, di

aumentare il rischio di sviluppare una forma senile del morbo di Alzheimer. Tali geni, che conferiscono suscettibilità alla malattia, possono spiegare l'aumentato rischio di malattia di Alzheimer nei soggetti con familiarità positiva. In particolare, il gene *APOE* risulta maggiormente associato alla suscettibilità per la forma tardiva di malattia di Alzheimer. Esso, infatti, codifica per una particolare proteina inserita nel complesso lipoproteico HDL che è coinvolta nel metabolismo dei lipidi esogeni. Il gene *APOE* può esistere in tre forme alleliche, delle quali l'isoforma *e4* risulta associata all'incremento del rischio di malattia di Alzheimer. Si è scoperto, inoltre, che la maggior parte dei soggetti affetti da sindrome di Down possono sviluppare la malattia di Alzheimer dopo i 40 anni di età. Ciò è correlabile ad alcune analogie anatomo-fisiologiche che accomunano i tessuti encefalici dei soggetti down quelli dei pazienti affetti da morbo di Alzheimer. Il gene *APP*, infatti, è localizzato sul cromosoma 21 e si ritiene che la trisomia nei soggetti Down determini un'iperproduzione di *APP* e conseguente formazione delle tipiche placche senili.

Il morbo di Alzheimer deve il suo nome allo psichiatra e neuropatologo tedesco Alois Alzheimer che ne identificò e descrisse i sintomi per la prima volta nel 1906 sulla *signora August D.*, paziente che per questa ragione ha lasciato il segno nella storia della medicina. Volendo fare dei cenni epidemiologici è possibile dire che ne soffrono circa 800.000 persone in Italia e, secondo uno studio della Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health di Baltimora, 26.6 milioni nel mondo intero, con una netta prevalenza di pazienti donne (dato esclusivamente legato alla maggior vita media degli individui di sesso femminile<sup>175</sup>).

Tra tutte le demenze quella di Alzheimer è la più comune, rappresentando, a seconda della casistica, l'80-85% di tutti i casi di demenza e la sua incidenza aumenta progressivamente con l'aumentare dell'età, per raggiungere una diffusione significativa nella popolazione oltre gli 85 anni. Da rilevazioni europee, infatti, nella popolazione generale l'incidenza è di 2,5 casi/anno ogni 1.000 persone per la fascia di età tra i 65 ed i 69 anni, sale a 9 casi/anno su 1.000 persone tra i 75 ed i 79 anni, per arrivare a 40,2 casi/anno su 1.000 persone tra gli 85 e gli 89 anni<sup>176</sup>.

Anche se il decorso della malattia può essere diverso nei tempi e nelle modalità sintomatologiche per ogni singolo paziente, esistono comunque una serie di sintomi comuni che sono frequentemente associati alle varie fasi in cui, clinicamente, si suddivide per convenzione lo sviluppo della malattia stessa. Ad una prima fase definita *lieve*, fa seguito la fase *intermedia* e, quindi, la fase *avanzata/severa*. Il tempo di permanenza in ciascuna di queste fasi è variabile da soggetto a soggetto, e può in certi casi durare anche diversi anni. La malattia viene spesso anticipata dal cosiddetto *mild cognitive impairment (MCI)*, un leggero calo di prestazioni in diverse funzioni cognitive in particolare legate alla memoria, all'orientamento o alle capacità verbali. Tale calo cognitivo, che è comunque frequente nella popolazione anziana, non è necessariamente indicativo di demenza incipiente, ma può in alcuni casi essere seguito dall'avvio delle fasi iniziali dell'Alzheimer. Spesso *l'incipit* patologico è caratterizzato da amnesia progressiva e da altri deficit cognitivi. Il deficit di memoria è prima circoscritto a sporadici episodi della vita quotidiana, come disturbi a carico della *on-going memory* (ricordarsi cosa si è mangiato a pranzo, cosa si è fatto durante il giorno) e della

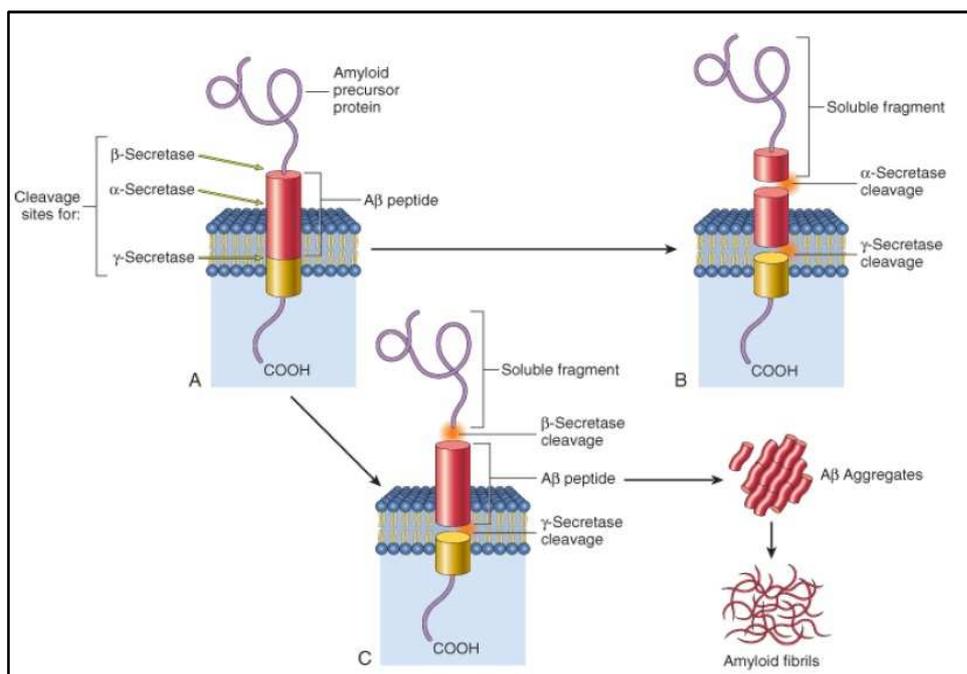
*memoria prospettica* (che riguarda l'organizzazione del futuro prossimo, come ricordarsi di andare a un appuntamento). Successivamente, il deficit aumenta progressivamente e la perdita della memoria arriva a colpire anche la *memoria episodica retrograda* (riguardante fatti della propria vita o eventi pubblici del passato) e la *memoria semantica* (le conoscenze acquisite), mentre la *memoria procedurale* (che riguarda l'esecuzione automatica di azioni) viene relativamente risparmiata fino alle fasi intermedio-avanzate della malattia. A partire dalle fasi lievi e intermedie possono poi manifestarsi crescenti difficoltà di produzione del linguaggio, con incapacità nella definizione di nomi di persone od oggetti, e frustranti tentativi di "*trovare le parole*" seguiti poi, nelle fasi più avanzate, da disorganizzazione nella produzione di frasi ed uso sovente scorretto del linguaggio (confusione sui significati delle parole, etc.). Sempre nelle fasi lievi-intermedie, la pianificazione e gestione di compiti complessi (gestione di documenti, attività lavorative di concetto, gestione del denaro, guida dell'automobile, cucinare, etc.) iniziano a diventare progressivamente più impegnative e difficili, fino a richiedere assistenza continuativa o divenire addirittura impossibili. Nelle fasi intermedie ed avanzate, inoltre, possono manifestarsi problematiche comportamentali (vagabondaggio, coazione a ripetere movimenti o azioni, reazioni comportamentali incoerenti) o psichiatriche (confusione, ansia, depressione, ed occasionalmente deliri e allucinazioni). Il disorientamento nello spazio, nel tempo o nella persona (ovvero la mancata o confusa consapevolezza di dove si è situati nel tempo, nei luoghi e/o nelle identità personali, proprie o di altri, comprese le difficoltà di riconoscimento degli altri significativi) è sintomo frequente a partire dalle fasi intermedie-avanzate. In tali fasi

si aggiungono difficoltà progressive anche nella cura della persona (lavarsi, vestirsi, assumere farmaci, etc.). Ai deficit cognitivi e comportamentali, nelle fasi più avanzate si aggiungono infine complicanze mediche internistiche, che portano a una compromissione progressiva della salute. Una persona colpita dal morbo può vivere anche una decina di anni dopo la diagnosi clinica di malattia conclamata. Come sottolineato, col progredire della malattia le persone non solo presentano deficit di memoria, ma risultano deficitarie nelle funzioni strumentali mediate dalla corteccia associativa e possono pertanto presentare afasia e aprassia (disturbi del linguaggio e dei movimenti volontari), fino a presentare disturbi neurologici e poi internistici. Per questa ragione i pazienti nelle fasi intermedie ed avanzate necessitano di continua assistenza personale ed è facilmente intuibile come ciò renda invalidante anche la normale qualità della vita dell'intero circondario familiare.

Un ruolo rilevante, nella genesi dell'AD, è svolto da un peptide detto *proteina*  $\beta$ , aggregato in forma di amiloide e responsabile della degenerazione cellulare e sinaptica dei neuroni. Più nel dettaglio l'amiloide è definito come una proteina fibrillare delle dimensioni di circa 10 nm caratterizzato da insolubilità nelle comuni soluzioni saline e resistenza sia alla degradazione da parte di enzimi proteolitici che alla fagocitosi cellulare. La proteina  $\beta$  è neurotossica in misura proporzionale alla sua aggregazione in filamenti d'amiloide. La sua eccessiva produzione, infatti, determina un accumulo intra- ed extraneuronale con conseguenti effetti che compromettono definitivamente la fisiologica funzionalità neuronale. Il peptide  $\beta$ -amiloide è codificato dal cromosoma 21 e fa parte di una più lunga proteina transmembrana di I tipo, di cui ancora non è ben chiara la

funzione, definita *APP* (*Amyloid Precursor Protein*). L'APP viene fisiologicamente metabolizzata secondo un processo non associato a produzione di  $\beta$ -amiloide e, per questo, definito *non amiloidogenico*. Esso è promosso dall'attività enzimatica del complesso proteico della  *$\alpha$ -secretasi* o *BACE-2* (*beta-site APP-cleaving enzyme 2*); tale enzima, infatti, effettua un taglio proteolitico (*clivaggio*) a livello di un dominio extramembrana del  $\beta$ -amiloide dell'APP prevenendo, di fatto, la formazione ed il conseguente accumulo extracellulare di placche amiloidi.

Nell'encefalo affetto da AD, il processo di clivaggio a carico di APP diventa *amiloidogenico* e coinvolge l'azione sinergica di due complessi enzimatici definiti  *$\beta$ -secretasi* o *BACE-1* (*beta-site APP-cleaving enzyme 1*) e  *$\gamma$ -secretasi*. Il primo è responsabile del clivaggio a livello di un sito extramembrana dell'APP e genera un segmento transmembrana di 99 aminoacidi. Questo segmento appena formatosi viene a sua volta metabolizzato dalla  *$\gamma$ -secretasi*, che opera un clivaggio su un sito intramembrana dell'APP. In particolare, l'azione enzimatica della  *$\gamma$ -secretasi* porta alla formazione di due residui polipeptidici, uno costituito da 40 aminoacidi ( $A\beta$ -40) e una da 42 ( $A\beta$ -42) che possiede maggiori capacità di aggregarsi in fibrille e di formare depositi (fig.60).



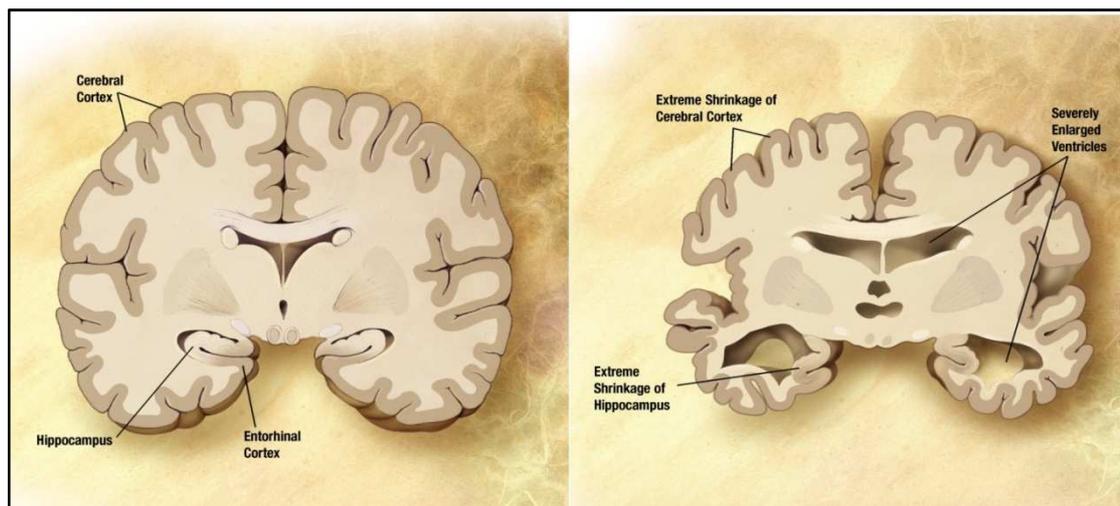
**Figura 60:** Processi di clivaggio fisiologici e patologici a carico di APP

Oltre al processo appena descritto, lo sviluppo del morbo di Alzheimer si associa ad altri fenomeni accessori che, nonostante non rappresentino la principale causa della degenerazione tissutale, contribuiscono in maniera importante alla perdita delle normali funzioni cerebrali.

Uno di questi processi è costituito dalla formazione di *ammassi neurofibrillari (ANF)*, ossia fasci di filamenti elicoidali che si accumulano nell'ambiente citoplasmatico dei neuroni e che avvolgono il nucleo. Essi sono situati di regola nei neuroni corticali, nelle cellule piramidali dell'ippocampo, nell'amigdala e nella parte basale dell'encefalo anteriore. Sono insolubili e difficili da proteolizzare in vivo, rimanendo visibili a lungo dopo la morte del neurone di origine sottoforma di ammassi. Da un punto di vista istologico gli ammassi

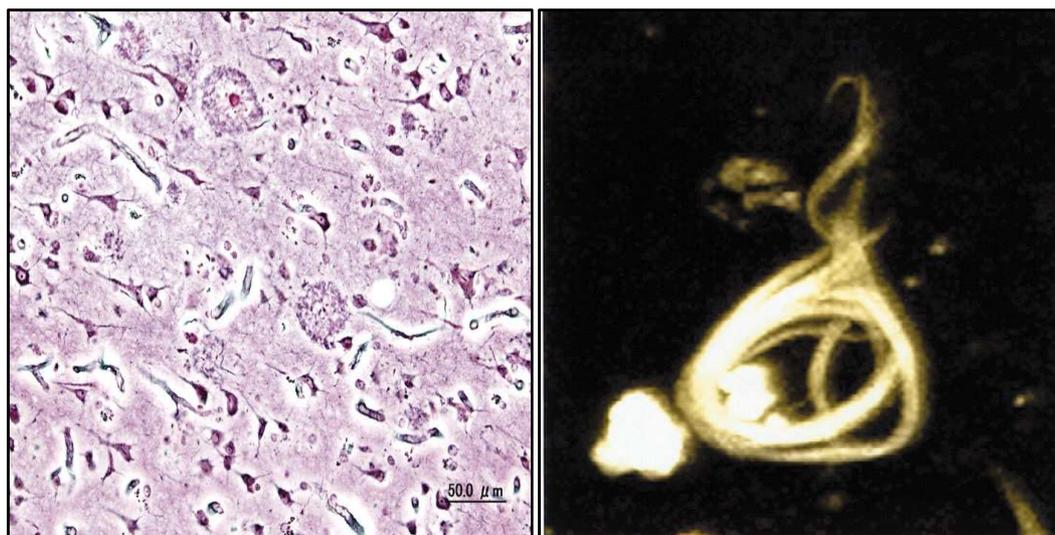
neurofibrillari rappresentano organizzazioni anomale degli elementi citoscheletrici nei neuroni di pazienti affetti da AD infatti, dal punto di vista strutturale, risultano composti da *filamenti elicoidali appaiati (FEA)* e da alcuni filamenti lineari che sembrano di composizione simile. Una componente di base dei FEA è data da forme anomale iperfosforilate della *proteina tau*, una proteina assonica associata ai microtubuli che incrementa il loro montaggio<sup>177</sup>.

Un'altra caratteristica patologica secondaria allo sviluppo del morbo di Alzheimer è costituita dalla *Angiopatia Amiloide Cerebrale* (o *Angiopatia Congofila*). Essa è una forma di angiopatia caratterizzata dalla formazione di depositi di materiale amiloide sulle pareti dei vasi sanguigni del sistema nervoso centrale. Il termine "*congofila*" è utilizzato in quanto la presenza di aggregazioni anomale di amiloide possono essere evidenziate, all'esame microscopico dei tessuti encefalici, tramite l'uso del colorante *Rosso Congo*. Questi depositi amiloidi predispongono i vasi sanguigni coinvolti a lesioni strutturali, aumentando il rischio di emorragie cerebrali (*strokes*). Queste emorragie, a differenza di quelle legate all'ipertensione, sono solitamente localizzate in un unico lobo cerebrale. A livello neurologico macroscopico è possibile notare una diminuzione nel peso e nel volume del cervello, dovuta ad atrofia corticale soprattutto a livello dell'ippocampo (struttura encefalica che svolge un ruolo fondamentale nell'apprendimento e nei processi di memorizzazione), ad un allargamento dei solchi e corrispondente appiattimento delle circonvoluzioni e ad un severo ampliamento dei ventricoli (fig. 61).



**Figura 61:** Alterazioni anatomiche a carico di un encefalo affetto da morbo di Alzheimer

A livello microscopico e cellulare sono riscontrabili numerose caratteristiche morfologiche tipiche dei tessuti cerebrali di soggetti affetti da AD. Il *depauperamento neuronale colinergico* è facilmente riscontrabile in quanto diminuisce il numero di neuroni visibili microscopicamente, inoltre sono visibili l'accumulo di *placche  $\beta$ -amiloidi* e di *ammassi neurofibrillari* (fig 62).



a)

b)

**Figura 62:** Immagini restituite da microscopia elettronica di placche  $\beta$ -amiloidi (a) e ammassi neurofibrillari (b)

Gli attuali approcci farmacologici prevedono l'utilizzo farmaci in grado di rallentare il decorso della malattia e di alleviarne i sintomi. La strategia farmacologica tradizionale ha come scopo principale quello di ristabilire i livelli fisiologici di acetilcolina che nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer, in seguito a danno neuronale determinato dall'accumulo di placche senili, si ritrova a livelli drasticamente ridotti. L'impiego diretto dell'Acetilcolina, seppur ideale da un punto di vista farmacodinamico, risulta praticamente impossibile a causa della presenza di enzimi ematici ad attività esterasica che ne idrolizzano il legame estereo con l'acido acetico annullandone l'attività biologica. Anche l'impiego di derivati ad attività colinomimetica diretta trovano scarso impiego poiché posseggono una scarsa capacità di penetrare attraverso la barriera ematoencefalica ed esprimono un'elevata attività sistemica indifferenziata. Largo impiego, invece, trovano i farmaci ad attività

anticolinesterasica che, riducendo la fisiologica idrolisi dell'acetilcolina a carico dell'enzima colinesterasi, aumentano di fatto i livelli ed il tempo di permanenza del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico amplificandone l'attività biologica. Il capostipite di questi farmaci è la *Fisostigmina*, un alcaloide ottenuto dai semi della *fava del Calabar* (Camerun) che veniva utilizzata dalle popolazioni indigene ed ancora oggi impiegato per diversi scopi. Attualmente i farmaci di elezione sono dei derivati di semi-sintesi come la *Rivastigmina*, la *Galantamina* e il *Donezepil* i quali, avendo un'azione inibitoria reversibile, sono di gran lunga più versatili ed adattabili alle esigenze del caso. Accanto ai trattamenti tradizionali, tuttavia, sono portati avanti anche degli approcci farmacologici alternativi. Uno di questi riguarda il sistema di neurotrasmissione legato al *sistema glutamatergico*. L'*acido glutamico* è un neurotrasmettitore ad attività eccitatoria ma una sua iperproduzione, come spesso accade nel morbo di Alzheimer, genera uno squilibrio elettrochimico di membrana a livello neuronale legato all'incremento di concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare. In questo contesto un farmaco con elevate potenzialità terapeutiche è la *Memantina*, un antagonista non competitivo dei recettori glutamatergici *NMDA (N-Metil-D-Aspartato)*<sup>178</sup>. Un altro filone di ricerca riguarda l'impiego di molecole con attività inibitoria nei confronti delle  $\beta$ -secretasi e delle  $\gamma$ -secretasi. I primi, come ad esempio il composto di recente sperimentazione denominato *E64d*, hanno come fine ultimo il blocco del clivaggio del sito extramembrana della proteina APP e la conseguente produzione dei residui amiloidi insolubili<sup>179</sup>.

Gli inibitori delle  $\gamma$ -secretasi, invece, puntano a limitare il clivaggio a livello del sito intramembrana di APP. Tuttavia questi ultimi non

hanno trovato ancora applicazione a causa degli effetti secondari che potrebbero potenzialmente produrre. Infatti è stato studiato che, in condizioni fisiologiche, la  $\gamma$ -secretasi opera una proteolisi della porzione intracellulare di un complesso proteico recettoriale definito *Notch*, liberando l'oligopeptide *NICD*. Questo, una volta entrato nel nucleo cellulare, entra a far parte di una sequenza genica che codifica per alcune proteine costituenti i linfociti T e B. Risulta chiaro, quindi, che un'inibizione non controllata dell'azione della  $\gamma$ -secretasi potrebbe produrre degli squilibri immunitari non indifferenti.

L'obiettivo che ci si propone di raggiungere in questa sezione del mio lavoro di tesi è quello di rendere applicabile un approccio terapeutico (e non sintomatico) estremamente innovativo al trattamento del morbo di Alzheimer che si basa sull'impiego di *farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS)*. Da recentissimi studi, infatti, è stato dimostrato che molti FANS, tra cui anche il Flurbiprofen, determinano una riduzione della produzione di BACE1, limitando di conseguenza la formazione di residui insolubili A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42.

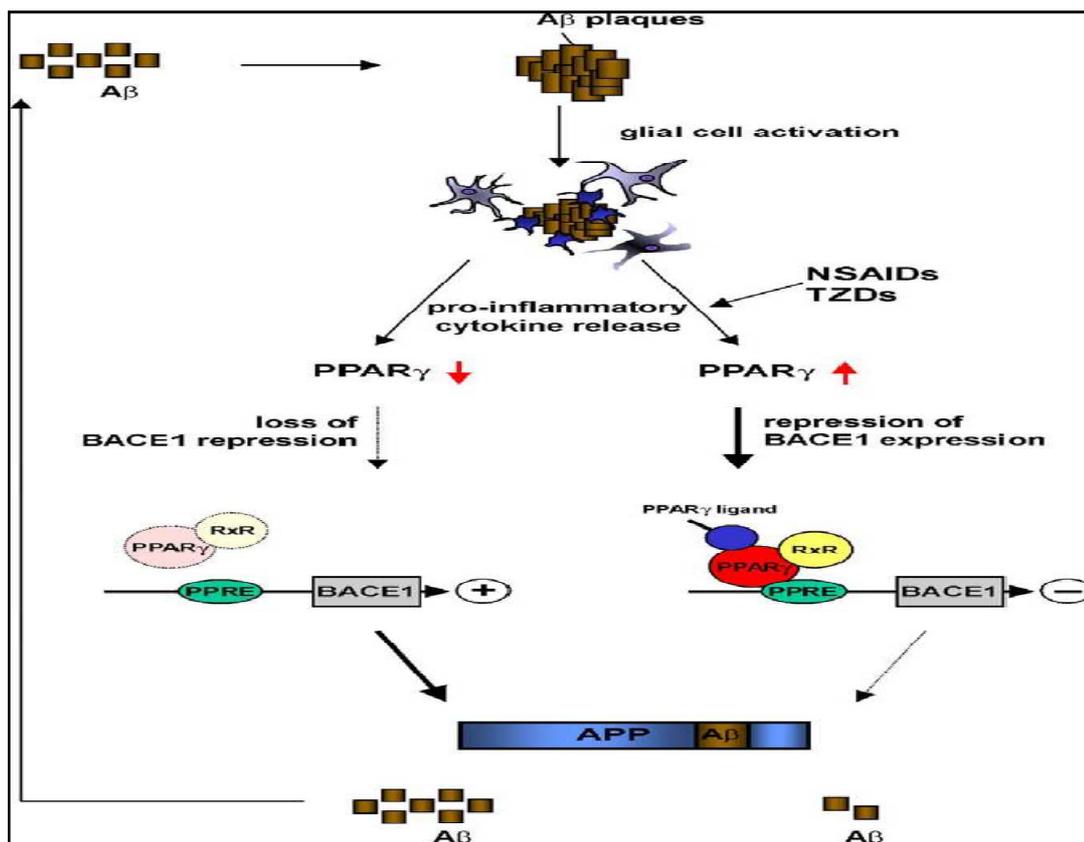
In questo contesto un ruolo chiave è svolto dal recettore *PPAR- $\gamma$*  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$* ), un recettore nucleare in grado di regolare sia la produzione di prodotti infiammatori e citotossici che la sintesi del complesso enzimatico della  $\beta$ -secretasi.

PPAR- $\gamma$  appartiene ad una famiglia di recettori nucleari ed esiste in due isoforme differenti che derivano da splicing alternativo dell'mRNA. PPAR- $\gamma_1$  è un'isoforma ubiquitaria, mentre PPAR- $\gamma_2$  è l'isoforma predominante nel tessuto adiposo. Sastre e coll.<sup>180</sup> hanno condotto degli studi su *Fibroblasti di Embrioni di Topo (MEF)* resi knock-out rispetto alla sequenza codificante per PPAR- $\gamma$  e, mettendoli a paragone con dei casi controllo non trattati, hanno dimostrato che

c'è una stretta correlazione tra l'attivazione di tale recettore e l'espressione di  $\beta$ -secretasi. Più in particolare, l'attivazione di PPAR- $\gamma$  mediata dai FANS riduceva drasticamente la produzione di BACE1 e la conseguente produzione di placche amiloidi. Tale recettore è coinvolto inoltre nella gestione del sistema immunitario e nel controllo di risposte infiammatorie. Da risultati sperimentali, infatti, risulta che la sua attivazione comporti un'inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie come *IL-1b*, *TNF $\alpha$* , *IL-6* e *ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS)*<sup>181</sup>.

Poiché tali citochine proinfiammatorie sono in grado di diminuire i livelli di mRNA PPAR- $\gamma$  e l'attività di *PPRE (Putative Responsive Element in BACE1 promoter gene)*, un intermedio biochimico implicato nell'inibizione della produzione di BACE-1 nelle cellule neuronali, risulta chiaro che l'azione dei FANS in qualità di potenti attivatori per PPAR- $\gamma$ <sup>182</sup> gioca un duplice ruolo: da un lato diminuisce la produzione di sostanze ad azione pro-infiammatoria e dall'altro riduce la sintesi di BACE-1 (fig. 63).

Il *Flurbiprofen*, in particolare l'enantiomero R, sembra avere un'elevata affinità nei confronti di PPAR- $\gamma$ , ed attualmente si trova in fase III dei trials clinici per il trattamento del AD. Trattamenti sperimentali di sei mesi con FANS hanno significativamente diminuito i sintomi di AD imputabile, probabilmente, ad un decremento del 40-50% della deposizione di residuo  $\beta$ -amiloide.

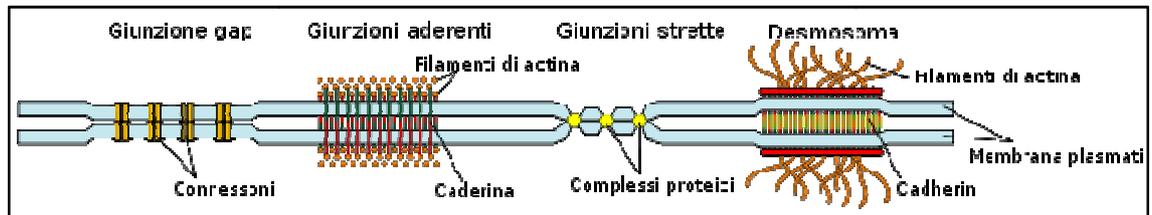


**Figura 63:** Riduzione di aggregati A $\beta$  dopo attivazione di PPAR- $\gamma$

Tuttavia le problematiche legate all'impiego dell' R-Flurbiprofen non sono da sottovalutare in quanto, la somministrazione del farmaco libero, non può di certo garantire un'apprezzabile concentrazione a livello dei siti recettoriali cerebrali. Ciò è dovuto ad una difficoltà obiettiva, vista l'elevata idrofilia della molecola, di attraversare la *barriera emato-encefalica (BEE)* e di raggiungere i recettori PPAR- $\gamma$  nei siti cerebrali. Inoltre è stato dimostrato da studi in vivo su ratto, topo e scimmia che esiste un fenomeno di bioinversione isomerica dalla forma *R*, quella attiva, alla forma *S*, evidentemente la più stabile<sup>183</sup>.

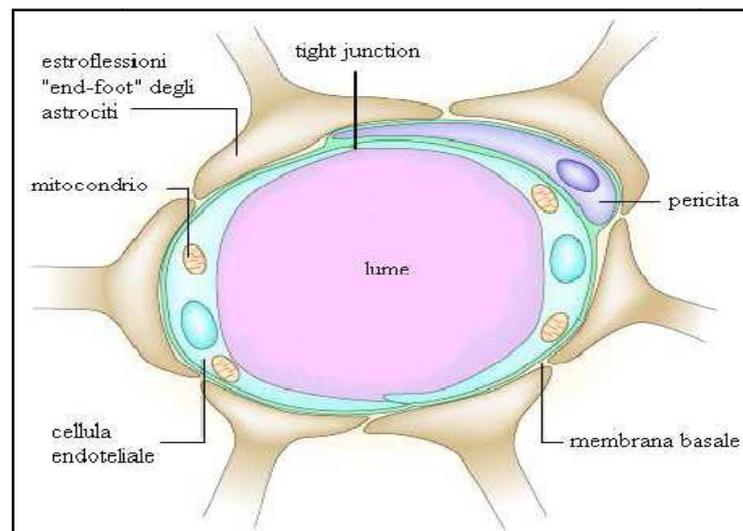
La barriera emato-encefalica è una struttura anatomica complessa che protegge il tessuto cerebrale e nervoso dall'azione tossica di sostanze circolanti nel torrente ematico, regolando di fatto l'omeostasi delle cellule nervose. L'esistenza di questa barriera fu inizialmente notata dal batteriologo Paul Ehrlich nei suoi esperimenti di colorazione cellulare intorno alla fine del XIX secolo. Egli notò che alcuni dei pigmenti impiegati come coloranti, in particolare l'anilina, erano in grado di colorare qualsiasi organo di un animale eccetto il cervello. Successivamente Edwin Goldmann, uno degli studenti di Ehrlich, iniettò il pigmento direttamente nel fluido spinale del cervello e notò che in questo caso il cervello si tingeva, mentre il resto del corpo no. Questo dimostrava chiaramente l'esistenza di una sorta di barriera tra i due. Successivamente con l'introduzione della microscopia elettronica fu possibile non solo determinare l'esistenza di una barriera reale tra i vasi sanguigni ed il cervello, ma anche determinarne l'esatta composizione anatomica. La BEE è costituita fundamentalmente dall'endotelio vasale capillare che, differenza di altri distretti, non presenta fenestrature ma è continuo ed impedisce la diffusione della maggior parte delle molecole circolanti. Inoltre le singole unità cellulari sono interconnesse tra loro attraverso *giunzioni cellulari occludenti* (o *tight junctions*), che svolgono una funzione sigillante senza lasciare interstizi in modo tale che molecole idrosolubili non filtrino facilmente tra una cellula e l'altra. Al microscopio elettronico si nota la presenza di proteine integrali di membrana e, in particolare, quelle principalmente coinvolte sono la *Claudina* e l'*Occludina*; esse sporgono sulla faccia esterna delle membrane e sono tra loro unite da legami non covalenti formando una cintura intorno alla cellula che

nemmeno le proteine di membrana possono attraversare, dividendola quindi in due o più domini (fig.64).



**Figura 64:** Anatomia delle tight junctions e di altre connessioni intercellulari

Un'altra componente della BEE è costituita dalle *proiezioni delle cellule astrocitarie* (o *peduncoli astrocitari*) e dai *periciti* che circondano le cellule endoteliali vasali appena descritte costituendo un'ulteriore guaina di protezione (fig.65).



**Figura 65:** Complessi cellulari che costituiscono la BEE

Vista la complessità delle strutture appena descritte, risulta chiaro come il passaggio di sostanze dal lume vasale all'ambiente intracellulare neuronale sia gestito attraverso meccanismi molto particolari. Infatti, mentre le molecole altamente lipofile e di dimensioni molto ridotte riescono ad attraversare la BEE tramite diffusione semplice, la maggior parte delle sostanze nutritive e strutturali sono trasferite dal torrente ematico all'interno delle cellule attraverso dei meccanismi di trasporto specifici. Uno di questi trasportatori localizzati sulla BEE è quello per il glucosio definito *GLUT1*, responsabile del passaggio dal sangue al SNC sia del *D-glucosio*, sostanza di vitale importanza, che di composti dalla struttura simile come il *2-deossiglucosio*, il *galattosio* e il *mannosio*. Ovviamente esistono numerosi trasportatori selettivi per altre sostanze particolari, come ad esempio il trasportatore per la *colina*, precursore del neurotrasmettitore *acetilcolina* nonché componente strutturale delle membrane, o i trasportatori per aminoacidi, peptidi e enzimi come la *transferrina* (fig.66).

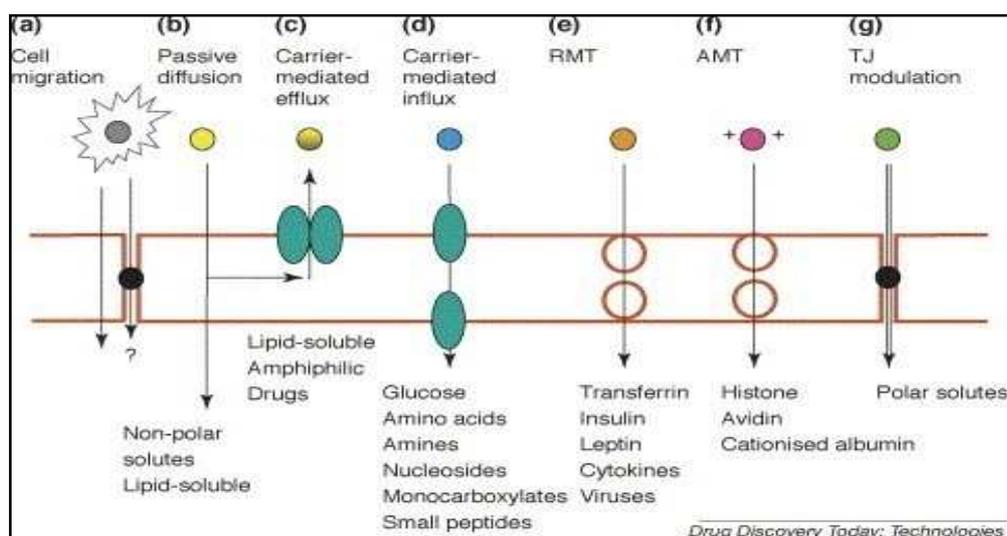


Figura 66: Principali meccanismi di trasporto attraverso la BEE

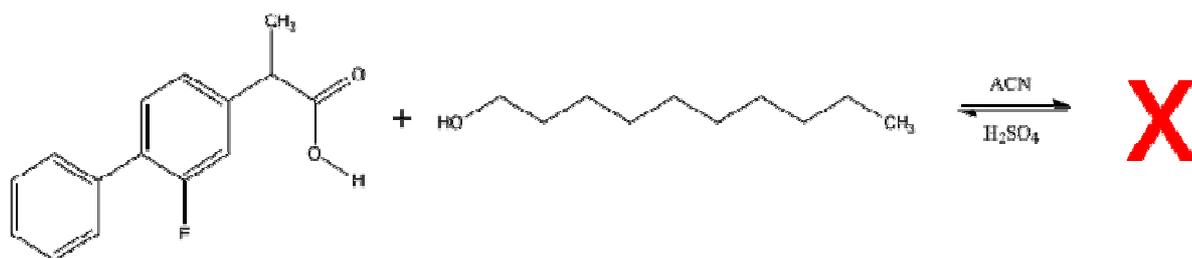
Un altro meccanismo di protezione è costituito dalla presenza di particolari meccanismi di trasporto, definiti meccanismi di *efflusso carrier-mediati*. Tali processi sono paragonabili a dei processi di controllo supplementari responsabili dell'espulsione di sostanze che hanno già attraversato la BEE. Alla luce di quanto descritto è intuibile come la BEE, se da un lato rappresenta uno strumento di difesa naturale molto valido, dall'altro rende l'applicazione di terapie farmacologiche mirate un compito estremamente arduo. E' per questa ragione che le infezioni virali o batteriche a carico del sistema nervoso centrale sono molto rare ma molto difficili da trattare farmacologicamente.

### ***3.2.1 PREPARAZIONE DI SISTEMI NLC CARICATI CON PROFARMACI DELL' R-FLURBIPROFEN***

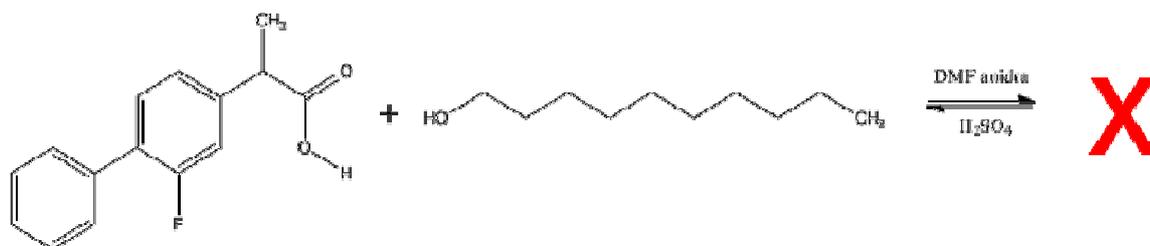
Lo sviluppo e la progettazione di sistemi nanostrutturati a matrice lipidica ha come scopo principale il targeting del principio attivo direttamente al sistema nervoso centrale, consentendone l'attraversamento della BEE ed evitandone la biodistribuzione in distretti non interessati dalla patologia da trattare. Le nanostrutture sono state caricate con dei profarmaci esterei estremamente innovativi dell'isomero R del Flurbiprofen creati nei nostri laboratori e pensati sia per garantire elevati valori di LC%, che per ottimizzare al meglio le cinetiche di rilascio. Inoltre, l'esterificazione dell'R-Flurbiprofen in combinazione con la formulazione farmaceutica nanoparticellare, sembra una soluzione ottimale ai fini della protezione chimico-fisica del principio attivo stesso prevenendone il fenomeno di bioinversione già citato cui esso va spontaneamente incontro.

Il primo tentativo è stato quello di introdurre una catena carboniosa a 10 atomi mediante esterificazione di Fischer acido-catalizzata.

La reazione condotta in CH<sub>3</sub>CN non ha fornito prodotti apprezzabili, probabilmente perché il gruppo ossidrilico del 1-decanolo in CH<sub>3</sub>CN tende, a causa di interazioni elettrostatiche, ad orientarsi verso l'interno della molecola, risultando così nascosto o comunque chimicamente impedito influenzando negativamente la reattività.



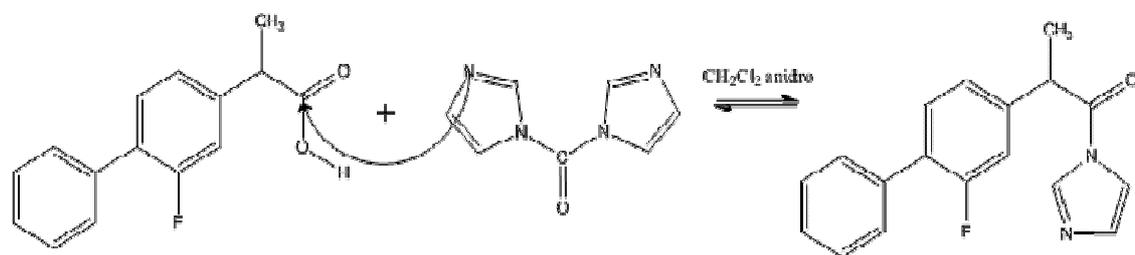
Per questo motivo sono state cambiate le condizioni di reazione e si è utilizzato come solvente DMF anidro. Anche in questo caso, tuttavia, non è stato ottenuto alcun prodotto di reazione.



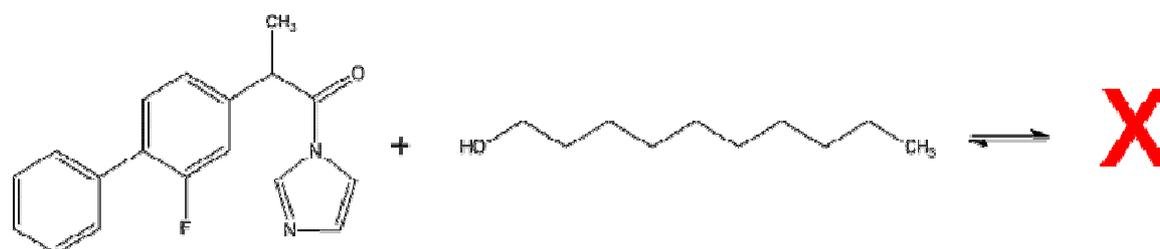
A questo punto abbiamo deciso di cambiare strategia e rendere più reattivo il gruppo carbossilico. La reazione portata avanti prevede l'impiego di *carbonildiimidazolo* (CDI) che, dopo un attacco iniziale al carbonio elettrofilo del gruppo carbossilico, conduce alla formazione di un intermedio più reattivo. Questo viene attaccato dall'ossidrile alcolico del 1-decanolo con conseguente formazione dell'estere desiderato.

Tuttavia, dopo il tempo necessario per la reazione, non si è evidenziato nessun prodotto, ma si è ottenuto esclusivamente la formazione dell'intermedio reattivo.

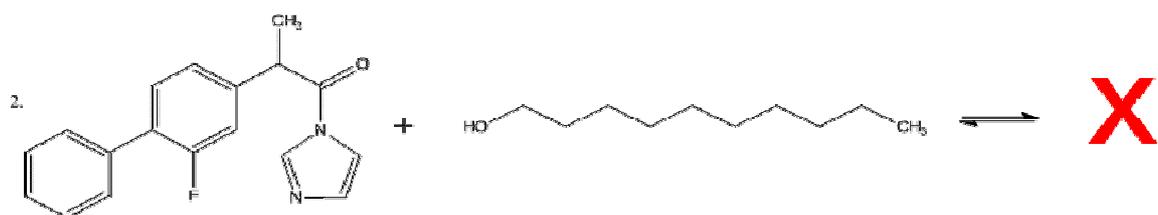
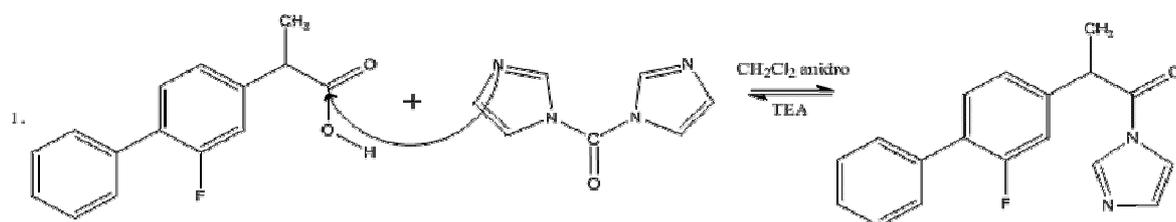
1° step:



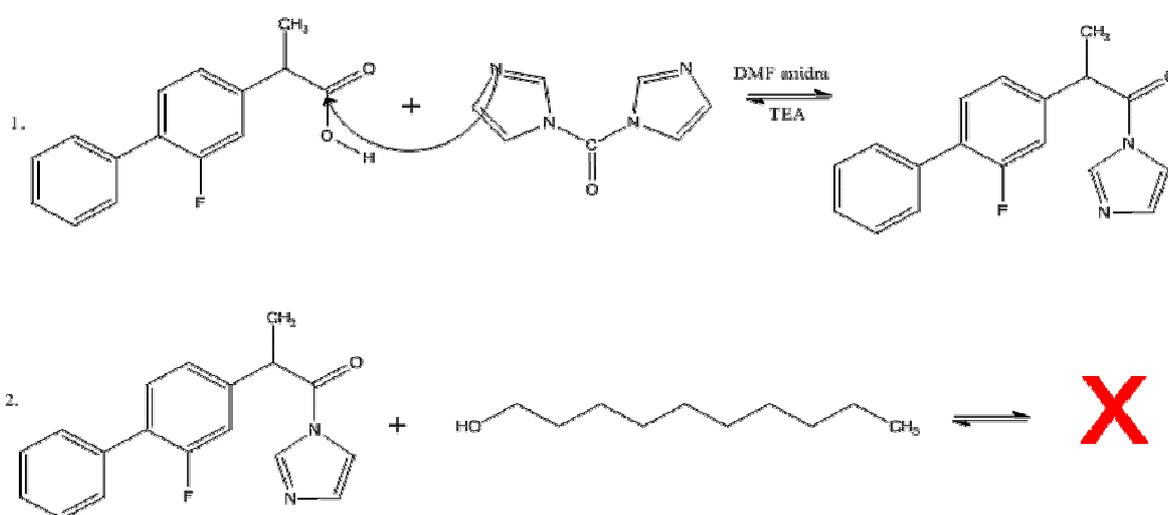
2° step:



Il tentativo successivo, allora, è stato quello di condurre la medesima reazione in condizioni di pH basico per *triethylamina* (TEA). Anche in questo caso però non abbiamo ottenuto prodotto isolabile.



Stesso esito negativo ha dato anche la reazione montata sostituendo il solvente di reazione con DMF anidro ma senza alcun riscontro positivo.



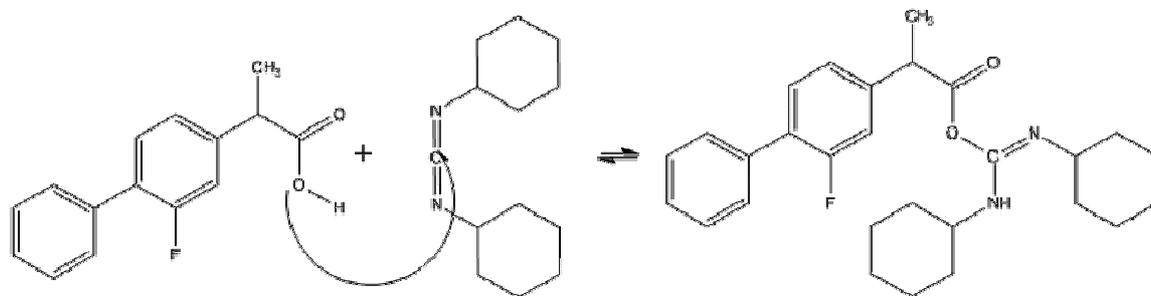
Successivamente sono stati effettuati altri tentativi utilizzando attivatori diversi, come la *dicicloesilcarbodiimmide* (DCC) e l'*N-idrossisuccinimide* (NHS) ed accorciando la catena alchilica dell'alcool sotto atmosfera inerte di argon.

In questo caso la reazione procede attraverso tre step: inizialmente il carbonio elettrofilo del DCC viene attaccato dall'ossigeno dell'-OH carbossilico del Flurbiprofen, formando un intermedio reattivo molto instabile; questo intermedio reagisce immediatamente con NHS per

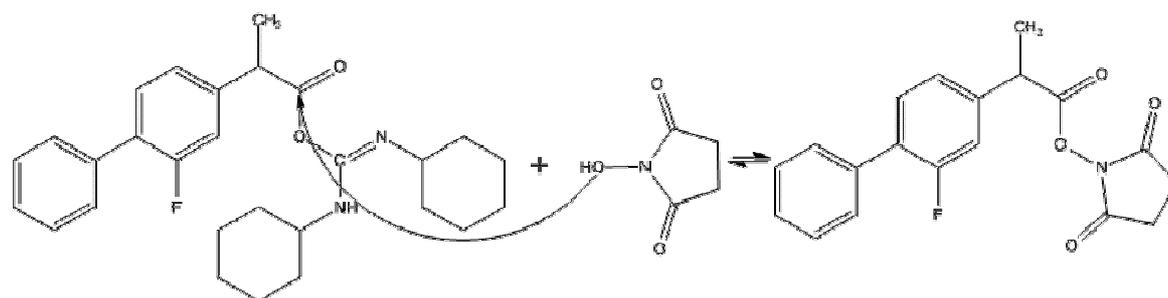
formare un secondo intermedio che a sua volta reagisce con l'alcool per formare l'estere finale desiderato.

Con questo processo sintetico si è formata una quantità di prodotto ma con resa piuttosto bassa e pari al 2,78%.

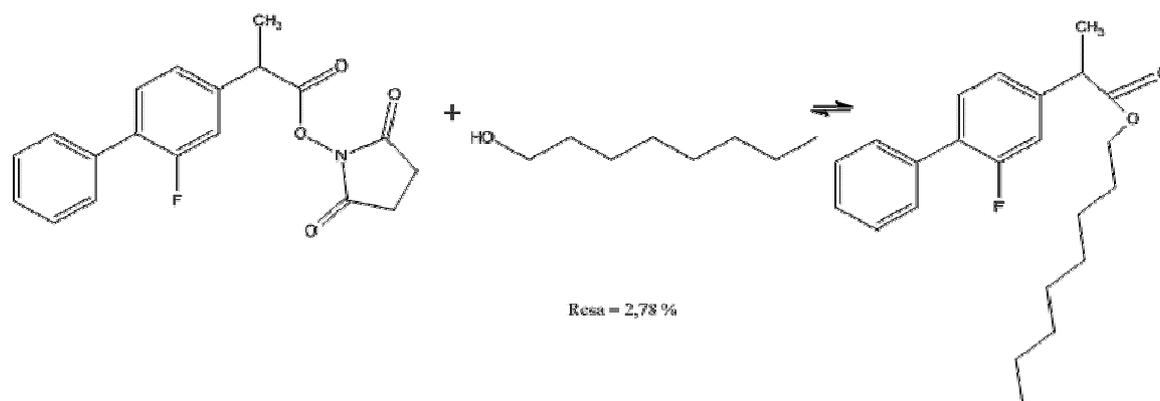
1° step:



2° step:



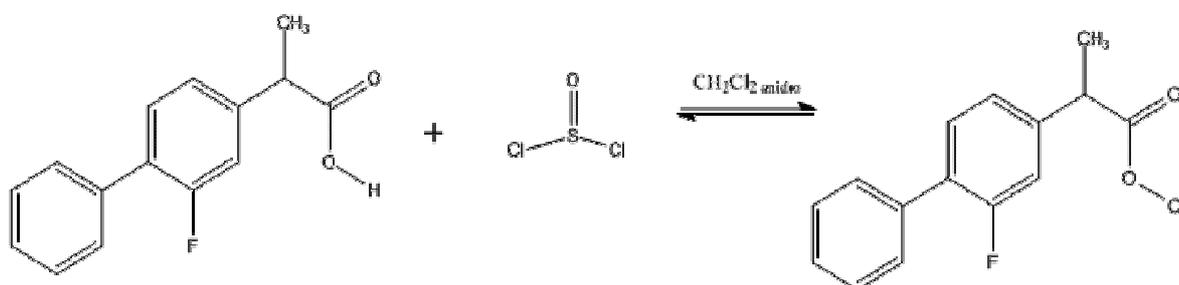
3° step:



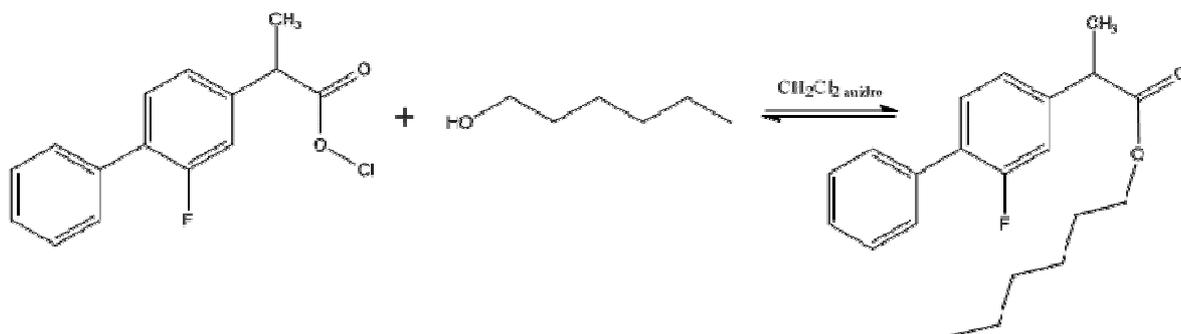
Dopo gli insuccessi riscontrati nelle precedenti sintesi si è fatto un tentativo con CDI e DMF in ambiente anidro; la reazione non ha portato neppure in questo caso a prodotto isolabile.

Poiché i precedenti tentativi di sintesi hanno dato risultati poco soddisfacenti, la scelta è ricaduta su un attivatore più marcato come il *cloruro di tionile* ( $SOCl_2$ ) che consentisse di trasformare il gruppo carbossilico del Flurbiprofen in cloruro acilico e successiva reazione del cloruro con l'alcool, impiegando l'*1-esanolo*.

1° step:



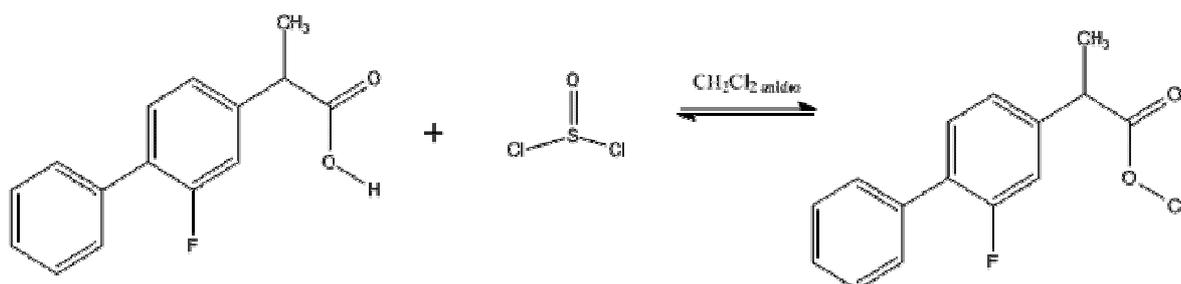
2° step:



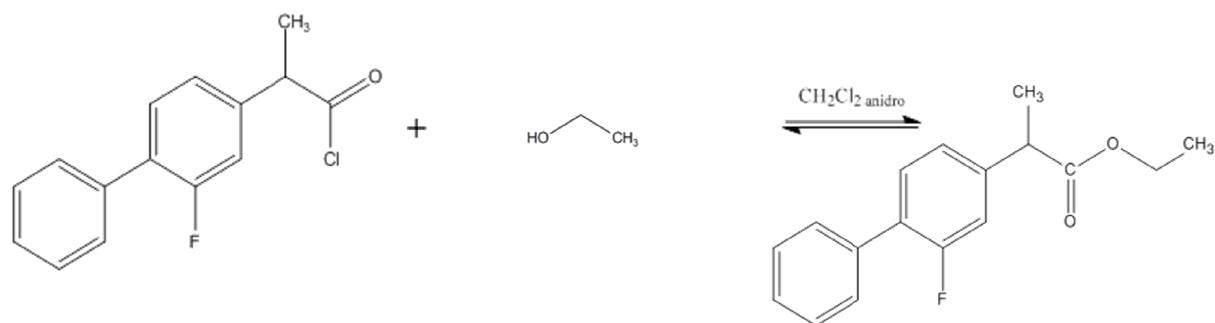
La reazione ha fornito l'estere esilico desiderato con una resa del 91,8%.

Il prodotto di reazione è stato recuperato dopo evaporazione del solvente di reazione ed in seguito è stato purificato su colonna cromatografica con una fase eluente costituita da 20:1 di etere di petrolio/acetato di etile. La stessa reazione via cloruro acilico è stata utilizzata per la sintesi dell'estere etilico.

1° step:

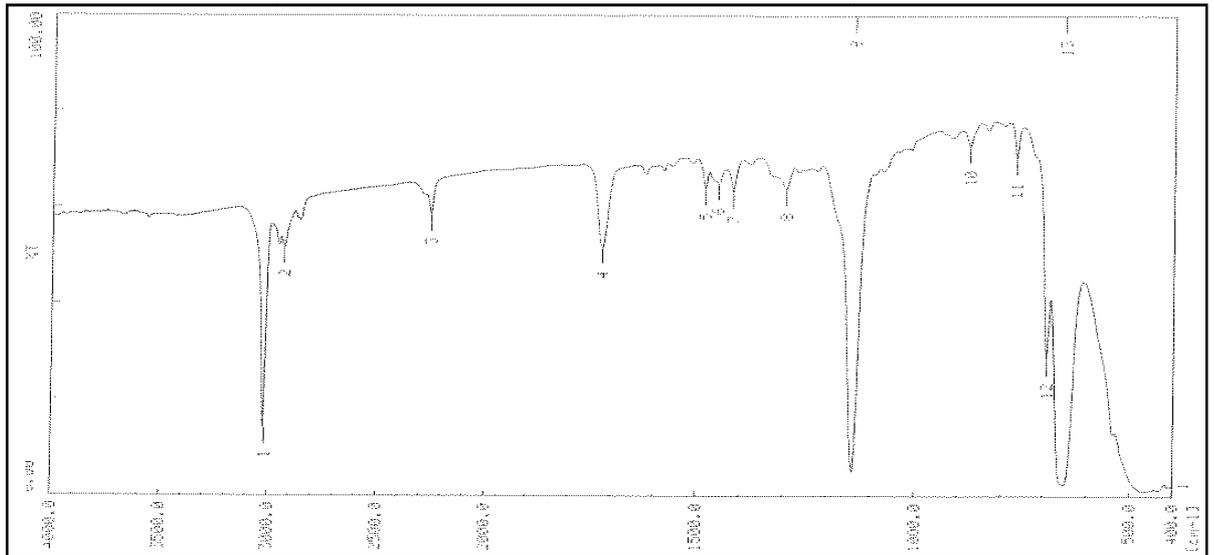


2° step:

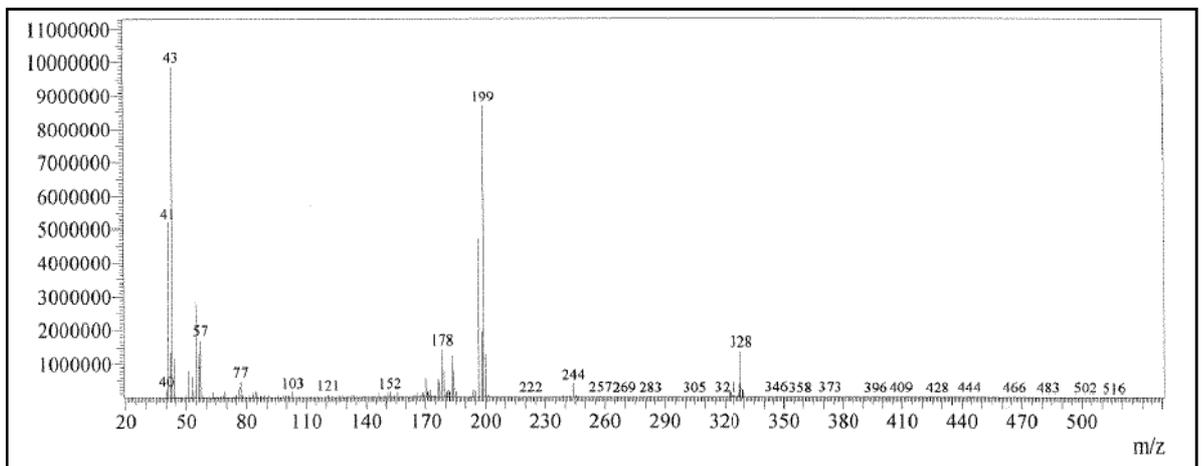


Anche in questo caso la reazione ha fornito l'estere etilico desiderato con una resa del 90,6%.

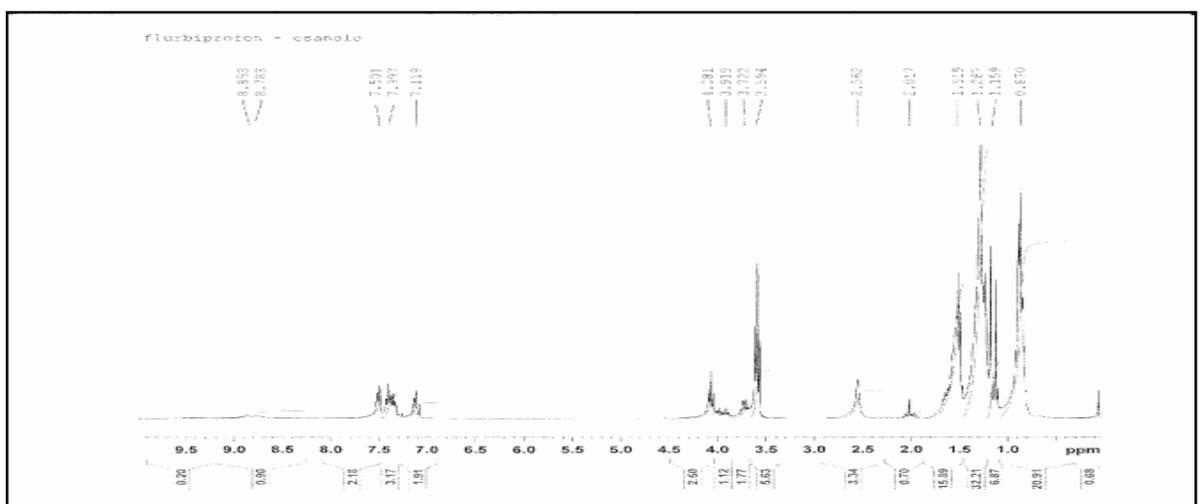
Il prodotto di reazione è stato dunque recuperato dopo evaporazione del solvente di reazione; in seguito è stato purificato su colonna cromatografica con una fase eluente costituita da 20:1 di etere di petrolio/acetato di etile. In entrambi i casi durante le sintesi sono state attivate tutte le procedure più idonee a consentire la totale rimozione del SOCl<sub>2</sub>, sostanza tossica anche a ridotte concentrazioni. I prodotti ottenuti sono tutti stati caratterizzati tramite FT/IR, GC-MS ed <sup>1</sup>H-NMR. Tali tecniche spettroscopiche hanno confermato la formazione dei due esteri esilico (*RD01*) ed etilico (*RD03*) aventi rispettivamente peso molecolare di 328 g/mol e 272 g/mol (fig.67 e 68).



a)

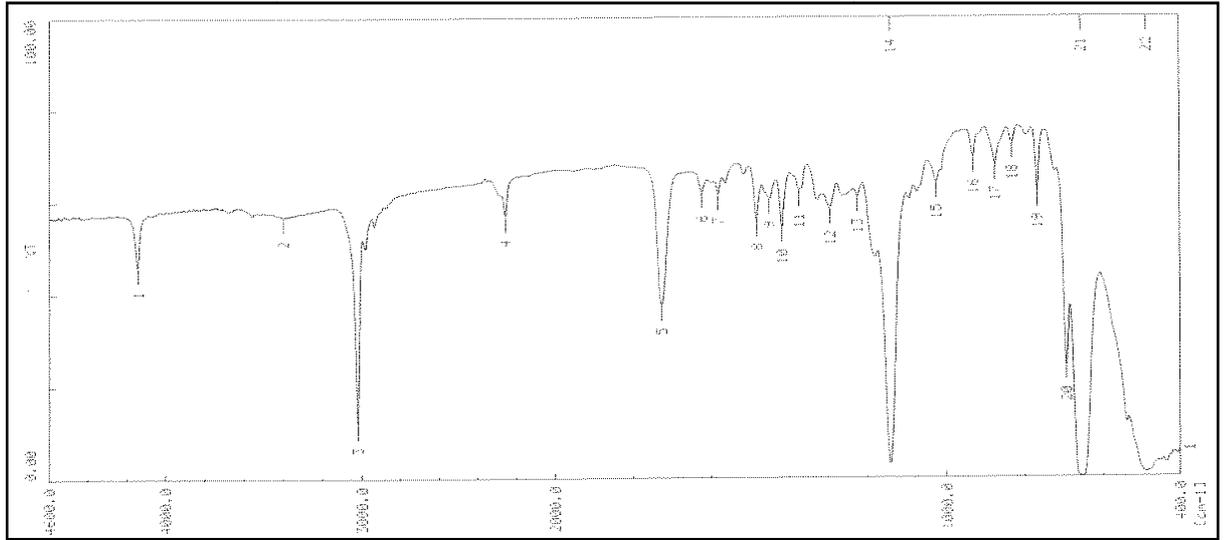


b)

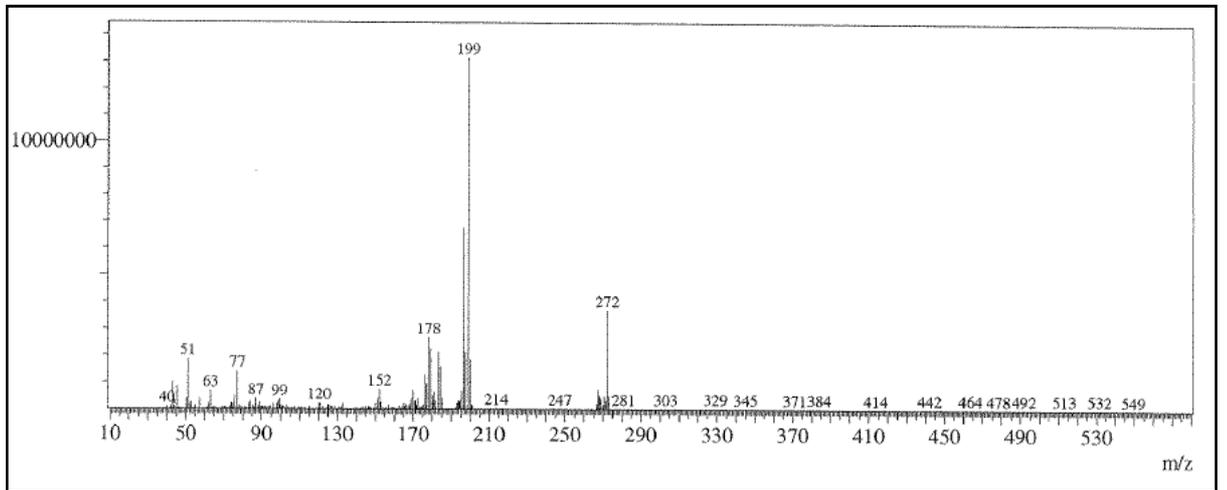


c)

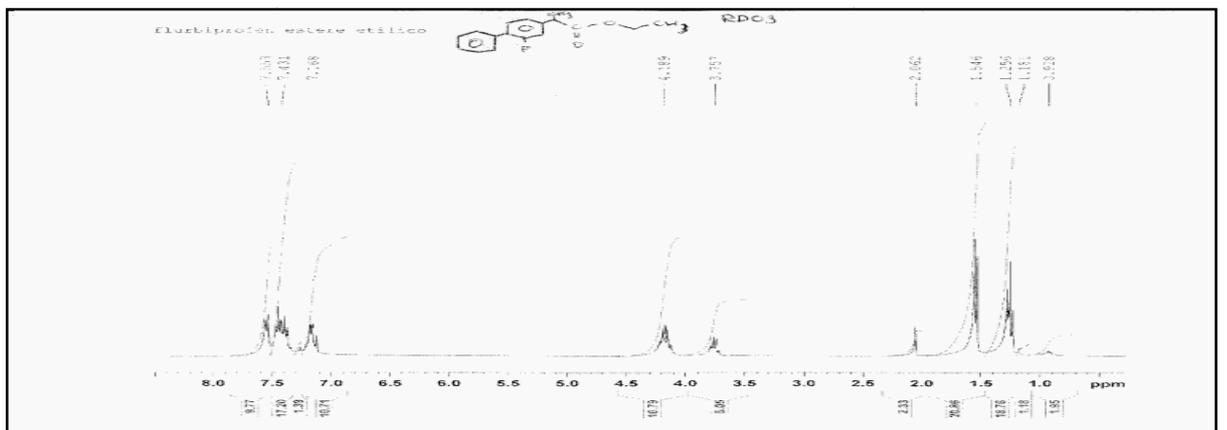
**Figura 67:** Spettri IR (a), GC-MS (b) e  $^1\text{H-NMR}$  (c) in DMSO di RD01



a)



b)



c)

**Figura 68:** Spettri FT/IR (a), GC-MS (b) e <sup>1</sup>H-NMR (c) in DMSO di RD03

I sistemi impiegati per la veicolazione dei profarmaci *RD01* e *RD03* sono delle NLC di tipo multiplo. La matrice lipidica è costituita da *Tripalmitina* e *Captex 355 EP/NF* o *Acconon CC-6*, lipidi solidi e liquidi rispettivamente. In Particolare l'*Acconon CC-6* rappresenta il corrispondente PEGhilato del *Captex 355 EP/NF* funzionalizzato con otto unità di polietilenglicole. I sistemi *V1* e *V2* sono stabilizzati da Tween 80 ed Epikuron 200 e sono stati preparati rispettivamente tramite tecnica della microemulsione e della precipitazione. I sistemi *V3* e *V4*, invece, sono stabilizzati da Sodio Taurocolato ed Epikuron 200 e sono stati preparati tramite tecnica della precipitazione (Tab.6). Su ogni sistema sono state effettuate misure preliminari di size e di potenziale  $\zeta$  ( $\psi_z$ ) al fine di confermarne l'idoneità alla veicolazione al SNC. Le modifiche apportate ai vari sistemi sono state dettate dalla necessità di migliorare i valori di PDI e di  $\psi_z$ . I sistemi *V1*, infatti, erano caratterizzati da elevati valori di PDI, migliorati dopo aver cambiato la tecnica di preparazione (sistemi *V2*). La sostituzione del Tween 80 con il Sodio Taurocolato è stata effettuata per ottenere valori di carica superficiale migliori e garantire una maggiore stabilità chimico-fisica, effetto ottenuto grazie al contributo di carica del tensioattivo anionico nei sistemi *V3*. I sistemi *V4* rappresentano l'alternativa PEGhilata ai sistemi *V3* appena descritti.

<i>SISTEMI VUOTI</i>						
	<i>MATRICE LIPIDICA</i>	<i>TECNICA</i>	<i>TENSIOATTIVI</i>	<i>SIZE (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>ψ<sub>Z</sub> (mV)</i>
<b>V1</b>	Captex 355 EP/NF (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Microemulsione	Tween 80 Epikuron 200	125,5	1	-20,30 ± 18,2
<b>V2</b>	Captex 355 EP/NF (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Precipitazione	Tween 80 Epikuron 200	217,0	0,290	-24,00 ± 4,9
<b>V3</b>	Captex 355 EP/NF (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Precipitazione	Sodio Taurocolato Epikuron 200	119,1	0,300	-32,40 ± 10,7
<b>V4</b>	Acconon-CC6 (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Precipitazione	Sodio Taurocolato Epikuron 200	200,6	0,489	-39,10 ± 7,3

**Tabella 6:** Tipologie di sistemi NLC vuoti

I sistemi pieni sono stati preparati ricalcando le caratteristiche dei sistemi vuoti V3 e V4, i migliori dal punto di vista tecnologico-farmaceutico. In totale sono stati preparati quattro sistemi pieni (tab.7), due dei quali caricati con RD01 (P2 e P4) e due caricati con RD03 (P3 e P5) con matrici PEGilate (P4 e P5) e non PEGilate (P2 e P3).

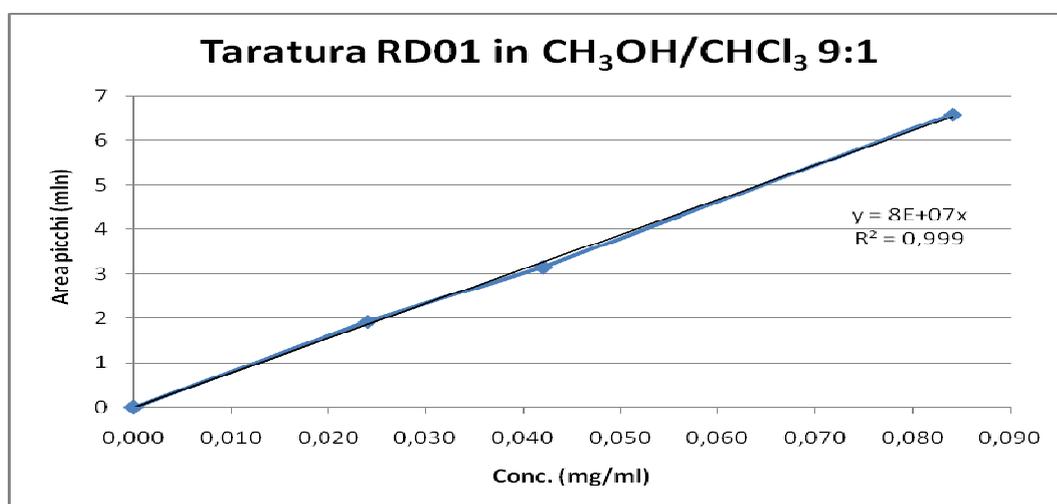
*SISTEMI CARICATI CON RD01 E RD03*

	<i>PRO-FARMACO</i>	<i>MATRICE LIPIDICA</i>	<i>TECNICA</i>	<i>TENSIO ATTIVI</i>	<i>SIZE (nm)</i>	<i>PDI</i>	$\psi_z$ (mV)
<i>P2</i>	RD01	Captex 355 EP/NF (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Precipitazione	Sodio Taurocolato Epikuron 200	174,9	0,309	-39,80 ± 6,8
<i>P3</i>	RD03	Captex 355 EP/NF (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Precipitazione	Sodio Taurocolato Epikuron 200	186,9	0,471	-34,20 ± 11,1
<i>P4</i>	RD01	Acconon-CC6 (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Precipitazione	Sodio Taurocolato Epikuron 200	251,5	0,490	-36,00 ± 11,4
<i>P5</i>	RD03	Acconon-CC6 (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Precipitazione	Sodio Taurocolato Epikuron 200	209,2	0,427	-40,20 ± 6,8

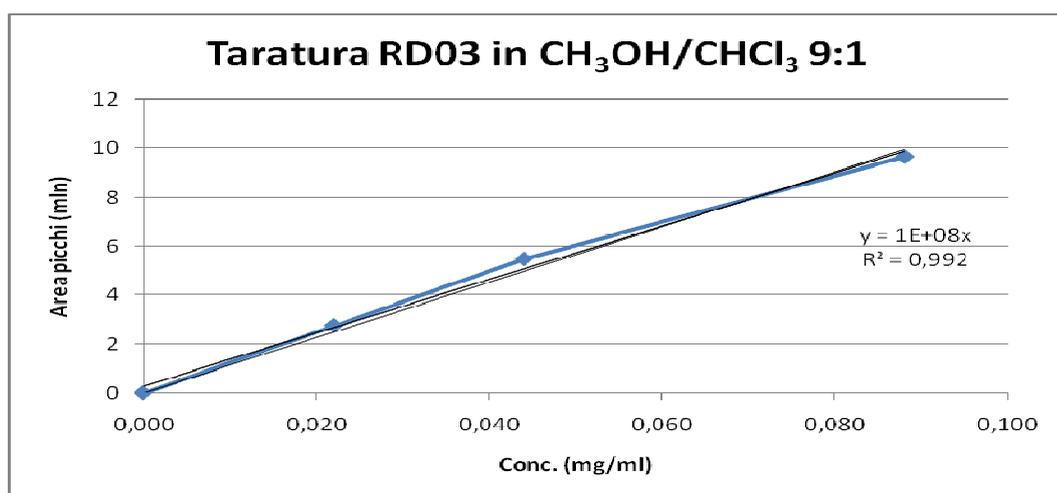
**Tabella 7:** Tipologie di sistemi NLC pieni

Tutti i campioni sono stati purificati tramite dialisi esaustiva contro acqua utilizzando membrane da dialisi con cut-off 12,000-14,000

Dalton, liofilizzati tramite freeze-drying e caratterizzati in termini di LC%. Quest'ultima caratterizzazione è stata condotta attraverso ripetute analisi HPLC quali-quantitative successive, in ogni caso, alla costruzione di una curva di taratura per ogni profarmaco. Questa è stata effettuata analizzando campioni a diverse diluizioni a concentrazione nota (fig. 69) impiegando la stessa miscela di solventi (CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> 9:1 v/v) utilizzata per effettuare gli studi di LC%.



a)



B)

**Figura 69:** Rappresentazione delle curve di taratura per RD01 (a) e RD03 (b)

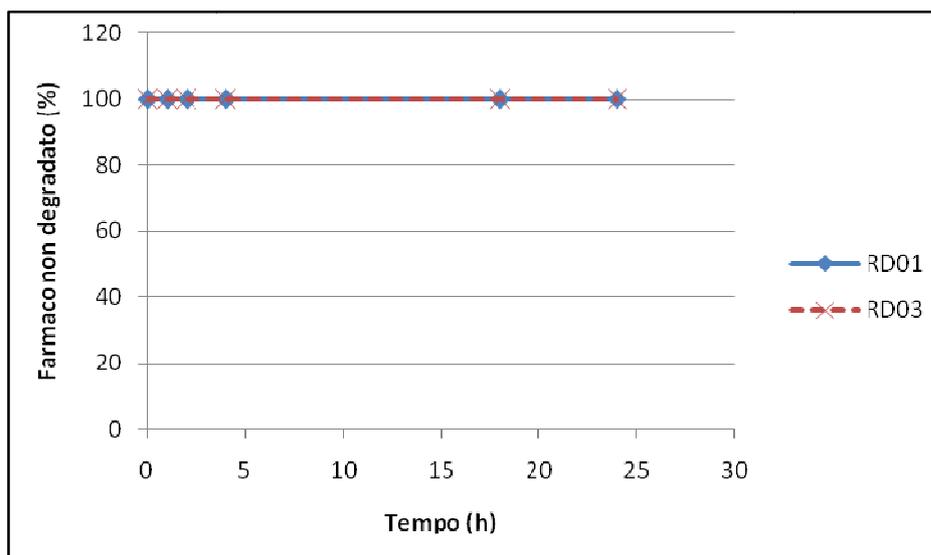
Le analisi volte alla determinazione dei valori di loading capacity , anche queste condotte tramite HPLC, hanno restituito valori pressoché simili eccetto che per i sistemi PEGilati caricati con RD03, che riescono ad incorporare meno principio attivo. In ogni caso i valori ottenuti sono più che validi e si attestano tra il 7,5% ed il 17,50% (tab.8).

<i>LC%</i>					
	<i>PRO-FARMACO</i>	<i>MATRICE LIPIDICA</i>	<i>TENSIOATTI VI</i>	<i>Q.TÀ DI FARMACO (mg)</i>	<i>L.C. %</i>
<i>P2</i>	RD01	Captex 355 EP/NF (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Epikuron 200 Sodio Taurocolato	40,00	17,54 %
<i>P4</i>	RD01	Acconon-CC6 (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Epikuron 200 Sodio Taurocolato	40,00	12,74 %
<i>P3</i>	RD03	Captex 355 EP/NF (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Epikuron 200 Sodio Taurocolato	40,00	12,27 %
<i>P5</i>	RD03	Acconon-CC6 (23,1% p/p) Tripalmitina (76,9% p/p)	Epikuron 200 Sodio Taurocolato	40,00	7,50%

**Tabella 8:** Valori di LC% relativi ai sistemi NLC caricati con i profarmaci

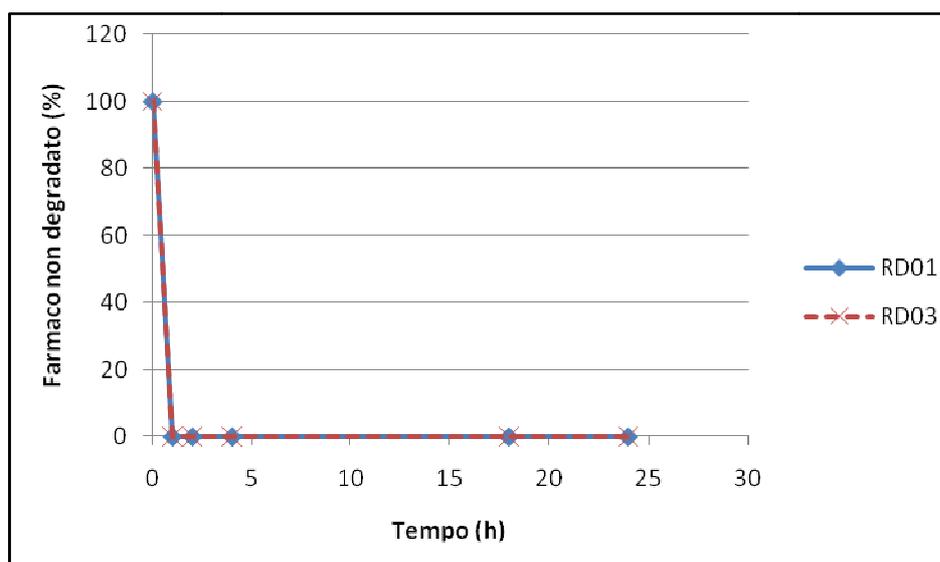
Preliminarmente allo studio delle cinetiche di rilascio, sono stati condotti degli studi di stabilità sui profarmaci per determinarne il comportamento chimico-fisico in PBS a pH 7.4 (in assenza e in presenza di enzimi esterasici) ed in plasma umano. Tali mezzi, infatti sono successivamente stati impiegati per studiare proprio le cinetiche di rilascio e risulta chiaro che è necessario avere un quadro completo che descriva eventuali processi degradativi a carico dei principi attivi. Tutti i saggi sono stati condotti sotto costante agitazione magnetica a 37 °C e fino a 24 h.

Dagli esperimenti messi in atto in solo PBS a pH 7.4 i profarmaci RD01 e RD03 mostrano avere una buona stabilità in quanto non subiscono alcun processo degradativo e restano intatti per tutta la durata dell'esperimento (fig.70) mostrando un comportamento identico.



**Figura 70:** Prove di degradazione di RD01 e RD03 in PBS a pH 7.4 in assenza di esterasi

Al fine di determinare la resistenza all'idrolisi del legame estereo, gli stessi esperimenti in PBS a pH 7.4 sono stati condotti aggiungendo delle aliquote di enzimi ad attività esterasica derivati da plasma suino. In queste condizioni entrambi i profarmaci vanno incontro a rapida degradazione già a partire da 1h con cinetiche che, anche in questo caso, sono perfettamente sovrapponibili (fig.71).



**Figura 71:** Prove di degradazione di RD01 e RD03 in PBS a pH 7.4 in presenza di esterasi

Infine gli esperimenti sono stati effettuati in plasma umano, condizioni che senza dubbio ricalcano al meglio il comportamento dei principi attivi in vivo. In questo caso le curve di degradazione mostrano andamenti più gradualmente e nettamente diversi per RD01 che, rispetto a RD03, sembra essere più resistente all'azione idrolitica delle esterasi plasmatiche. Questo comportamento, probabilmente, è da imputare ad un moderato impedimento sterico determinato dalla catena idrocarburica dell'1-esanolo caratteristica di RD01 nei confronti del

sito di legame enzimatico. Questo fenomeno risulta assente per RD03 che a 4 h risulta già idrolizzato per più del 70% (fig. 72).

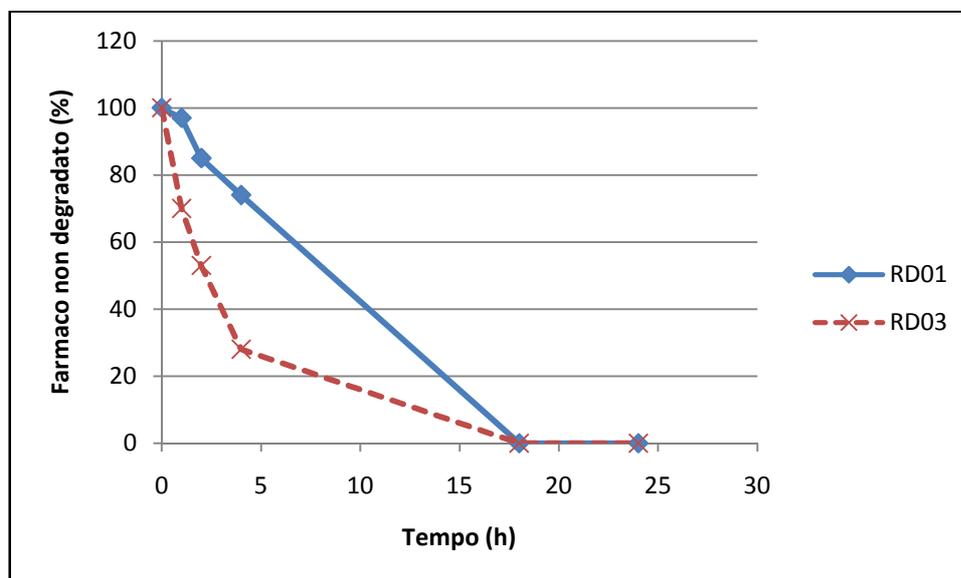
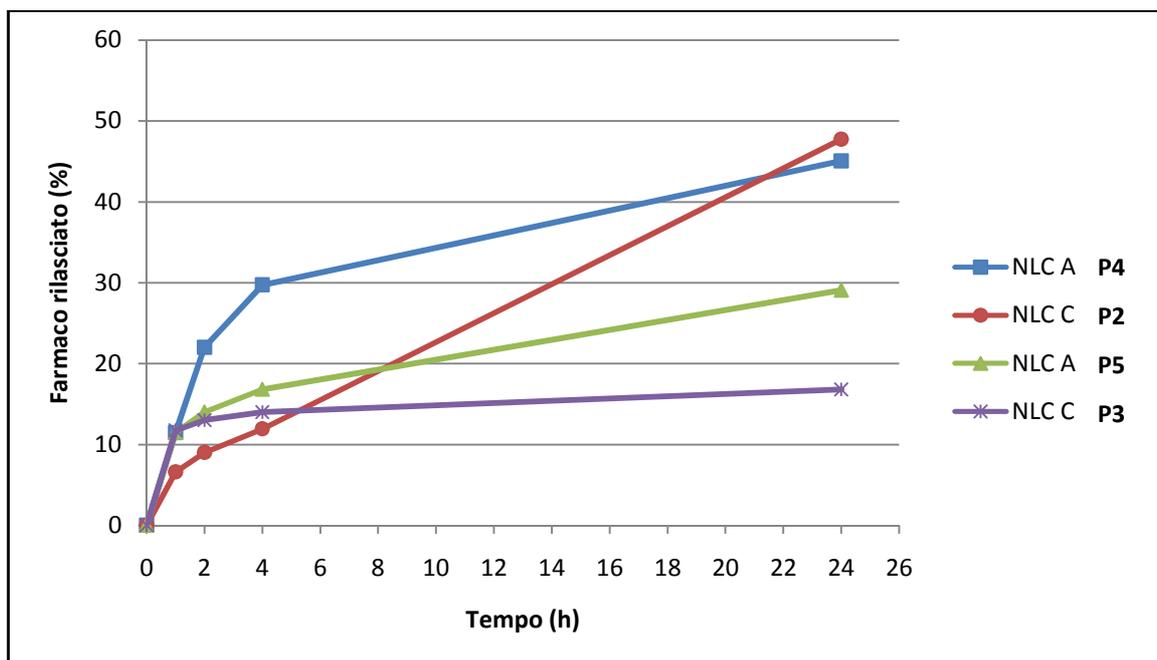


Figura 72: Prove di degradazione di RD01 e RD03 in plasma umano

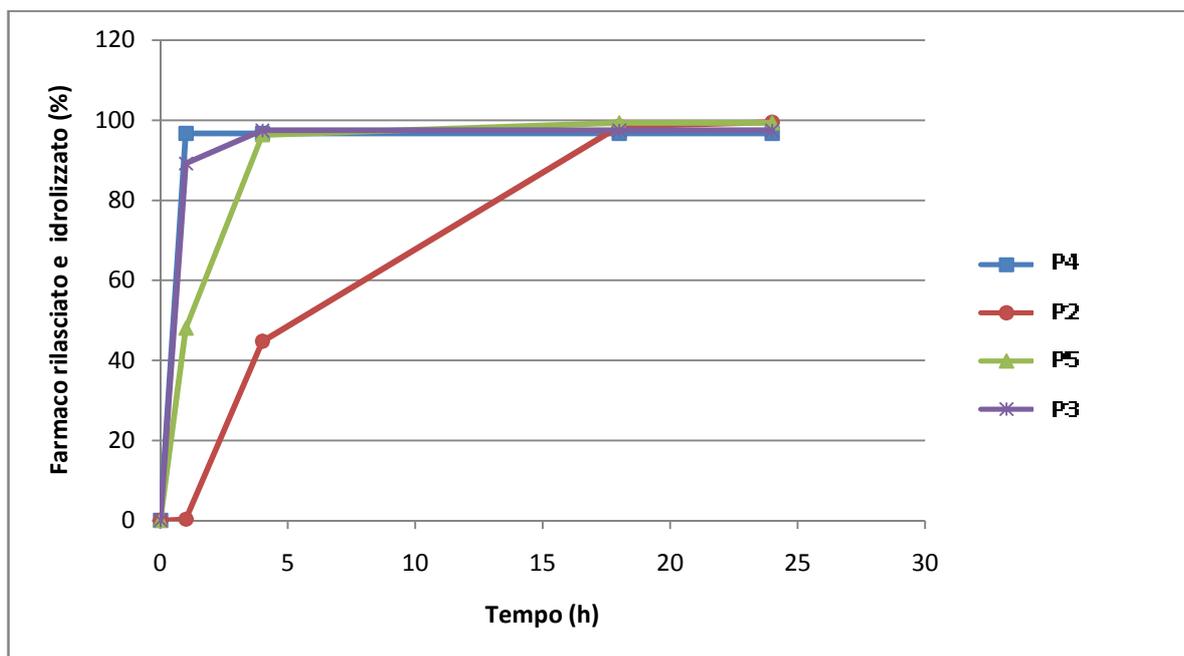
I profili di rilascio dei due esteri del Flurbiprofen dalle NLC sono stati studiati in condizioni analoghe a quelle appena descritte per lo studio delle cinetiche di degradazione. I quattro sistemi NLC (due per ogni profarmaco) sono stati dispersi nei diversi mezzi (PBS a pH 7.4 in presenza ed in assenza di esterasi e plasma umano) ed ai tempi prestabiliti sono stati analizzati via HPLC previa estrazione con 1-ottanolo. In PBS a pH 7.4 le cinetiche di rilascio risultano più rapide per i sistemi (P2 e P4) caricati con RD01 (estere esilico) che rilasciano fino a circa il 49% a 24h. I sistemi caricati con RD03 (P3 e P5), invece, rilasciano in 24h circa il 29% di profarmaco (fig.73).



**Figura 73:** Cinetiche di rilascio in PBS a pH 7,4 in assenza di esterasi

Successivamente i profili di rilascio dei due esteri del Flurbiprofen dalle NLC sono stati studiati in PBS a pH 7.4 in presenza di enzimi ad attività esterasica nello stesso range di tempo considerato per gli studi di degradazione del farmaco.

Ai tempi prestabiliti è stato analizzato ogni singolo campione attraverso tecniche di estrazione liquido-liquido con 1-ottanolo e successiva analisi HPLC. I sistemi P2 hanno mostrato spiccata azione protettiva nei confronti del profarmaco caricato (RD01) che risulta completamente idrolizzato solo dopo 18 h (fig. 74) mentre, durante le analisi di stabilità, RD01 non veicolato mostrava idrolisi completa già ad 1 h (fig. 71).



**Figura 74:** Cinetiche di rilascio di RD01 e RD03 in PBS a pH 7,4 in presenza di esterasi suine

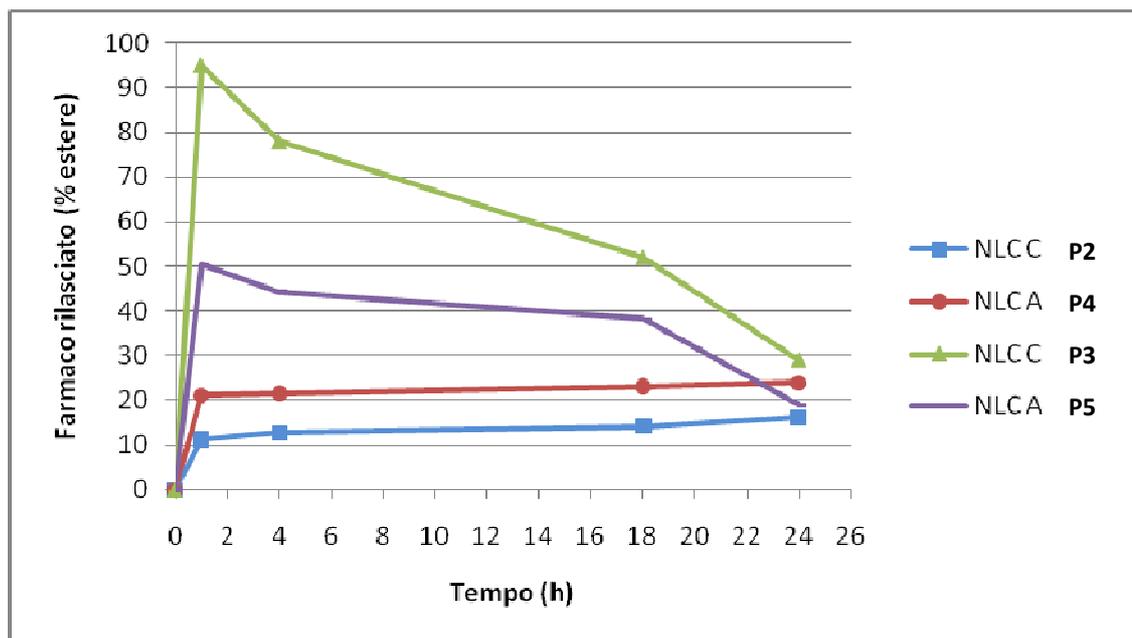
Dall'andamento di queste curve si può dedurre che i sistemi rilasciano più lentamente quanto più la matrice lipidica è affine ai profarmaci: l'estere esilico, più affine alla matrice lipidica non PEGhilata, viene rilasciato e idrolizzato più lentamente rispetto all'estere etilico.

Per quanto riguarda i sistemi PEGhilati, invece, la situazione risulta invertita in quanto l'estere etilico, più affine alla matrice PEGhilata, mostra cinetiche più lente rispetto a quelle dell'estere esilico. Infine sono state analizzate le cinetiche di rilascio in plasma umano determinando, anche in questo caso, la quantità di profarmaco che viene idrolizzato in seguito all'azione enzimatiche delle esterasi plasmatiche. Gli studi sono stati condotti sospendendo i campioni P2, P3, P4 e P5 in plasma umano ed incubandoli in un bagno termostato

a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , sotto continua agitazione magnetica. Agli intervalli di tempo prestabiliti i campioni sono stati adeguatamente trattati con  $\text{CH}_3\text{OH}$  e successiva centrifugazione al fine di far precipitare le proteine plasmatiche ed analizzare la quantità di farmaco rilasciato. Infine le analisi sono state effettuate tramite HPLC previa filtrazione su filtri di nylon con diametro medio di  $0,45 \mu\text{m}$ .

Anche in questo caso risulta evidente che, analogamente a quanto descritto per i rilasci in PBS a pH 7.4 in presenza di esterasi, il comportamento dei sistemi è dettato dall'affinità che ogni singolo profarmaco possiede nei confronti delle diverse matrici lipidiche. Gli esteri esilici sono rilasciati più velocemente dalle matrici PEGhilate che, invece, rilasciano più lentamente gli esteri etilici (fig. 75). Anche in questo caso le matrici lipidiche giocano un ruolo fondamentale nella protezione del principio attivo che viene idrolizzato più lentamente.

L'inflessione negativa che si osserva dopo 18 h è imputabile ad un legame dei profarmaci con le proteine plasmatiche.



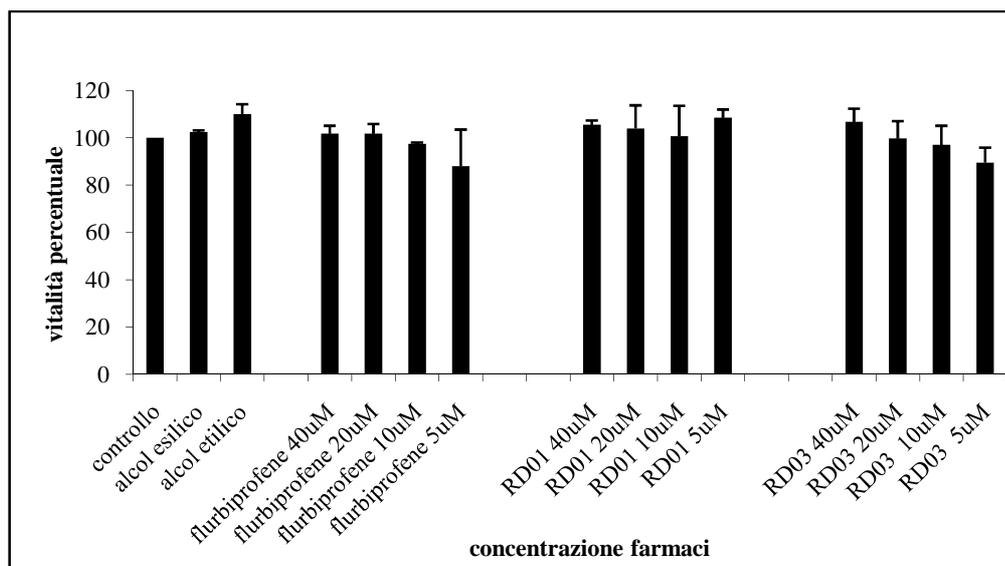
**Figura 75:** Cinetiche di rilascio di RD01 e RD03 in plasma umano

Allo scopo di determinare gli effetti citotossici dei sistemi, sono stati effettuati una serie di saggi citotossici volti a determinare la biocompatibilità sia dei sistemi che dei profarmaci. Tutti i saggi di vitalità cellulare sono stati condotti tramite il reattivo MTT. Questa tipologia di test serve a valutare la diminuzione di vitalità delle cellule e sfrutta proprio l'azione di un agente ossidante cromogeno (MTT bromide). Esso è un sistema policiclico ( $C_{18}H_{16}BrN_5S$ ) dotato di un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico formando, per apertura dell'anello tetrazolico, un composto cromogeno azotato detto *formazano*. Quest'ultimo forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare ai quali le membrane risultano sostanzialmente impermeabili. In definitiva è permessa l'entrata della molecola nella cellula, ma non l'uscita del suo metabolita per cui, se l'MTT è stato

correttamente metabolizzato, cioè se le catene di trasporto elettronico sono ancora metabolicamente attive, la trasformazione dell'MTT vede un viraggio della molecola da giallo a blu scuro-violetto, pertanto un saggio colorimetrico (ad esempio una lettura allo spettrofotometro) servirà per stimare il numero di mitocondri attivi e quindi il numero di cellule vitali nel campione.

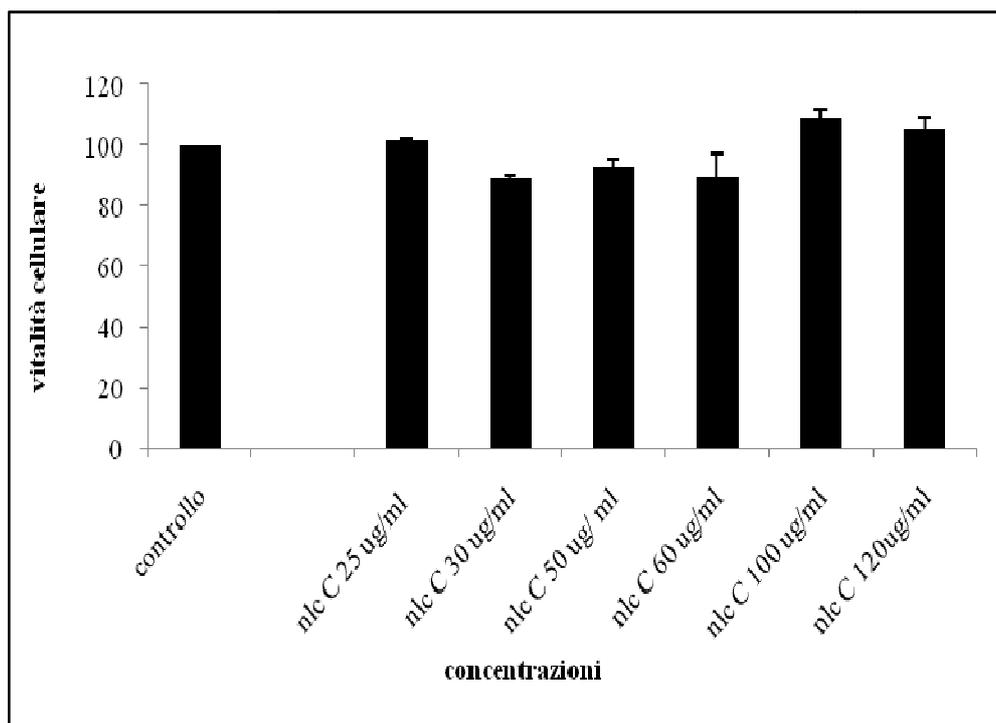
Tutti i saggi di vitalità cellulare sono stati condotti su colture cellulari di neuroblastoma umano LAN5. Tutti i saggi sono stati condotti preliminarmente sui sistemi vuoti e sui profarmaci non veicolati. In seguito sono stati analizzati i sistemi caricati con i profarmaci al fine di valutare le differenze in termini di citotossicità dei profarmaci liberi rispetto a quelli veicolati.

A questo scopo sono stati impiegati i diversi campioni a diversi step di concentrazione in un range compreso tra 5  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$  per quanto riguarda i profarmaci e tra 20,5  $\mu\text{g/ml}$  e 120  $\mu\text{g/ml}$  per quanto riguarda i sistemi vuoti. Le concentrazioni dei sistemi pieni sono riportate in  $\mu\text{M}$  perché si riferiscono alla quantità di principio attivo totale che hanno caricato e che, quindi, potrebbe rendersi biodisponibile nell'ambiente intracellulare e sono comprese in un range che va da 10  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ . Tutti i profarmaci non veicolati, ossia il'R-Flurbiprofen, gli alcoli etilico ed esilico e gli esteri RD01 e RD03, non hanno mostrato avere effetti citotossici rilevanti (fig. 76).

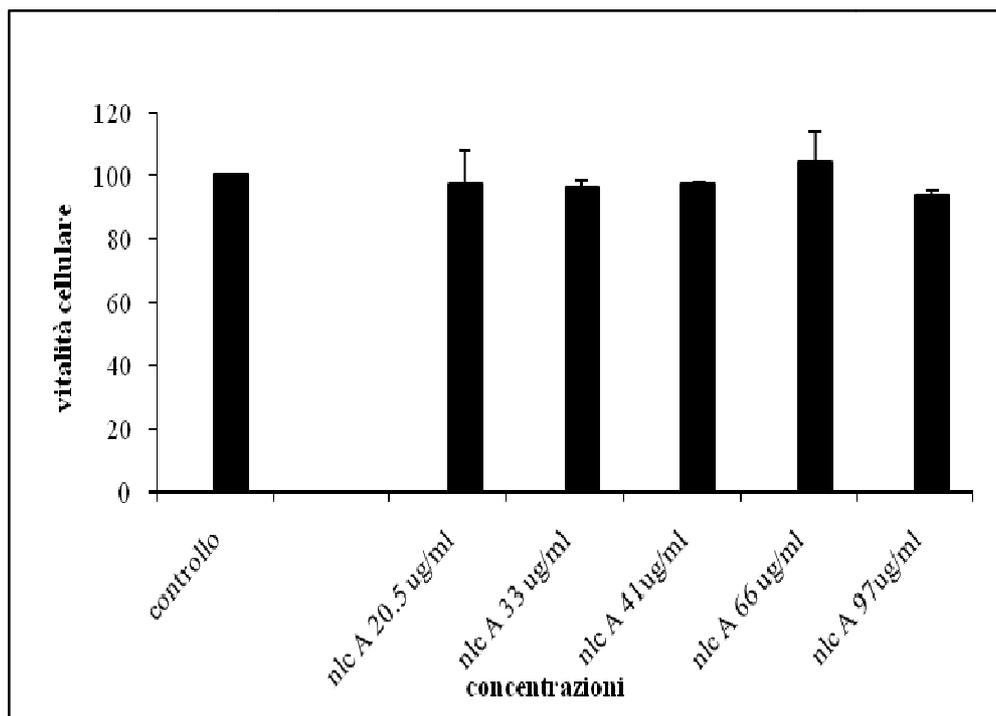


**Figura 76:** Saggi MTT per farmaci e profarmaci non veicolati

Analogamente, sia le matrici vuote non PEGhilate (fig. 77a) che quelle PEGilate (fig. 77b) hanno mostrato possedere un'ottima biocompatibilità in quanto completamente prive di effetti citotossici.



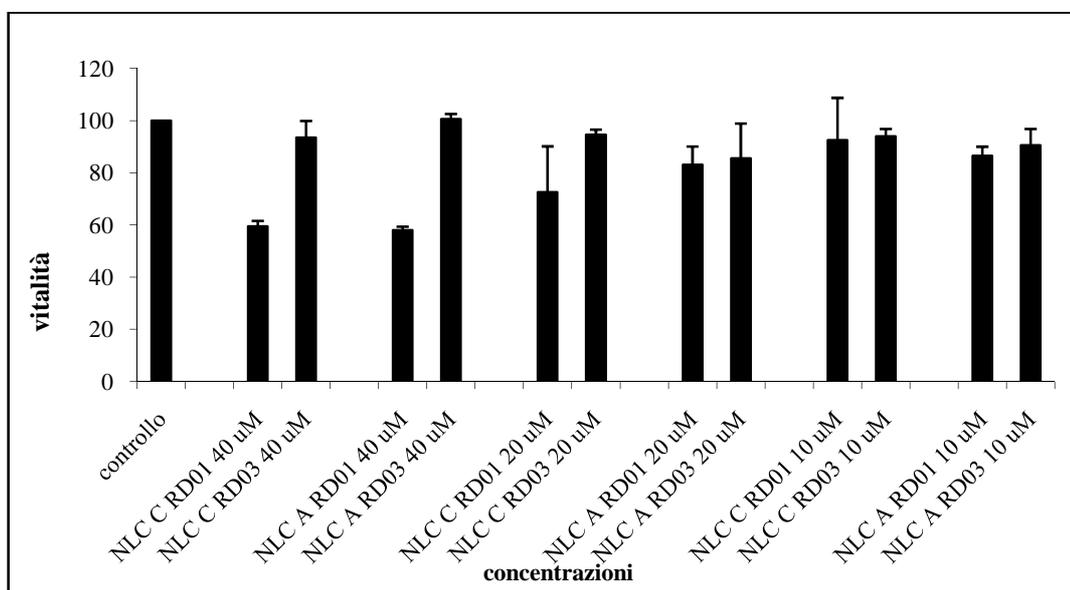
a)



b)

**Figura 77:** Saggi di vitalità cellulare relative alle matrici lipidiche non PEGilate (a) e PEGilate (b)

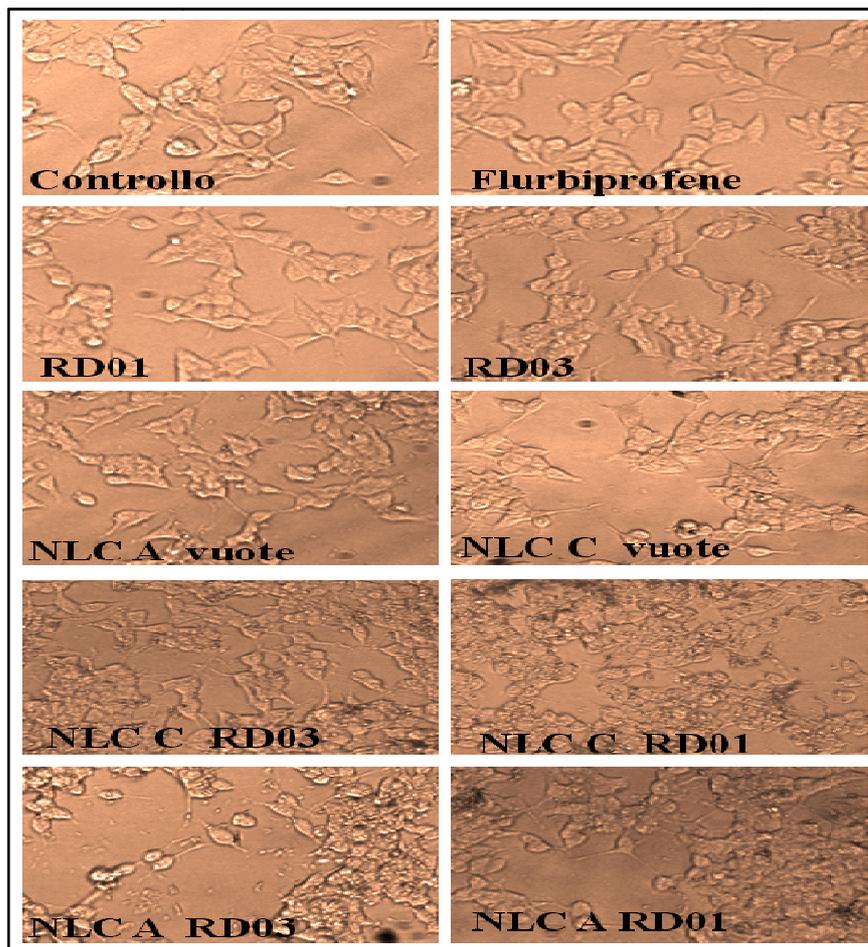
I saggi di citotossicità condotti sui sistemi caricati con i profarmaci, invece, hanno fornito risultati senza dubbio soddisfacenti. I campioni a concentrazione 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  hanno restituito valori di vitalità cellulare simili a quelli ottenuti con i corrispettivi saggi dei farmaci e dei profarmaci liberi e delle sole matrici lipidiche. I sistemi P2 e P4, invece, hanno mostrato avere una spiccata azione citotossica nei confronti delle linee cellulari impiegate (fig. 78).



**Figura 78:** Saggi di citotossicità relativa ai sistemi NLC caricati con i profarmaci esterei

Questo dato suggerisce che, vista l'assenza di citotossicità agli stessi valori di concentrazione di RD01 libero e delle corrispondenti matrici lipidiche "vuote", l'azione citotossica è da imputare a fenomeni di uptake promossi dai sistemi NLC e, in particolar modo, dall'1-esanolo liberato in seguito a fenomeni di idrolisi del profarmaco estereo.

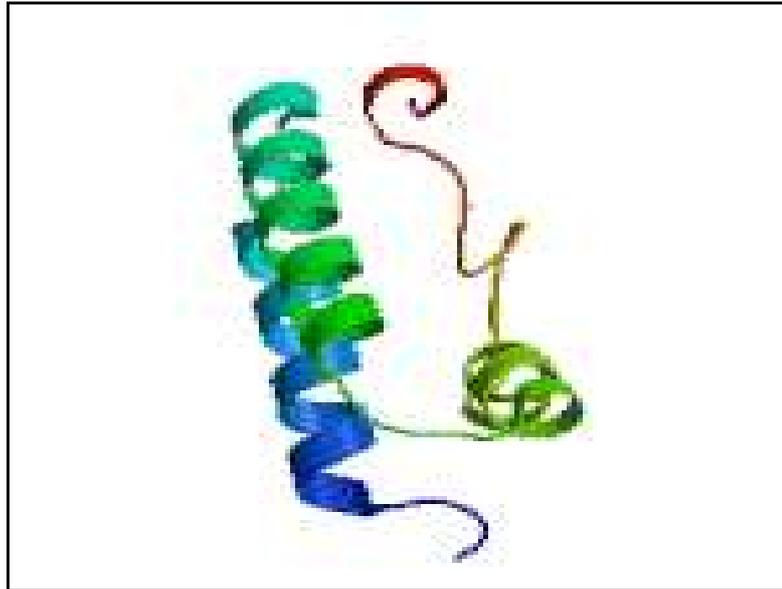
Questo dato è stato confermato anche da un'analisi morfologica cellulare condotta tramite microscopia ottica (fig. 79).



**Figura 79:** Analisi morfologica tramite microscopia ottica di cellule LAN5 trattate con profarmaci liberi e veicolati da NLC a concentrazione 40  $\mu$ M

### **3.3 ParJ2 E PROCESSI ALLERGICI**

*ParJ2* è una proteina che costituisce uno dei principali componenti del polline della *Parietaria judaica*, una dicotiledone appartenente alla famiglia delle *Urticaceae*. Essa è caratterizzata da un lungo periodo di impollinazione, che raggiunge il suo acme tra il mese di Maggio e quello di Giugno. Inoltre, la sua ampia diffusione nelle zone rurali ed urbane della Spagna, del sud della Francia, dell'Italia, della Grecia, dell'Asia Mediterranea e del Nord Africa, ne fa uno dei principali allergeni diffusi nel bacino del Mediterraneo, che per questo è responsabile delle più frequenti sintomatologie allergiche che interessano la popolazione di quest'area. In particolare, diversi studi epidemiologici hanno mostrato che, circa il 50% dei soggetti che soffrono di allergie nel sud d'Italia, mostrano un'ipersensibilità accertata nei confronti dei componenti del polline di *Parietaria judaica* e che, più della metà di questi soggetti, manifestano sintomi allergici gravi come asma e crisi bronchiali<sup>184</sup>. La proteina *ParJ2* è caratterizzata da un peso molecolare di 11344 Da e da una sequenza amminoacidica costituita da 102 unità monomeriche ordinate secondo una struttura secondaria ben conservata caratterizzata da un motivo *alfa-alfa-alfa-alfa-beta*, caratteristiche che la rendono solubile in acqua e le conferiscono un punto isoelettrico pari a 8,83 (fig.80).

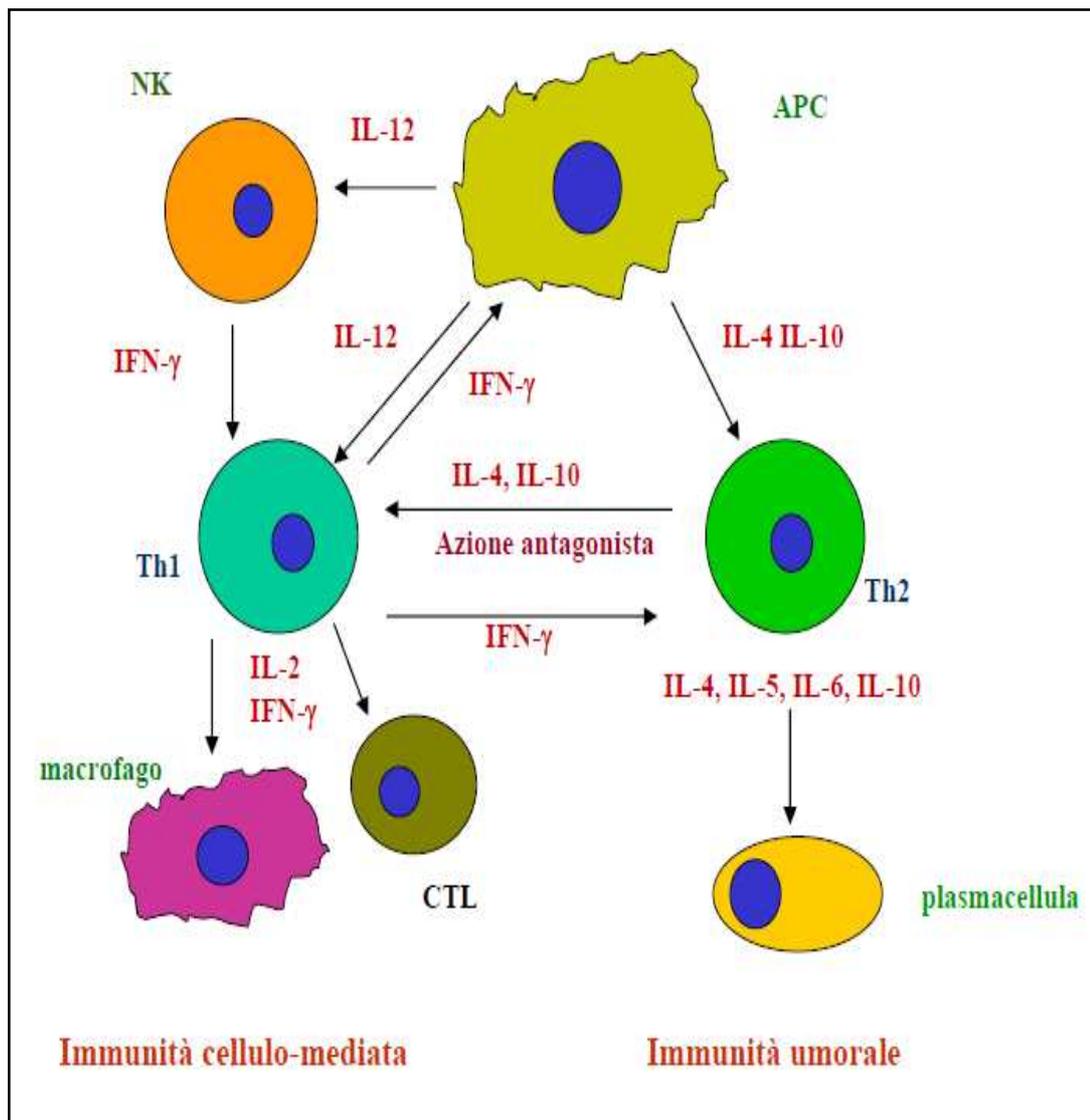


**Figura 80:** Struttura tridimensionale di ParJ2

La sua struttura tridimensionale è determinata dalla presenza di otto residui di cisteina, amminoacido solforato che ne stabilizza la struttura secondaria mediante la formazione di quattro ponti disolfuro e consente la formazione di una tasca idrofobica in grado di accogliere molecole di natura affine. Per questo motivo si pensa che ParJ2 faccia parte della vasta famiglia di proteine definite *non-specific Lipid Transfer Protein (ns-LTP)*, una classe di proteine deputate al trasporto di sostanze di natura lipidica attraverso la complessa struttura fosfolipidica di membrana. Come già accennato, tale proteina è un potente allergene in grado di scatenare risposte allergiche in soggetti ipersensibili e per questo motivo è attualmente oggetto di numerosi progetti di ricerca.

E' bene, a questo punto, operare una distinzione tra le appena citate *risposte allergiche* e le *intolleranze*.

I fenomeni allergici possono essere intesi come delle reazioni infiammatorie abnormi, generate da un funzionamento alterato del complesso sistema immunitario. Normalmente, infatti, l'immunità viene distinta in *immunità aspecifica* (o *cellulo-mediata*) ed *immunità specifica* (o *umorale*) (fig. 81).



**Figura 81:** Distinzione tra immunità *cellulo-mediata* e immunità *umorale*

Nel primo caso, i fenomeni di risposta immunitaria sono mediati da una serie di linee cellulari e, in maggior parte, da cellule definite *natural killer* (NK). Tali linee cellulari promuovono un attacco nei confronti di una serie di microorganismi patogeni o parte di essi (*LPS batterici, endotossine, ecc...*), garantendo una risposta immunitaria prontamente disponibile. Più in particolare le cellule NK, dopo aver fagocitato l'antigene, ne esprimono alcuni frammenti sul versante extracellulare della loro membrana plasmatica presentandolo ai *linfociti T CD4<sup>+</sup>*. Questi, riconoscendo gli antigeni espressi dalle cellule NK come uno specifico recettore, si legano ad esso inducendo la produzione di *IL-1, IL-2* e di *IFN- $\gamma$* , mediatori che provocano la divisione e la differenziazione delle cellule *T CD4<sup>+</sup>* in *linfociti T helper di tipo 1 (T<sub>H1</sub>)*. Questi attiveranno i *linfociti B* ed i *linfociti T memoria* che a loro volta si differenzieranno solo se verranno nuovamente a contatto con il medesimo antigene. I linfociti *T<sub>H1</sub>* producono *IFN- $\alpha$*  ed *IFN- $\gamma$*  e promuovono la produzione della maggior parte delle classi di *immunoglobuline (Ig)* inibendo, contemporaneamente, la produzione di *immunoglobuline del tipo E*.

Nel secondo caso l'immunità è più specifica verso un particolare tipo di sostanza ma, affinché il processo si renda completamente funzionale, è necessario un intervallo di tempo più dilatato rispetto a quello che caratterizza i fenomeni immunitari aspecifici, poiché il fenomeno chiave è rappresentato dalla produzione di anticorpi specifici modulati dall'azione di *plasmacellule*.

Il sistema immunitario di un tipico soggetto allergico risulta sensibile a sostanze fondamentalmente innocue definite *allergeni* e per le quali non sarebbe necessaria una risposta immunitaria. Per questo motivo, se un soggetto allergico viene a contatto con un allergene, sviluppa

una risposta immunitaria non convenzionale che genera un processo infiammatorio anche grave che può interessare diversi distretti (respiratorio, oculare, cutaneo, sistemico, ecc...) e può manifestarsi anche con sintomatologie che richiedono un trattamento di estrema urgenza (shock anafilattico).

Le intolleranze, invece, sono dei fenomeni quasi esclusivamente di origine alimentare e sono per questo definite come una tendenza a sviluppare ipersensibilità verso una certa sostanza o un determinato alimento. Gli alimenti più frequentemente responsabili del disturbo sono: il latte, lo zucchero, la farina, il lievito di birra, l'uovo e i cosiddetti "*cibi nascosti*", come gli additivi alimentari, i coloranti, gli emulsionanti, la lecitina di soia e quant'altro si possa trovare nelle preparazioni alimentari. Rispetto alle allergie, l'intolleranza ha una reazione molto più lenta, insidiosa e tardiva, caratterizzata da sintomi sfumati (irascibilità, affaticamento e nervosismo) che spesso rendono difficile la diagnosi da parte del medico. In alcuni casi l'intolleranza può addirittura restare latente nei primi anni di vita, per poi manifestarsi nell'età adulta. Per quanto riguarda i sintomi, ogni caso può evidenziare un quadro clinico diverso: dalla cefalea alle coliche addominali, dal catarro alla febbre, dall'eczema alla dermatite. Una fondamentale differenza tra allergia e intolleranza è la caratteristica della seconda di essere *dose-dipendente*, cioè legata alla quantità di alimento che viene ingerito, mentre le allergie sono caratterizzate da un meccanismo *dose-indipendente*.

Oggi, per distinguere i vari tipi di allergie e di intolleranze, si è soliti fare riferimento alla *Classificazione di Gell e Coombs*, uno schema che distingue le varie forme di ipersensibilità in quattro gruppi differenti definiti I tipo, II tipo, III tipo e IV tipo. Questa

classificazione tiene conto principalmente del tempo necessario affinché i sintomi o la positività dei test cutanei si manifestino, del tipo di antigene coinvolto (farmaci, alimenti, ecc...) e del particolare meccanismo che viene attivato.

Le reazioni di ipersensibilità del I tipo (ipersensibilità immediata) sono quelle che comunemente vengono definite come *allergie* e sono mediate dall'azione di anticorpi altamente selettivi nei confronti di un *antigene* (o *allergene*) definiti *immunoglobuline E (IgE)*. Queste, una volta formato un complesso con l'allergene, si legano ad un recettore specifico (recettore *FcεRI*) e scatenano meccanismi che portano alla liberazione di potenti mediatori vasoattivi e infiammatori (*istamina, triptasi, ecc...*). Inoltre dopo poche ore *mastociti* e *basofili* rilasciano anche alcune citochine proinfiammatorie (*IL-4* e *IL-13*), sostanze in grado di causare dilatazione dei vasi sanguigni, aumento della permeabilità capillare, ipersecrezione ghiandolare e contrazione della muscolatura liscia. La concentrazione delle IgE circolanti è gestita dall'azione opposta ed equilibrata dei *linfociti helper*  $T_{H2}$  e  $T_{H1}$ . I primi promuovono direttamente la produzione di IgE, mentre i secondi ne inibiscono la produzione tramite il già citato meccanismo che vede implicata l'azione di *IFN-γ*. Alcuni esempi di reazioni allergiche di I tipo sono l'*asma allergico*, la *rinite allergica stagionale*, l'*anafilassi sistemica (shock anafilattico)*, le reazioni alle punture di insetti e le reazioni allergiche ai farmaci.

Le reazioni di II tipo (o *citotossiche*), sono quelle che avvengono quando il contatto con l'antigene provoca l'attivazione delle cellule T killer o dei macrofagi, che tendono a posizionarsi sulla superficie di alcune cellule ricoprendole sino a indurne la morte (fenomeno di *immunoaderenza*). Esempi di malattie nelle quali si ha una

ipersensibilità di questo tipo la *leucopenia* (diminuzione del numero di leucociti presenti nel sangue circolante), l'*anemia perniciosa* (sviluppo di anticorpi contro le cellule parietali gastriche e il fattore intrinseco, una proteina necessaria all'assorbimento della vitamina B<sub>12</sub>) o la *sindrome di Goodpasture* (malattia autoimmune nella quale vengono prodotti anticorpi contro determinate strutture dei glomeruli, le strutture funzionali più importanti del tessuto renale).

Le reazioni di III tipo, definite anche *immunocomplesse*, sono le reazioni che derivano dal deposito di complessi circolanti solubili antigene-anticorpo all'interno dei vasi o nei tessuti. In pratica il contatto con l'antigene provoca una eccessiva produzione di anticorpi, i cui complessi in eccedenza tendono a precipitare rapidamente vicino alla sede di ingresso dell'antigene. Le malattie che maggiormente sono causate o accompagnate da reazioni di III tipo sono la *polmonite con ipersensibilità*, l'*aspergillosi broncopolmonare* (malattia causata da funghi microscopici del genere *Aspergillus*, che si manifesta con crisi asmatiche), la *glomerulonefrite cronica membrano-proliferativa*, la *poliarterite* (infiammazione degli strati di una arteria o di tutta la rete arteriosa) o la *crioglobulinemia* e le malattie renali associate.

Infine, le reazioni di IV tipo (o *ritardate*), sono quelle reazioni provocate dai linfociti sensibilizzati (cellule T) dopo il contatto con l'antigene. In sostanza, ciò che differenzia le reazioni di tipo IV da tutte le altre è che il meccanismo di ipersensibilità non dipende più dagli anticorpi, bensì dai linfociti sensibilizzati. Esempi di malattie in cui intervengono reazioni di questo tipo sono le *dermatiti da contatto*, il *rigetto degli allotrapianti* (trapianti di organi), i *granulomi* dovuti ad organismi intracellulari, la *tiroidite* (infiammazione della ghiandola

tiroide) o *l'encefalomielite* (infiammazione del cervello) da vaccinazione antirabbica.

L'approccio farmacologico alle sintomatologie allergiche è finalizzato sia a contrastare la formazione dei mediatori appena descritti, sia a prevenire la manifestazione del fenomeno allergico. Nel primo caso ci si avvale dell'uso di antistaminici, un trattamento del tutto sintomatico volto alla riduzione della quantità di istamina liberata o all'abbattimento della sua concentrazione ematica. Per quanto riguarda la prevenzione sono stati progettati dei vaccini in grado di ridurre o evitare del tutto la formazione di IgE in risposta ad allergeni e, di conseguenza, lo sviluppo della sintomatologia conseguente. Questo trattamento è l'unico tra quelli disponibili che agisce "a monte" della cascata dei fenomeni biologici che scatenano le crisi allergiche. Il vaccino, infatti, è costituito, oltre che da una serie di sostanze adiuvanti e stabilizzanti, da estratti di allergeni verso cui il soggetto è ipersensibile; in questo modo è possibile indurre una down regulation della produzione di IgE, i cui livelli risultano sensibilmente ridotti in soggetti vaccinati esposti all'allergene, rispetto a soggetti non vaccinati esposti allo stesso allergene<sup>185, 186</sup>. Più in particolare, la down regulation delle IgE circolanti è dovuta alla modifica del delicato equilibrio tra  $T_{H2}$  e  $T_{H1}$  appena descritto, che si sposta verso questi ultimi. Questo switch  $T_{H2}/T_{H1}$  è stato studiato attraverso il dosaggio dei mediatori chimici rilasciati dalle cellule effettrici nel torrente ematico o mediante la quantificazione delle stesse cellule nei tessuti bersaglio dell'infiammazione allergica<sup>187</sup>.

Un limite all'utilizzo dei vaccini è costituito dalle vie di somministrazione e dalla frequenza con cui queste devono essere effettuate. I vaccini, infatti, vengono in genere somministrati

attraverso frequenti iniezioni sottocutanee, generando un aumento dei rischi di shock anafilattico legato ad un accidentale sovradosaggio. Per questo motivo, durante questo lavoro sperimentale, ci si è dedicati alla progettazione ed alla realizzazione di sistemi nanostrutturati in grado di incorporare l'antigene PARJ2 e di farlo entrare direttamente in contatto con i mastociti, ottenendo gli stessi effetti di un vaccino. In particolare ci si è dedicati alla preparazione di nanoparticelle a partire da lipidi attualmente utilizzati come eccipienti in campo farmaceutico per la preparazione di diverse forme di dosaggio. L'obiettivo è quello di creare dei vaccini somministrabili per via diverse da quelle classiche, evitando nello stesso tempo l'azione proteolitica degli enzimi presenti nel tratto gastroenterico. Inoltre tali sistemi potrebbero migliorare sensibilmente le cinetiche di rilascio della proteina aumentandone, di fatto l'emivita. Inoltre sarebbe possibile migliorare sensibilmente la clearance dei pazienti riducendo la frequenza delle somministrazioni che, attualmente, prevede numerose e ripetute iniezioni generando anche danni tissutali a livello del punto di inoculo.

### ***3.3.1 Preparazione di nanovettori per la veicolazione di ParJ2***

Il lavoro sperimentale che ha portato alla realizzazione dei carriers lipidici atti a veicolare la proteina ParJ2 è stato lungo e complesso sia nella fase di messa a punto della metodica di preparazione più adeguata, sia nella fase di determinazione della metodica di caratterizzazione di Parj 2 tramite HPLC. Le difficoltà sono legate sia alla ben nota labilità chimico-fisica delle sostanze di origine proteica che alla tendenza che la proteina in questione mostra verso il fenomeno di aggregazione. Inoltre è stato necessario progettare e preparare diversi sistemi nanostrutturati vuoti prima di ottenere sistemi con caratteristiche ottimali ed adeguate alla veicolazione di ParJ2 (tab.9).

Per la realizzazione dei sistemi carrier è stata utilizzata la tecnica dell'emulsione multipla A/O/A, il cui impiego permette di intrappolare sostanze idrofile e di garantire nello stesso tempo una elevata capacità di caricamento. Dopo la preparazione tutti i sistemi sono stati purificati tramite dialisi esaustiva contro acqua in membrane da dialisi con cut-off di 12000÷14000 Da e caratterizzati in termini di size (tramite PCS) e di potenziale  $\zeta$  (mobilità elettroforetica).

Inizialmente sono stati preparati dei sistemi caratterizzati da un matrice lipidica costituita da *tripalmitina*, (trigliceride dell'acido palmitico) stabilizzati da tensioattivi quali il *Tween 80* e l'*Epikuron 200* (campione A). Tuttavia i risultati dell'analisi dimensionale hanno restituito valori troppo elevati e, per migliorare i sistemi, è stata modificata la quantità di Epikuron 200, aumentandola progressivamente (campione B e C) o diminuendola (campione D).

Successive variazioni delle percentuali di Tween 80, lasciando immutate le quantità di tripalmitina e di Epikuron 200 (campioni E ed F), non hanno migliorato le caratteristiche dimensionali dei sistemi e, alla luce dei risultati ottenuti, si è deciso di operare con percentuali di Tween 80 uguali a quelle dei primi sistemi preparati e con percentuali di Epikuron 200 intermedie (campione G). Tuttavia, anche se le caratterizzazioni in termini di size e potenziale  $\zeta$  hanno restituito valori più che accettabili, questi sistemi non erano ripetibili in quanto successive preparazioni hanno fornito valori di size sempre diversi. Per questa ragione si è deciso di sostituire la matrice lipidica di tripalmitina con una matrice a base di *cutina* (miscela di acido *palmitico*, *stearico* ed *oleico*).

Mantenendo le quantità di tensioattivi uguali a quelle del campione G e variando esclusivamente la composizione della matrice lipidica sono state ottenute nanosistemi con dimensioni, PDI e potenziale  $\zeta$  idonei alla veicolazione dell'antigene (campione H ).

Inoltre è stato realizzato anche un sistema basato su *Compritol HD5* una matrice lipidica PEGilata costituita da behenico peghilato (campione I). Questa alternativa è stata pensata per riuscire ad intrappolare una maggiore percentuale di ParJ2 sfruttando le interazioni tra le catene idrofile della matrice lipidica ed i residui idrofobici della proteina. In definitiva i sistemi scelti per le successive prove biologiche sono i sistemi H ed i sistemi I.

Campione	Matrice lipidica	Tween 80	Epikuron 200	Size (nm)	PDI	$\zeta$ (mV) ( $\pm$ D.S.)
A	Tripalmitina 100 mg	128 mg	25 mg	1100.83	0.710	-20,04 ( $\pm$ 5.03)
B	Tripalmitina 100 mg	128 mg	30 mg	243.94	0.761	-22.16 ( $\pm$ 6.12)
C	Tripalmitina 100 mg	128 mg	35 mg	357.03	0.450	-21.32 ( $\pm$ 5.43)
D	Tripalmitina 100 mg	128 mg	10 mg	238.50	0.412	-18.41 ( $\pm$ 4.65)
E	Tripalmitina 100 mg	256 mg	10 mg	1200.23	0.923	-19.03 ( $\pm$ 5.34)
F	Tripalmitina 100 mg	64 mg	10 mg	179.10	0.811	-17.05 ( $\pm$ 4.30)
G	Tripalmitina 100 mg	128 mg	20 mg	240.12	0.392	-20.45 ( $\pm$ 4.13)
H	Cutina 100 mg	128 mg	20 mg	249.32	0.411	-21.27 ( $\pm$ 3.81)
H + Par j 2	Cutina 100 mg	128 mg	20 mg	251.35	0.391	-31.34 ( $\pm$ 2.78)
I	Compritol HD5 100 mg	128 mg	20 mg	256.38	0.750	-21.82 ( $\pm$ 3.54)
I + Par j 2	Compritol HD5 100 mg	128 mg	20 mg	253.25	0.722	-29.81 ( $\pm$ 2.88)

**Tabella 9:** Composizione chimica delle nanoparticelle vuote e caricate con Par j 2 e rispettive analisi delle dimensioni, del PDI e del potenziale  $\zeta$

I sistemi H e I, sia vuoti che caricati con ParJ2, sono caratterizzati da range dimensionali compresi tra 249 nm 256 nm (tab.10) e possiedono elevati valori (in valore assoluto) di potenziale  $\zeta$ . Questi dati dimostrano che i sistemi, sia in presenza che in assenza di ParJ2, hanno un'elevata carica superficiale che assicura una riduzione dei fenomeni di aggregazione e che si traduce in elevata stabilità chimico-fisica.

Campione	SIZE (nm)	PDI	$\zeta$ (mV) ( $\pm$ D.S.)
H	249.32	0.411	-21.27 ( $\pm$ 3.81)
H caricato con Par j 2	251.35	0.391	-31.34 ( $\pm$ 2.78)
I	256.38	0.750	-21.82 ( $\pm$ 3.54)
I caricato con Par j 2	253.25	0.722	-29.81( $\pm$ 2.88)

**Tabella 10:** Analisi dimensionali, di potenziale  $\zeta$  e di PDI dei migliori sistemi carrier vuoti e caricati con ParJ2

Tutti i sistemi sono stati caratterizzati in termini di LC% attraverso analisi HPLC condotte basandosi su una curva di taratura ottenuta partendo da uno standard a concentrazione nota. A questo scopo la concentrazione dello standard di ParJ2 in soluzione acquosa è stata determinata sia attraverso analisi spettrofotometrica a 280 nm, picco di massimo assorbimento della proteina, che attraverso SDS-PAGE, un'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato e di colorante blu Coomassie. Le analisi HPLC sono state condotte operando a gradiente con miscela eluente costituita da CH<sub>3</sub>CN e H<sub>2</sub>O entrambi acidificati con CF<sub>3</sub>COOH ad una lunghezza d'onda di 280 nm.

L'elaborazione dei dati ottenuti ha restituito valori di LC% di 0,00016% e 0,00032% che, tradotti in termini di *efficienza di intrappolamento (EE%)*, corrispondono a valori del 40% e dell' 8% rispettivamente (tab.11). Questi valori sono più che validi poiché, quantità più elevate di allergene potrebbero scatenare pericolose reazioni avverse in un soggetto allergico, soprattutto se questo è rilasciato con cinetiche molto rapide. In ogni caso, visti i bassi valori di efficienze di intrappolamento, i sistemi I sono stati scartati e tutti i saggi biologici sono stati condotti sui sistemi H.

CAMPIONE	LC %	EFFICIENZA DI INTRAPPOLAMENTO
H	0,0016%	40%
I	0,00032%	8%

**Tabella 11:** Valori di LC% e di efficienza di intrappolamento dei sistemi H ed I

Su tali sistemi, inoltre, sono stati condotti dei saggi di stabilità a 4 e 10 mesi con risultati più che soddisfacenti (tab. 12).

CAMPIONE	SIZE (nm)	PDI	$\zeta$ (mV) ( $\pm$ D.S.)
SLN + Par j 2 dopo 4 mesi	211.54	0.383	-38.1 ( $\pm$ 4.18)
SLN + Par j 2 dopo 10 mesi	180.46	0.364	-29.6 ( $\pm$ 3.26)

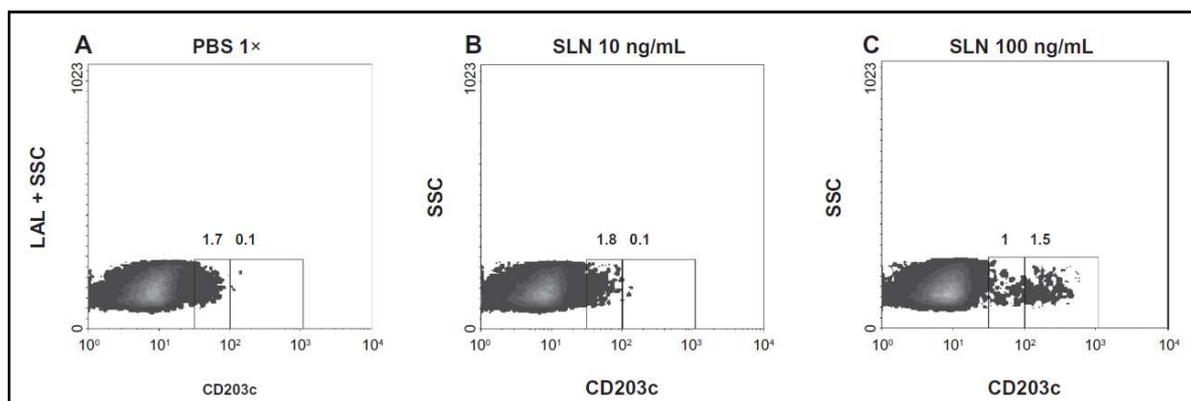
**Tabella 12:** Valori di size, PDI e potenziale  $\zeta$  relativi ai sistemi H analizzati dopo 4 e 10 mesi

Come già accennato i sistemi hanno come target primario il sistema immunitario e per questo motivo, parallelamente ai sistemi già descritti, sono stati preparati dei lotti di nanoparticelle H e I in condizioni sterili, impiegando sia la stessa matrice lipidica che gli stessi tensioattivi.

Per evitare contaminazioni batteriche durante le fasi di preparazione dei sistemi sterili si è lavorato scrupolosamente sotto cappa a flusso laminare seguendo tutti i protocolli associati alle condizioni di sterilità (sterilizzazione del comparto di lavoro con raggi UV, impiego di guanti monouso sterilizzati, ecc...). Inoltre tutta la vetreria è stata sterilizzata per 48h in stufa a 180°C, mentre gli utensili metallici (spatoline, bracci dell'Ultraturrax, magneti, ecc...) sono stati sterilizzati per mezzo di raggi UV.

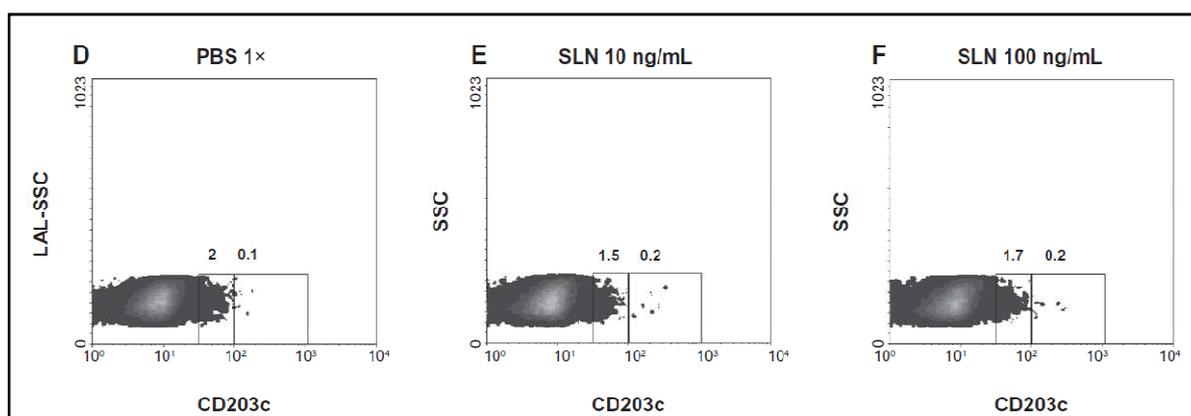
Su tutti i sistemi sono stati condotti degli studi biologici in vitro su campioni di sangue umano di soggetti sani e di soggetti allergici. I test

mirano alla determinazione dell'attivazione dei basofili attraverso l'individuazione dell'espressione del recettore CD203C, espressione che avviene proprio in concomitanza all'attivazione basofilica in seguito a contatto con allergeni o endotossine. Per il riconoscimento è stato sfruttato il composto definito CD203C-PE, un anticorpo monoclonale estremamente affine per CD203C la cui concentrazione è stata determinata tramite tecniche spettrofotometriche. Da una prima analisi volta a testare i sistemi nanostrutturati non sterili si evince come essi, a concentrazioni di 100 ng/ml, siano in grado di generare un'attivazione della popolazione basofilica pur non essendo caricati con l'allergene ParJ2 (fig. 83). I risultati ottenuti sono stati confermati dal LAL-test, analisi di elezione per determinare e la presenza di endotossine. Il LAL test utilizza il lisato di cellule del sangue, (gli amebociti), del *Limulus polyphemus* (da cui LAL, *Limulus Amebocyte Lysate*) che, in presenza di endotossine batteriche, attivano una reazione enzimatica a catena che determina una coagulazione ematica locale. In caso di positività rispetto a endotossine o LPS, il miscuglio si trasforma in un gel che, dopo inversione di 180° del tubo da saggio in cui viene condotto il test, resta fermo sul fondo. In caso contrario, invece, il lisato cellulare rimane perfettamente fluido.



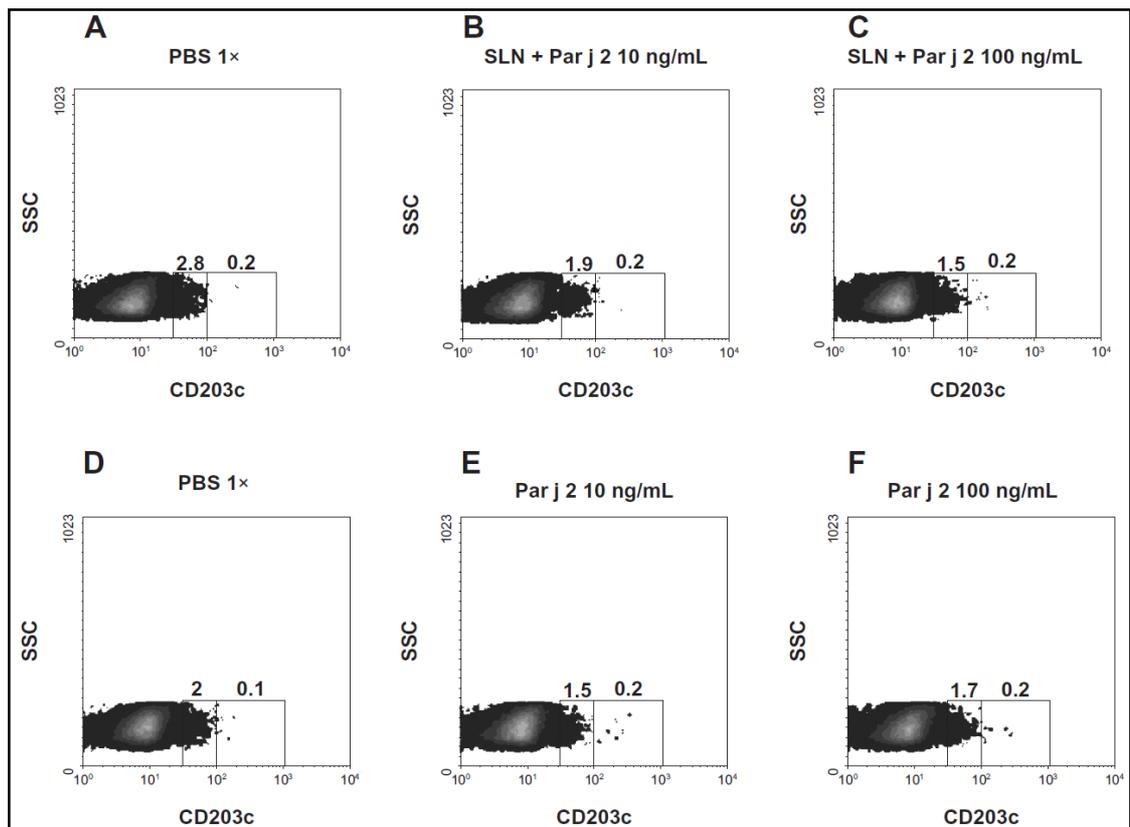
**Figura 83:** Attivazione dei basofili scatenata dalla matrice lipidica non sterile a concentrazioni di 10 ng/ml (b) e 100 ng/ml (c) paragonata a popolazioni cellulari di controllo (a)

Successivamente sono stati condotti degli studi biologici in condizioni analoghe al fine di valutare l'attivazione dei basofili da parte delle sole matrici lipidiche preparate secondo i protocolli di sterilità precedentemente descritti. Queste analisi hanno confermato che in questo caso i sistemi non hanno generato alcuna attivazione basofilica il cui valore è paragonabile ai campioni cellulari non trattati (fig. 84).



**Figura 84:** Attivazione basofilica dopo trattamento con matrici lipidiche sterili a 10 ng/ml (e) e 100 ng/ml (f) paragonata a popolazioni cellulari di controllo (d)

Infine sono stati paragonati i sistemi sterili, vuoti e carichi con ParJ2, con l'antigene non veicolato. I risultati (fig. 85) mostrano che in nessun caso c'è attivazione dei basofili e che i sistemi progettati non interferiscono in alcuna caso con il meccanismo di legame dell'antigene alle cellule del sistema immunitario.



**Figura 85:** Attivazione basofilica di ParJ2 libero a 10 ng/ml (e) e a 100 ng/ml (f) paragonata a quella determinata da Parj2 veicolato dai sistemi nanostrutturati agli stessi step di concentrazione (b e c) ed a colonie cellulari non trattate (a e d)

Questi dati confermano che ParJ2 è un ottimo candidato per la preparazione di un vaccino in quanto non comporta eccessiva attivazione basofilica e riduce ai minimi termini il rischio di andare incontro ad un shock anafilattico. Le nanoparticelle, inoltre, rappresentano un ottimo veicolo che non interferisce con il meccanismo d'azione di ParJ2 ma che ne potrebbe migliorare sensibilmente i profili farmacocinetici.

## ***4 PARTE SPERIMENTALE***

### ***4.1 TRATTAMENTO DI NEUROBLASTOMI***

#### ***4.1.1 Preparazione dei carrier nanostrutturati contenenti curcumino***

I carrier lipidici nanostrutturati contenenti curcumino ottenuti con la tecnica della precipitazione, sono stati preparati solubilizzando l'Epikuron 200 (0.14 mmol) in etanolo (2 ml), sotto agitazione, alla stessa temperatura del lipide fuso (0.7 mmol). Il curcumino è stato aggiunto, sotto agitazione meccanica, al lipide fuso prima di aggiungere la soluzione di Epikuron 200. Le nanoparticelle sono state ottenute disperdendo la precedente soluzione calda in acqua fredda a 2-3°C (100 ml) contenente taurocolato sodico (0.69 mmol), usando l'Ultra Turrax T25 (IKA, D-Staufen) a 6.500 rpm. La fase lipidica dei campioni B e D è stata preparata riscaldando il Precirol o l'Imwitor (0.2 mmol) ad una temperatura di 5-10 °C superiore al range di temperatura di fusione e aggiungendo il Miglyol 812 (38.3 µl). Le dispersioni delle nanoparticelle vengono allora sottoposte ad esaustiva dialisi (usando Visking Tubing Dialysis 18/32"), quindi liofilizzate tramite freeze-dryer Modulo (Edwards, Crawley, UK) e conservate in frigorifero per la successiva caratterizzazione

#### ***4.1.2 Determinazione delle dimensioni delle nanoparticelle***

Il diametro medio e l'indice di polidispersità (misura della distribuzione delle nanoparticelle) sono stati determinati tramite Spettroscopia di Correlazione Fotonica (PCS) usando uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Herremberg, Germania) che utilizza

una tecnologia di back scattering non invasiva ad una temperatura di  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .

I campioni sono stati diluiti con acqua bidistillata Millipore filtrata su filtri di nylon con porosità di  $0,2 \mu\text{m}$  fino all'ottenimento di una concentrazione ottimale. Le letture sono state condotte ad un angolo di  $173^{\circ}\text{C}$  rispetto al raggio incidente e ogni valore rappresenta la media di tre determinazioni.

#### ***4.1.3 Misure di potenziale zeta***

Il potenziale zeta è stato misurato utilizzando i campioni di SLN e NLC liofilizzati opportunamente dispersi in acqua bidistillata Millipore ( $0.2 \mu\text{m}$ ) utilizzando uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Herremberg, Germania) che utilizza la tecnica della microelettroforesi.. Ogni valore riportato rappresenta la media di tre determinazioni.

#### ***4.1.4 Analisi cromatografica del curcumino***

La loading capacity e i processi di rilascio di curcumino dai sistemi nanoparticellari sono stati determinati tramite lo sviluppo di un appropriato metodo HPLC. L'analisi cromatografica è stata condotta a temperatura ambiente usando un HPLC della Shimatzu Instrument equipaggiato con una colonna C18 a fase inversa ( $\mu$  Bondapak,  $3 \mu\text{m}$ ,  $150 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ , Supelco). La fase mobile era formata da una miscela  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{tetraidrofurano}$  ( $35/5/60 \text{ v/v}$ ) rispettivamente con un flusso di  $0.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Il detector UV-VIS

(Shimadzu) collegato all'uscita della colonna cromatografica è stato selezionato ad una lunghezza d'onda pari a 416 nm.

L'analisi quantitativa del curcumino è stata fatta tramite integrazione automatica dei picchi cromatografici, servendosi di curve di taratura ottenute iniettando all'HPLC soluzioni a concentrazione nota del farmaco.

L'equazione della retta ottenuta è:  $y = 412.41x - 7662.4$  ( $y$  = area del picco;  $x$  = concentrazione del composto in  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Il coefficiente di correlazione lineare è risultato pari a  $R^2=0.9948$ . Il range di concentrazione utilizzato per la curva di taratura entro cui si mantiene la linearità è compreso tra 25 e 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### ***4.1.5 Determinazione della loading capacity***

La quantità di acido ferulico e curcumino incorporata nelle nanoparticelle, espressa come percentuale di sostanza contenuta in 100 mg di materiale secco (matrice lipidica + sostanza) è stata calcolata impiegando 5 mg di nanoparticelle caricate con curcumino e solubilizzandole in 10 ml di THF. Le soluzioni ottenute sono state filtrate con filtri da 0.45  $\mu\text{m}$  in PTFE e analizzate tramite HPLC per determinare la quantità di sostanza presente.

#### ***4.1.6 Stabilità del curcumino in tampone fosfato pH 7.4/ottanolo***

Sono stati condotti studi finalizzati alla determinazione della stabilità del curcumino a pH 7.4/ottanolo. A tale scopo, un campione di curcumino (5 mg) è stato sciolto in tampone fosfato 0.01 M (10 ml) a pH 7.4 e posto all'interno di una membrana da dialisi (Visking Tubing

Dialysis 18/32'' con cut-off compreso tra 12.000 e 14.000 Dalton). La membrana è stata immersa in 25 ml di ottanolo e il campione è stato incubato, sotto agitazione meccanica, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Ad intervalli di tempo prestabiliti, sono state prelevate delle aliquote di ottanolo che è stato analizzato all'HPLC, utilizzando la metodica sopra descritta. Il volume di ottanolo prelevato veniva sostituito con un uguale volume di ottanolo fresco.

#### ***4.1.7 Profilo di rilascio di curcumino dalle nanoparticelle in tampone fosfato pH 7.4/ottanolo***

Il rilascio del farmaco è stato effettuato, per ciascun sistema nanoparticellare, a 11 intervalli di tempo prefissati. Gli studi di rilascio sono stati condotti preparando per ogni campione una sospensione di nanoparticelle (10 mg) in tampone a pH 7.4 (15 ml) posta all'interno di una membrana da dialisi. Quest'ultima è stata immersa, sotto agitazione meccanica, in 25 ml di ottanolo a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Ad intervalli di tempo predeterminati 1 ml di ottanolo è stato prelevato e analizzato mediante HPLC al fine di determinare la quantità di farmaco rilasciata. La stessa aliquota di ottanolo prelevata veniva sostituita con un uguale volume di ottanolo fresco.

Dopo aver valutato le cinetiche di rilascio, al fine di determinare la quota di farmaco rimasto ancora intrappolato all'interno delle NLC, la sospensione nanoparticellare è stata rimossa dalla membrana da dialisi e successivamente liofilizzata. Il residuo liofilizzato è stato addizionato con THF (20 ml) e la soluzione organica ottenuta è stata

filtrata con filtri 0.2  $\mu\text{m}$  (PTFE membrane) e analizzata all'HPLC secondo la metodica sopra descritta.

#### ***4.1.8 Stabilità del curcumino in plasma umano***

Sono stati condotti studi finalizzati alla determinazione della stabilità del curcumino in plasma umano. A tale scopo, sono state preparate 6 sospensioni, ottenute disperdendo 2 mg di curcumino in 2 ml di plasma umano, e incubate a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , sotto costante agitazione meccanica. Ad intervalli di tempo prestabiliti, ad ogni campione è stato aggiunto acetonitrile (4 ml) e la sospensione così ottenuta è stata centrifugata a 11.800 rpm per 15 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Per determinare la quota di curcumino non degradata, il surnatante ottenuto è stato filtrato con filtri 0.2  $\mu\text{m}$  (PTFE membrane) e analizzato all'HPLC utilizzando la metodica sopra descritta.

#### ***4.1.9 Profilo di rilascio di curcumino dalle NLC in plasma umano***

Il rilascio del farmaco è stato effettuato, per ciascun sistema nanoparticellare, a 6 intervalli di tempo prefissati. A tal proposito, sono state preparate 6 sospensioni, ottenute disperdendo 5 mg di ogni singolo campione in 2 ml di plasma umano, e incubate a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , sotto costante agitazione meccanica. Ad intervalli di tempo prestabiliti, ogni campione è stato centrifugato a 11.800 rpm per 15 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al precipitato veniva aggiunto THF (10 ml) che era successivamente filtrato con 0.2  $\mu\text{m}$  (PTFE membrane) e analizzato all'HPLC per valutare la quantità di curcumino contenuta nelle nanoparticelle precipitate. Al surnatante, invece, è stato aggiunto

acetonitrile (4 ml) e la sospensione così ottenuta viene centrifugata nuovamente a 11.800 rpm per 15 minuti a 4° C. Per determinare la quota di curcumino rilasciata il surnatante ottenuto viene filtrato con filtri 0.2 µm (PTFE membrane) e analizzato all'HPLC. Anche il secondo precipitato ottenuto viene trattato con THF, filtrato con filtri 0.2 µm e analizzato all'HPLC per stabilire la quota del curcumino rimasto legato alle proteine plasmatiche.

#### ***4.1.10 Colture cellulari***

La linea cellulare di neuroblastoma (LAN5), ottenuta dall'American type culture collection (Rockville, MD, USA), è stata fatta crescere in medium RPMI 2X 1640 (CELBIO) addizionato con 10% di siero, disattivato col calore, proveniente da feto di vitello (FCS) (Gibco, Milano, Italia), 1% di L-glutammina 2mM, 100 U/ml penicillina, e 100 µg /ml streptomina (Gibco) ed è stata incubata a 37°C ± 0.1°C in presenza di CO2 al 5%.

## **4.2 TRATTAMENTO EPATOCARCINOMI**

### **4.2.1 Materiali**

Tyrphostin AG 1478 è stata acquistata presso LC Laboratories, A Division of PKC Pharmaceuticals, Inc. (USA). La tripalmitina è stata acquistata alla Fluka (Milano, Italia). Il Captex 355 EP/NF (trigliceridi dell'acido caprilico/ caprico) e Acconon CC-6 (esteri del glicerolo caprilico e caprico etossilati) sono stati forniti da ABITEC Corporation (USA). Il Compritol 888 ATO (miscela di mono-, di- e trigliceridi dell'acido behenico, approssimativamente 15, 50 e 35% p/p rispettivamente) è stato fornito dalla Gattefossè s.a. (Saint- priest, France). L'Epikuron (fosfatidilcolina di soia 95%) è stato acquistato alla Cargill (Milano, Italia). Il taurocolato di sodio è stato acquistato alla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Gli altri reagenti chimici, di grado analitico, sono stati acquistati alla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

### **4.2.2 Preparazione nlc caricate con tyrphostin AG1478**

Tutti i campioni sono stati ottenuti con la tecnica della precipitazione. La fase lipidica è stata preparata riscaldando fino a fusione la Tripalmitina (85 °C circa) e aggiungendo il lipide liquido (Captex 355 EP/NF o Accon CC-6). L'Epikuron 200 è stato solubilizzato a caldo in etanolo e quindi addizionato alla fase lipidica. Per la preparazione dei sistemi carichi il farmaco è stato aggiunto al lipide fuso, sotto agitazione, prima dell'aggiunta della soluzione etanolica di Epikuron. Si otteneva così una soluzione calda che veniva dispersa in 100 ml di acqua milliQ a 2-3°C, dove era stato precedentemente solubilizzato il

taurocolato sodico, sotto agitazione a 13.500 rpm per 10 min mediante impiego di Ultra Turrax T25 (IKA, D-Staufen). Le dispersioni delle NLC ottenute venivano sottoposte ad esaustiva dialisi mediante impiego di tubi da dialisi con cut-off 12.000-14.000 (Visking Tubing Dialysis 18/32”) , successivamente liofilizzate mediante uso di un freeze-dryer (Edwards, Crawley, UK) e conservate in frigo per la successiva caratterizzazione.

#### ***4.2.3 Analisi dimensionali e di carica superficiale***

Il diametro medio e l'indice di polidispersità o PDI (misura della distribuzione delle nanoparticelle) sono stati determinati tramite Spettroscopia di Correlazione Fotonica (PCS) usando uno Zetasizer Nano Zs (Malvern Instrument, UK) che utilizza una tecnologia di back scattering non invasiva ad una temperatura di 25°C. I campioni liofilizzati sono stati risospesi nei diversi mezzi acquosi descritti in Risultati e Discussione e sonicati per 3 minuti. Le misure sono state effettuate ad una temperatura di 25°C. Ogni valore riportato rappresenta la media di tre misurazioni.

Il potenziale zeta è stato determinato disperdendo i campioni di NLC liofilizzati negli stessi mezzi acquosi utilizzati per il size, sfruttando i principi dell'elettroforesi mediante l'uso dello Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK). Le misure sono state effettuate ad una temperatura di 25°C. Ogni valore riportato rappresenta la media di tre misurazioni.

#### **4.2.4 Condizioni HPLC**

La loading capacity % (quantità di sostanza contenuta nelle NLC) e le cinetiche di rilascio sono state determinate tramite lo sviluppo di un appropriato metodo HPLC. L'analisi è stata condotta a temperatura ambiente usando uno strumento per HPLC Shimadzu Instrument equipaggiato con una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa (Gemini, 250 mm x 4,60 mm x 5 µm, Phenomenex). L'eluizione è stata effettuata in condizioni isocratiche mediante uso di una fase mobile costituita da una miscela 30:70 di CH<sub>3</sub>CN e H<sub>2</sub>O contenente 0.1% di CF<sub>3</sub>COOH utilizzando un flusso di 1ml/min.

Il detector UV-VIS, collegato all'uscita della colonna cromatografica, è stato regolato ad una lunghezza d'onda pari a 254 nm. L'analisi quantitativa di Tyrphostin AG 1478 è stata fatta tramite integrazione automatica dei picchi cromatografici, servendosi di curve di taratura ottenute iniettando all'HPLC soluzioni organiche CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN (1:1 v/v) a concentrazione nota di sostanza.

L'equazione della retta ottenuta per Tyrphostin AG 1478 è :  $y = 4E+0.7x$  ( $y$  = area del picco;  $x$  = concentrazione del composto in mg/ml). Il coefficiente di correlazione lineare è risultato pari a  $R^2 = 0,9999$ ). Il range di concentrazione utilizzato per la curva di taratura entro cui si mantiene la linearità è compreso tra 0.1 e 0.40 mg/ml.

#### **4.2.5 Determinazione LC%**

La quantità di farmaco incorporata nelle NLC, espressa come percentuale di sostanza contenuta in 100 mg di materiale secco (matrice lipidica + sostanza) è stata calcolata nel seguente modo:

5 mg di nanoparticelle caricate con Tyrphostin AG 1478 sono state solubilizzate in 10 ml di una miscela di (solventi organici 5 ml di  $\text{CHCl}_3$  + 5 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Per determinare la quantità di Tyrphostin AG 1478 presente nelle NLC le soluzioni ottenute sono state filtrate con filtri da 0.45  $\mu\text{m}$  (membrane in PTFE) e analizzate tramite HPLC utilizzando il metodo sopradescritto.

#### ***4.2.6 Studio delle cinetiche di rilascio***

Il rilascio di Tyrphostin AG 1478 è stato effettuato in sette intervalli di tempo prefissati. A tale scopo sono state preparate 7 sospensioni ciascuna delle quali contenenti 5 mg di NLC e disperse in 12 ml di una miscela di solventi costituita da 2.4 ml di etanolo e 9.6 ml di una soluzione acquosa di PBS a pH 7.4. Tali sospensioni sono state poste all'interno di membrane da dialisi con cut-off 12.000÷14.000, che sono state poste sotto agitazione (100 rpm) in 50 ml di una miscela costituita da 10 ml di etanolo e 40 ml di una soluzione acquosa di PBS a pH 7.4 alla temperatura di  $37^\circ\text{C} \pm 0.1$ . Ad intervalli di tempo prefissati i campioni sono stati smontati e raccolti in palloni di vetro per essere liofilizzati. Sia i compartimenti accettori contenenti Tyrphostin AG 1478 rilasciata, sia i compartimenti donatori contenenti le NLC che contengono Tyrphostin AG 1478 ancora intrappolata, sono stati analizzati all'HPLC. Ciascun campione secco è stato ripreso con una miscela di  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1 v/v), filtrato prima con un Bukner utilizzando un filtro di carta e successivamente con filtro 0.45  $\mu\text{m}$  in PTFE. Il prodotto ottenuto è stato iniettato all'HPLC utilizzando la metodica sopra descritta.

#### ***4.2.7 Saggi di citotossicità***

La capacità di Tyrphostin AG 1478, nella forma libera o veicolata tramite NLC, di inibire la crescita cellulare è stata studiata mediante saggio clonogenico. Eventuali riduzioni nel numero delle colonie di cellule possono derivare sia dal blocco della proliferazione che dall'induzione della morte cellulare.

Le cellule di carcinoma epatocellulare umano HA22T/VGH sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (200 cellule/pozzetto) con terreno RPMI completo. Le cellule sono state successivamente trattate con dosi crescenti di Tyrphostin AG 1478 nella forma libera, veicolata tramite NLC, con NLC vuote utilizzando concentrazioni equivalenti a quelle cariche di sostanza e con dimetilsolfossido (controllo). Dopo 24 ore il mezzo è stato rimosso e dopo un lavaggio con terreno base si è aggiunto terreno completo fresco. Nei successivi 8 giorni il terreno di coltura delle cellule è stato cambiato periodicamente con terreno completo fresco (ogni 3-4 giorni). Terminata questa fase, è seguita la colorazione delle colonie. Le colonie di cellule nei pozzetti sono state lavate a freddo con PBS contenente  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Successivamente le colonie sono state fissate con etanolo al 70% a freddo (10 minuti a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) e infine colorate con violetto di genziana 0.1% in acqua, per 5 minuti. Successivi lavaggi hanno allontanato il colorante in eccesso e le colonie sono state visualizzate e contate al microscopio ottico. Variazioni nel numero di colonie tra i campioni trattati con Tyrphostin AG 1478 libera, veicolata dalle NLC e nanoparticelle vuote sono state espresse in percentuale rispetto al controllo (DMSO). Il saggio è stato condotto in duplicato ed eseguito due volte.

### **4.3 TRATTAMENTO DEL MORBO DI ALZHEIMER**

#### **4.3.1 Materiali**

I materiali utilizzati sono (R)-(-)-Flurbiprofen (Sigma-Aldrich), Potassio fosfato monobasico e bibasico (Sigma-Aldrich), Sodio fosfato bibasico (Sigma-Aldrich), 1-ottanolo (Fluka e Merck), 1-decanolo (Fluka), 1,1-Carbonildiimidazolo (Sigma-Aldrich), Trietilammina (Fluka), N-idrossisuccinimide (Sigma-Aldrich), cloruro di tionile (SOCl<sub>2</sub>) (Fluka), Silice (Silica gel 60) (Merck), plasma umano gentilmente fornito dall'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti "Villa Sofia-Cervello" di Palermo.

**Lipidi e Tensioattivi:** Tripalmitina (Fluka), Captex 355 EP/NF (Octanoic/Decanoic glycerides) (Abitec), Acconon CC6 (PEG-6 Octanoic/Decanoic glycerides) (Abitec), Compritol 888 ATO (miscela di mono-, di- e trigliceridi dell'acido behenico, approssimativamente 15, 50 e 35% w/w rispettivamente) (Gattefossè s.a.), Taurocolato di sodio (Prodotti Chimici ed Alimentari Basaluzzo), Epikuron 200 (fosfatidilcolina di soia 95%) (Cargill), Tween 80 (Sigma-Aldrich).

**Solventi:** Etanolo (99,9% per HPLC) (Merck), Metanolo per HPLC (Sigma-Aldrich), Acetonitrile per HPLC (Sigma-Aldrich), Diclorometano per HPLC (Merck), Tetraidrofurano per HPLC (Merck), N,N-Dimetilformammide anidra (Sigma-Aldrich), Etere di petrolio (Merck).

**Apparecchiature:** HPLC (UF-Ultra-fast) costituito da due pompe LC-20AD, un detector UV/VIS SPD-20A e un modulo di comunicazione CBM-20A (Shimadzu Corporation), una Colonna C-18 a fase inversa per HPLC ( $\mu$  Bondapak) (Supelco).

Omogeneizzatore Ultraturrax T-25 (Ika-Werke), Spettrofotometro UV Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel counter, Bagno termostatico M 428-BM (Instruments srl), Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument), Liofilizzatore freeze-dryer Modulyo-Labconco, membrana da dialisi Visking Tubing Dialysis 18/32”.

Gli spettri IR sono stati determinati in Bromoformio con un Elettrofotometro Jasco FT/IR 410; gli spettri MS sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro GC-MS Shimadzu QP5050; gli spettri <sup>1</sup>H-NMR sono stati registrati in DMSO-*d*<sub>6</sub> (Aldrich) usando uno spettrometro Bruker Avance II 300 operante a 300 MHz.

#### **4.3.2 Metodi**

Le modifiche chimiche apportate alla molecola del Flurbiprofen sono state preliminari allo scopo di ottenere derivati più idonei ad essere intrappolati all'interno delle nanoparticelle lipidiche del tipo NLC. I prodotti sono stati ottenuti mediante esterificazione di Fischer con introduzione di catene carboniose a 2 e 6 atomi di C. Sono state utilizzate diverse vie sintetiche, delle quali solo alcune sono risultate idonee per quanto riguarda formazione di prodotti di reazione e valori di resa %.

#### **4.3.3 Esterificazione di Fischer in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

In un pallone da 100 ml sono stati posti 50 mg (0,204 mmol) di Flurbiprofen e addizionati 20 ml di CH<sub>3</sub>CN fino a completa dissoluzione. Successivamente sono stati aggiunti 170 µl (0,829 mmol) di 1-decanolo e quantità catalitiche di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sotto agitazione

meccanica ed a temperatura ambiente per 24 ore seguendo la reazione attraverso TLC, che non ha mostrato formazione di prodotti di reazione.

#### ***4.3.4 Esterificazione di Fischer in DMF/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>***

In un pallone da 100 ml sono stati posti 50 mg (0,204 mmol) di Flurbiprofen e addizionati 20 ml di DMF anidra fino a completa dissoluzione. Successivamente sono stati aggiunti 170  $\mu$ l (0,829 mmol) di 1-decanolo e quantità catalitiche di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sotto agitazione meccanica per 24 ore ad una temperatura di circa 60° C e seguendo la reazione via TLC. Non si sono formati prodotti di reazione.

#### ***4.3.5 Esterificazione con carbonildiimidazolo (CDI)/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>***

In un pallone da 100 ml sono stati posti 50 mg (0,204 mmol) di Flurbiprofen e addizionati di 40 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fino a completa dissoluzione. In seguito sono stati aggiunti 47 mg di carbonildiimidazolo (0,289 mmol) per attivare il gruppo carbossilico e la miscela di reazione è stata lasciata per 30 minuti a temperatura controllata in bagnetto di ghiaccio. Ad attivazione completa (confermata via TLC) sono stati aggiunti in bulk 0,055 ml di 1-decanolo (0,580 mmol) e la miscela di reazione è rimasta a reagire in queste condizioni per 48 ore. Non si sono formati prodotti di reazione.

#### ***4.3.6 Esterificazione con carbonildiimidazolo (CDI) e trietilammina (TEA)***

In un pallone da 100 ml sono stati posti 50 mg (0,204 mmol) di Flurbiprofen e addizionati di 40 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fino a completa dissoluzione. In seguito sono state aggiunte quantità catalitiche di trietilammina pari a 47,02 mg (0,465 mmol) e la miscela di reazione viene lasciata a reagire per 30 minuti ad una temperatura di 0°C.

Ad attivazione completa (confermata via TLC) sono stati addizionati 0,055 ml di 1-decanolo (0,580 mmol). Anche in questo caso la reazione montata è stata lasciata a reagire per 48 ore e monitorata via TLC. Anche in questo caso non si sono formati prodotti di reazione.

#### ***4.3.7 Esterificazione con carbonildiimidazolo (CDI) e dimetilformammide (DMF) anidra***

In un pallone da 100 ml sono stati posti 50 mg (0,204 mmol) di Flurbiprofen e addizionati di 40 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fino a completa dissoluzione. In seguito sono state aggiunte quantità catalitiche di DMF pari a 47,02 mg e la miscela di reazione viene lasciata a reagire per 30 minuti ad una temperatura di 0°C. Ad attivazione completa (confermata via TLC) sono stati addizionati 0,055 ml di etanolo (0,940 mmol). Anche in questo caso la reazione montata è stata lasciata a reagire per 48 ore e monitorata via TLC. Anche in questo caso non si sono formati prodotti di reazione.

#### ***4.3.8 Esterificazione con DCC, NHS, 1-esanolo in dimetilformammide DMF anidra***

In un pallone da 100 ml sono stati posti 100 mg (0,409 mmol) di Flurbiprofen e addizionati di 12 ml di DMF anidra sotto atmosfera inerte di Argon. Alla soluzione limpida sono stati aggiunti 47 mg di NHS (0,41 mmol) e 84 mg di DCC (0,41 mmol). Dopo 24 ore sono stati aggiunti 102  $\mu$ l di 1-esanolo (0,82 mmol) e la miscela di reazione è lasciata a reagire per altre 24 ore ad una temperatura di 40°C sotto costante agitazione magnetica. A reazione completa il precipitato di DCU formatosi è stato separato per filtrazione su buckner a pressione ridotta e il solvente di reazione è stato evaporato mediante rotavapor. Il prodotto ottenuto è stato purificato su colonna cromatografica utilizzando come eluente miscele di etere di petrolio ed acetato di etile. La reazione ha fornito il prodotto desiderato ma con rese molto basse (2,76 %).

#### ***4.3.9 Esterificazione via cloruro acilico ed 1-esanolo***

In un pallone a due colli da 250 ml sono stati posti 500 mg (2,04 mmol) di Flurbiprofen e addizionati di 5 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro, sotto agitazione meccanica a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione. Successivamente sono stati aggiunti 44  $\mu$ l di  $\text{SOCl}_2$  (0,613 mmol) in diverse aliquote di piccoli volumi e il secondo collo del pallone è stato collegato ad una bottiglia Dreschel contenente una soluzione acquosa di NaOH al 20% per neutralizzare l'HCl gassoso prodotto. La miscela di reazione viene lasciata a reagire sotto costante agitazione a temperatura ambiente, seguendo l'andamento della

reazione via TLC. Dopo 24 ore sono stati addizionati 512,15  $\mu\text{l}$  di 1-esanolo (4,08 mmol) e la miscela di reazione viene lasciata a reagire per altre 24 ore e seguita tramite TLC. Dopo la fine della reazione il solvente viene eliminato in condizioni di pressione ridotta e viene così recuperato il prodotto di reazione.

Infine il prodotto di reazione è stato purificato tramite colonna cromatografica per eliminare eventuali tracce di esanolo residuo; la colonna è stata caricata con silice ed impaccata con una miscela etere di petrolio/acetato di etile 20:1.

Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato tramite FT-IR, GC-MS e  $^1\text{H-NMR}$ .

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1724,5  $\text{cm}^{-1}$  (estere C=O). MS ( $m/z$  %): 328 (M<sup>+</sup>) 13,2%, 244 (FLU) 3,6%, 199 (FLU – CO<sub>2</sub>) 100%.  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-*d*6):  $\delta$  0.87 (br t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.28 (s, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.52 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.73 (q, 1H, CH), 4.08 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.01-7.68 (m, 8H, H-Ph).

#### ***4.3.10 Esterificazione via cloruro acilico ed etanolo***

In un pallone a due colli da 250 ml sono stati posti 500 mg (2,04 mmol) di Flurbiprofen e addizionati di 5 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro, sotto agitazione meccanica a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione. Successivamente sono stati aggiunti 148  $\mu\text{l}$  di SOCl<sub>2</sub> (2,04 mmol) in diverse aliquote di piccoli volumi e il secondo collo del pallone è stato collegato ad una bottiglia Dreschel contenente una soluzione acquosa di NaOH al 20% per neutralizzare l'HCl gassoso prodotto. La miscela di reazione viene lasciata a reagire sotto costante agitazione a temperatura ambiente, seguendo l'andamento della reazione via TLC. Dopo 24 ore sono stati addizionati 238  $\mu\text{l}$  di etanolo

(4,08 mmol) e la miscela di reazione viene lasciata a reagire per altre 24 ore e seguita tramite TLC. Dopo la fine della reazione il solvente viene eliminato in condizioni di pressione ridotta e viene così recuperato il prodotto di reazione.

Infine il prodotto di reazione viene purificato tramite colonna cromatografica per eliminare eventuali tracce di etanolo residuo; la colonna è stata caricata con silice ed impaccata con una miscela di etere di petrolio/acetato di etile 20:1.

Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato tramite FT-IR, GC-MS ed NMR.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1726,5  $\text{cm}^{-1}$  (estere C=O). MS ( $m/z$  %): %, 272 (M) 27,7%, 199 (FLU – CO<sub>2</sub>) 100. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*6):  $\delta$  1,25 (br t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.52 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.75 (q, 1H, CH), 4.19 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.10-7.60 (m, 8H, H-Ph).

#### ***4.3.11 Preparazione delle NLC contenenti gli esteri del Flurbiprofen***

I carrier lipidici nanostrutturati, utilizzati successivamente per le prove biologiche, sono stati ottenuti con la tecnica della precipitazione fondendo 180 mg di tripalmitina (0,223 mmol) in una corex posta in un bagno riscaldato a circa 80°C, sotto agitazione meccanica, e addizionando 50  $\mu\text{l}$  di lipide liquido Captex 355 EP/NF o alternativamente di Acconon. Successivamente sono stati aggiunti prima gli esteri, RD01 (39,41 mg / 0,120 mmol) o RD03 (39,40 mg / 0,144 mmol) e quindi 48 mg di Epikuron 200 preventivamente solubilizzato in EtOH (1 ml), sotto agitazione e alla stessa temperatura. Le nanoparticelle sono state ottenute disperdendo la soluzione etanolica calda in acqua (100 ml) a 2-3°C contenente

taurocolato sodico (177 mg) e usando l'Ultra Turrax T25 a 13.500 rpm per 10 minuti. Le dispersioni delle nanoparticelle sono state allora sottoposte ad esaustiva dialisi e quindi liofilizzate tramite freeze-dryer e conservate in frigorifero per la successiva caratterizzazione.

#### ***4.3.12 Determinazione delle dimensioni delle nanoparticelle***

Il diametro medio e l'indice di polidispersità (misura della distribuzione delle nanoparticelle) sono stati determinati tramite Spettroscopia di Correlazione Fotonica (PCS) usando uno Zetasizer Nano ZS che utilizza una tecnologia di back-scattering non invasiva ad un angolo di 173°C rispetto al raggio incidente e ad una temperatura di 25°C ± 0.1°C.

Tutti i campioni liofilizzati sono stati risospesi in acqua bidistillata Millipore fino ad ottenere una concentrazione ottimale. Le misure riportate nelle tabelle di cui sopra rappresentano la media di tre determinazioni.

#### ***4.3.13 Misure di potenziale zeta***

Il potenziale zeta è stato determinato utilizzando i campioni di NLC liofilizzati opportunamente dispersi in acqua bidistillata Millipore utilizzando uno Zetasizer Nano ZS che utilizza la tecnica della microelettroforesi. Ogni valore riportato rappresenta la media di tre determinazioni.

#### ***4.3.14 Analisi cromatografica degli esteri del Flurbiprofen***

La loading capacity e le cinetiche di rilascio dei due esteri del Flurbiprofen dai sistemi nanoparticellari sono state determinate sviluppando un appropriato metodo HPLC.

Le analisi cromatografiche sono state condotte a temperatura ambiente usando un HPLC della Shimadzu Instrument equipaggiato con una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa. La fase mobile era costituita da una miscela 95:5 (v/v) di CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O con un flusso di 0,5 ml/min. Il detector UV-VIS collegato all'uscita della colonna cromatografica è stato selezionato ad una lunghezza d'onda pari a 252 nm.

Le loading capacity dei quattro sistemi (P2, P3, P4 e P5) sono state determinate servendosi delle curve di taratura dei due esteri (etilico ed esilico) ottenute sciogliendo 4,8 mg dei rispettivi esteri in 10 ml di miscela CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> 9:1 v/v e ottenendo, tramite successive diluizioni, concentrazioni decrescenti pari a 0.48 M, 0.048 M e 0.024 M.

L'equazione della retta relativa all'estere esilico RD01 è:  $y = 8 \cdot 10^7 x$  ( $y$  = area del picco;  $x$  = concentrazione del composto in  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) con un corrispondente coefficiente di correlazione lineare  $R^2 = 0,999$ . Il range di concentrazione utilizzato per la curva di taratura entro cui si mantiene la linearità è compreso tra 0,002 e 0,024  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Allo stesso modo l'equazione della retta ottenuta per l'estere etilico RD03 è:  $y = 10^8 x$  ( $y$  = area del picco;  $x$  = concentrazione del composto in  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Il coefficiente di correlazione lineare è risultato pari a  $R^2 = 0,922$ . Il range di concentrazione utilizzato per la curva di taratura entro cui si mantiene la linearità è compreso tra 0,022 e 0,043  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

#### ***4.3.15 Stabilità degli esteri del Flurbiprofen in PBS a pH 7.4 in assenza di esterasi***

Sono stati condotti studi finalizzati alla determinazione della stabilità dei due esteri del Flurbiprofen a pH 7.4. A tale scopo ciascuno dei due campioni (5 mg) è stato sospeso, in 20 ml di PBS a pH 7.4 e lasciato sotto costante agitazione meccanica, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Sono stati preparati un numero di campioni pari ad ogni intervallo di tempo considerato. Ai tempi prestabiliti ogni campione è stato addizionato con 10 ml di 1-ottanolo ed iniettato all'HPLC.

Le aree dei picchi cromatografici ottenute sono state paragonate a quelle ottenute con le curve di taratura dei due esteri in 1-ottanolo (fig. 33).

#### ***4.3.16 Stabilità degli esteri del Flurbiprofen in PBS a pH 7.4 in presenza di esterasi***

Sono stati anche condotti studi finalizzati alla determinazione della stabilità dei due esteri del Flurbiprofen a pH 7.4 in presenza di esterasi. A tale scopo ciascuno dei due campioni (5 mg) è stato sospeso, in 20 ml di PBS a pH 7.4 in cui sono stati aggiunti soluzioni basiche di esterasi suina in quantità analoghe a quelle impiegate per gli studi di rilascio. Tutti i campioni erano mantenuti a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , sotto costante agitazione meccanica. Sono stati preparati un numero di campioni pari ad ogni intervallo di tempo considerato. Ai tempi prestabiliti ogni campione è stato filtrato con filtri in nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) ed estratto con 10 ml di 1-ottanolo. ed iniettato all'HPLC.

Le aree dei picchi cromatografici ottenute sono state paragonate a quelle ottenute con le curve di taratura dei due esteri in 1-ottanolo (fig.33).

#### ***4.3.17 Stabilità degli esteri del Flurbiprofen in plasma umano***

Inoltre sono stati effettuati studi finalizzati alla determinazione della stabilità dei due esteri del Flurbiprofen in plasma umano. A tale scopo ciascuno dei due campioni (0,5mg) è stato sospeso, in 3 ml di plasma umano e lasciato sotto costante agitazione meccanica, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Sono stati preparati un numero di campioni pari ad ogni intervallo di tempo considerato, trascorso il quale ciascun campione è stato filtrato con filtri in nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) e successivamente è addizionato con 3 ml di  $\text{CH}_3\text{OH}$  per favorire la denaturazione delle proteine plasmatiche. Dopo centrifugazione della durata di 10 minuti a 12.000 rpm ad una temperatura di  $4^{\circ}\text{C}$ , è stato prelevato il surnatante che è stato filtrato su filtri in PTFE (0,45  $\mu\text{m}$ ) e successivamente analizzato mediante HPLC.

#### ***4.3.18 Profili di rilascio degli esteri del Flurbiprofen dalle NLC in PBS a pH 7.4 in assenza di esterasi***

I test di rilascio dalle NLC caricate con RD01 e RD03 sono stati condotti disperdendo campioni di 5,0 mg di nanoparticelle in 20 ml di PBS a pH 7.4 e ponendo in bagnetto riscaldato a temperatura controllata di  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1$  sotto costante agitazione magnetica. Ai tempi prestabiliti le sospensioni sono state filtrate utilizzando filtri in

Nylon da 0.45  $\mu\text{m}$  in modo tale da allontanare i residui di NLC e bloccare quindi i rilasci.

Il filtrato è stato dunque trattato con due aliquote di 5 ml di ottanolo per estrarre gli esteri e la frazione ottanolica è stata infine analizzata tramite HPLC.

#### ***4.3.19 Profilo di rilascio degli esteri del Flurbiprofen dalle NLC in PBS a pH 7.4 in presenza di esterasi***

Tali studi sono stati eseguiti preparando, per ognuno dei quattro campioni, delle sospensioni di NLC (2,5 mg) in PBS a pH 7.4 (10 ml) e aggiungendo delle soluzioni basiche di esterasi suina, a conc. 15mg/ml, in quantità adeguate. In particolare, tenendo conto che una singola unità di tale enzima è in grado di idrolizzare 1  $\mu\text{mol}$  di un monoestere, sono stati aggiunti volumi appropriati, così come riportato in tab.3. Tutti i campioni sono stati mantenuti, sotto costante agitazione magnetica, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Ad intervalli di tempo predeterminati ciascun campione è stato filtrato con filtri in nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) ed estratto con 5 ml di 1-ottanolo. La soluzione organica estratta è stata filtrata con filtri in PTFE (0,45 $\mu\text{m}$ ) e analizzata mediante HPLC al fine di determinare la quantità di farmaco rilasciata.

#### ***4.3.20 Profili di rilascio degli esteri del Flurbiprofen dalle NLC in plasma umano***

Gli studi di rilascio in plasma umano sono stati fatti sospendendo ciascuno dei quattro campioni di NLC (2,5 mg) in plasma umano (2 ml). Tutti i campioni sono stati mantenuti sotto agitazione magnetica a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .

Ad intervalli di tempo prestabiliti i campioni da analizzare sono stati filtrati con filtri in nylon ( $0,45 \mu\text{m}$ ) e successivamente ciascun campione è stato addizionato con 3 ml di  $\text{CH}_3\text{OH}$  per favorire la denaturazione delle proteine plasmatiche. Ciascun campione è stato centrifugato per 10 minuti a 12.000 rpm ad una temperatura di  $4^{\circ}\text{C}$  e successivamente è stato prelevato il surnatante e filtrato su filtri in PTFE ( $0,45 \mu\text{m}$ ) ed analizzato mediante HPLC. Le quantità dei due esteri sono state determinate servendosi degli standard dei due esteri, a concentrazione nota, ottenuti usando le stesse condizioni utilizzate per le prove di rilascio (dati non riportati).

## **4.4 TRATTAMENTO DELLE ALLERGIE**

### **4.4.1 Materiali**

La proteina Par j 2 utilizzata per la preparazione di SLN è stata sintetizzata dall'Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare "Alberto Monroy" (IBIM) del CNR di Palermo.

La tripalmitina (gliceril tripalmitato) e il Compritol HD5 ATO (miscela di mono, di- e trigliceridi dell'acido behenico peghilato) sono stati forniti dalla Gattefossè s.a. (Saint-Priest, France). La Cutina CP (trigliceridi dell'acido ricinoleico) è stata fornita dalla Cognis. Il Tween 80 (polietilenglicole sorbitan monooleato) è stato acquistato alla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'Epikuron 200 (fosfatidilcolina di soia 95%) è stata fornita dalla Lucas Meyer (Amburgo, Germania).

### **4.4.2 Sintesi e purificazione di par j2**

L'allergene Par j 2 è stato espresso come His-tagged proteina (pQE30 vector, QIAGEN, UK) nel ceppo NM15 (QIAGEN, UK). Dopo l'ottenimento della proteina ricombinante si è passati alla fase di induzione e purificazione della stessa. Come primo passaggio il lisato del batterio è stato caricato su colonna CM Sephadex a scambio ionico e la proteina ricombinante è stata eluita utilizzando un gradiente discontinuo di NaCl (0-2 M NaCl, 10 mM di tampone fosfato a pH 7.4, 6 M UREA). Le frazioni contenenti l'allergene sono state raccolte e caricate su colonna His-Trap equilibrata con lo Start Buffer (10 mM di tampone Na fosfato a pH 7.4, 1 M NaCl, 10 mM di imidazolo). Le colonne sono state lavate con Wash Buffer (10-50 mM

nello Start Buffer) e la proteina His-tagged è stata eluita usando un gradiente discontinuo d'imidazolo (10-50-500 mM nel tampone iniziale). Successivamente le frazioni sono state analizzate su un gel SDS-PAGE al 16% e le aliquote contenenti l'allergene ricombinante sono state raggruppate e dializzate con un tampone che non contiene urea in maniera da permettere la rinaturazione della proteina (Start Buffer w/o UREA) mediante l'uso di una colonna Sephadex G-25 equilibrata con 1 X PBS. La proteina ricombinante è stata purificata un'altra volta utilizzando il Detoxi-gel, un gel che rimuove le endotossine (PIERCE, USA) ed è stato testato il contenuto di endotossine attraverso il Multi-test Limulus Amebocyte (LAL), il test dei pirogeni (Bio-Whittaker, USA). Il contenuto di endotossine endogene della proteina ricombinante era di 0,006 ng LPS/mg. La concentrazione dell'allergene in acqua è stata determinata attraverso l'utilizzo del colorante blu Coomassie e analisi densitometrica. Le SLN vuote e caricate con l'allergene Par j 2 sono state preparate con la tecnica della doppia emulsione A/O/A.

#### ***4.4.3 SLN e NLC caricate con ParJ2***

Alla matrice lipidica costituita da 100 mg di cutina, fusa a bagnomaria, sono stati aggiunti sotto agitazione magnetica 20 mg di Epikuron 200 sciolti in 1,5 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Successivamente tale fase organica è stata posta all'Ultraturrax T125 (IKA, D-Staufen) a 13.500 rpm e sono stati addizionati 100 µl della soluzione acquosa contenente Par j 2 a concentrazione di 100 ng/µl. Si forma una prima emulsione w/o che viene successivamente addizionata con 3 ml una soluzione acquosa di Tween al 2% e dopo un minuto con una 6 ml di

soluzione acquosa di Tween al 1%. Dopo l'ultima aggiunta si lascia ad agitare all'Ultraturrax per 3 minuti. Le due soluzioni di Tween 80 costituiscono la fase esterna acquosa del sistema e sono necessarie per la formazione della doppia emulsione A/O/A. Le SLN così ottenute sono trasferite al Rotavapor per 30' al fine di eliminare tutto il CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Successivamente le SLN sono state liofilizzate sottoposte tramite l'uso di un freeze-dryer (Modulyo Freeze-Dryer, Labconco Corporation, Missouri, U.S.A.) e conservate in frigorifero per la successiva caratterizzazione.

Per ottenere le SLN del **Campione H** (SLN vuote), la soluzione di Par j 2 (100ng/μl) è stata sostituita con 100 μl di H<sub>2</sub>O sterile.

Per gli altri campioni sia vuoti che carichi di Par j 2, la tecnica utilizzata per le preparazioni è identica a quella precedentemente esposta, solo che ci sono alcune differenze per le quantità di tensioattivi utilizzati e per il tipo di matrice lipidica: nei **campioni A-B-C-D** è stata utilizzata la tripalmitina al posto della cutina e le quantità di Epikuron 200 sono rispettivamente 25 mg, 30 mg, 35mg e 10 mg; nei **campioni E ed F** sono stati utilizzati tripalmitina, 10 mg di Epikuron 200 e rispettivamente 256 mg e 64 mg di Tween 80; nel **campione G** e nel **corrispondente campione caricato di Par j 2** è stata cambiata soltanto la matrice lipidica che è la tripalmitina; nel **campione I** e nel **campione I caricato con Par j 2** sono stati utilizzati 100 mg di Compritol HD5 ; per la preparazione delle **SLN vuote in condizioni di sterilità** l'acqua milliQ è stata sostituita con l'acqua sterile e gli utensili di metallo sono stati sterilizzati con raggi UV, mentre la vetreria è stata posta in stufa a 180° per 24h; invece per la preparazione delle **SLN caricate con l'allergene in condizioni**

**di sterilità**, l'acqua sterile è stata sostituita da 100 µl di una soluzione acquosa sterile di Par j 2 con concentrazione 100 ng/µl.

#### ***4.4.4 Misure di dimensioni e di potenziale zeta***

Le dimensioni delle nanoparticelle e l'indice di polidispersità (misura della distribuzione delle particelle) sono state valutate mediante Spettroscopia di Correlazione Fotonica (PCS) usando uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) che utilizza una tecnologia di back-scattering non invasiva. I singoli campioni sono stati sospesi in acqua milliQ. Le misure sono state eseguite ad un angolo di 173° rispetto al raggio incidente e ad una temperatura di 25 °C. Ogni valore rappresenta la media di tre determinazioni.

La carica superficiale delle nanoparticelle o potenziale zeta ( $\zeta$ ) è stata valutata utilizzando dispersioni acquose di ciascun campione previamente liofilizzato. È stato utilizzato uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) che sfrutta la tecnica della microelettroforesi. Ogni valore ottenuto rappresenta la media di tre misure.

#### ***4.4.5 Analisi cromatografica di ParJ2***

Per la determinazione della capacità di carico dei sistemi nanoparticellari (loading capacity) è stato messo a punto un appropriato metodo HPLC.

L'analisi all'HPLC è stata condotta utilizzando un HPLC della Shimadzu Instrument equipaggiato con una colonna C<sub>5</sub> (Jupiter, 5 µm 250 x 4,60 mm i.d., Phenomenex) come fase stazionaria. Per la fase

mobile si è utilizzato un metodo a gradiente: partendo da 10% della soluzione di CH<sub>3</sub>CN contenente CF<sub>3</sub>COOH (0,1% v/v) e da 90% di H<sub>2</sub>O/CF<sub>3</sub>COOH (0,1% v/v) e si è arrivati dopo 1 ora di analisi al 60% di CH<sub>3</sub>CN/CF<sub>3</sub>COOH e al 40% di H<sub>2</sub>O/CF<sub>3</sub>COOH. Le analisi sono state effettuate con un flusso pari a 1ml/min.

Il detector UV-Vis, collegato all'uscita della colonna cromatografica è stato selezionato ad una lunghezza d'onda pari a 280 nm. L'analisi quantitativa dell'allergene intrappolato all'interno delle nanoparticelle è stata effettuata per confronto dell'area dei picchi cromatografici ottenuti con il valore dell'area ottenuta iniettando una soluzione diluita di una soluzione acquosa di Par j 2 a concentrazione 100ng/μl.

#### ***4.4.6 Determinazione della quantità di par j 2 incorporata nelle nanoparticelle***

La loading capacity (LC%) dei vettori nanoparticellari è stata determinata pesando una quantità nota (10 mg) di SLN liofilizzate contenenti Par j 2 e solubilizzandole in 1ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Successivamente veniva aggiunto 1ml di H<sub>2</sub>O al fine di estrarre l'allergene.

I risultati ottenuti sono stati espressi in termine di percentuale di farmaco contenuto in 100 mg di nanoparticelle liofilizzate.

#### ***4.4.7 Saggio biologico di espressione di CD203C***

Il sangue periferico eparinizzato è stato ottenuto da soggetti non allergici. Le aliquote di sangue (100 μl) sono state incubate con soluzioni acquose a diversa concentrazione dell'allergene Par j 2 (da 1

a 10000 ng/ml in 1 X PBS), con sospensioni acquose di SLN vuote e caricate con Par j 2, per 15 minuti a 37°C. Come controllo negativo è stato usato PBS 1X. Invece come controllo positivo sono stati usati gli anticorpi Anti-IgE (1 mg/ml).

Dopo incubazione, le cellule sono state risospese in 100 ml di tampone FACS (BD Pharmingen TM) e incubate con 20 ml del test della ficoeritrina classificato anti-CD203C mAb 976 (Immunotech, Marseille, France) per 20 minuti a 4°C al buio. I campioni sono stati sottoposti alla lisi degli eritrociti, lavati due volte in tampone FACS ghiacciato e analizzati attraverso la citometria a flusso su un citometro FACSCalibur a flusso. (Becton Dickinson). I basofili sono stati individuati sulla base delle caratteristiche del Side-Scatter (SSC, y-axis) e dell'espressione del CD203C (x-axis). Per ogni campione, sono state analizzate 100.000-200.000 cellule.

#### ***4.4.8 Saggio biologico per la valutazione dei pirogeni***

Il saggio in questione è il Multi-test Limulus Amebocyte Lysate (LAL). È un kit industriale della Bio-Whittaker (USA), che serve ad evidenziare la presenza di lipopolisaccaridi.

#### ***4.4.9 Stabilità delle sln create in condizioni di sterilità***

Sono stati condotti studi finalizzati alla determinazione della stabilità dei sistemi carichi con Par j 2 realizzati in condizioni di sterilità a distanza di 4 e 10 mesi dalla loro ultima preparazione. Per valutare le dimensioni dei sistemi carriers è stato utilizzato uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK), che utilizza una tecnologia di

back-scattering non invasiva. I singoli campioni sono stati sospesi in acqua milliQ e poi sono stati sonicati 5 minuti. Le misure sono state eseguite ad un angolo di  $173^\circ$  rispetto al raggio incidente e ad una temperatura di  $25^\circ\text{C}$ . Ogni valore rappresenta la media di tre determinazioni.

La carica superficiale delle nanoparticelle (potenziale Zeta) è stata valutata sospendendo le SLN in acqua milliQ, previamente liofilizzate e sonicando per 5 minuti. È stato utilizzato uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) che sfrutta la tecnica della microelettroforesi. Ogni valore ottenuto rappresenta la media di tre misure.

## ***5. CONCLUSIONI***

In tutti i lavori sperimentali presentati in questa tesi i nanovettori lipidici hanno dimostrato avere delle eccezionali qualità in termini tecnologico-farmaceutici che ne fanno dei Drug Delivery Systems ottimali. Per ogni principio attivo veicolato, infatti, sono stati migliorati sensibilmente sia i profili farmacocinetici che gli effetti citotossici a livello cellulare in relazione ai rispettivi principi attivi non veicolati. Gli studi delle cinetiche di rilascio, infatti, hanno dimostrato che il farmaco veicolato si rende biodisponibile seguendo cinetiche più fluide e regolari rispetto al farmaco in forma libera. Inoltre, i sistemi nanoparticellari, hanno anche incrementato le quantità di farmaco che riesce a raggiungere l'ambiente citosolico intracellulare, come si evince sia dai saggi di citotossicità che dai test in vitro condotti al fine di valutare l'attività di uptake intracellulare.

I sistemi caricati con Tyrphostin AG1478 a base di Tripalmitina ed Acconon CC6 sono caratterizzati da dimensioni di 189,3 nm e da valori di potenziale  $\zeta$  di -38,4 mV, valori che ne assicurano un'elevata stabilità termodinamica. L'effetto citotossico della Tyrphostin AG1478 nei confronti di popolazioni cellulari di epatocarcinoma umano (HA22T/VGH) è stato notevolmente amplificato rispetto al farmaco libero. I risultati di saggi clonogenici, infatti, hanno dimostrato che a concentrazione di 25  $\mu$ M le colonie cellulari trattate con i complessi farmaco-nanovettori erano di circa 8 volte inferiori rispetto alle colonie cellulari trattate con farmaco libero. Ciò denota un'attività citotossica nei confronti di linee cellulari di epatocarcinoma umano nettamente amplificata rispetto a Tyrphostin AG1478 libero.

I sistemi caricati con Curcumino e progettati per il trattamento dei neuroblastomi, in particolar modo i sistemi costituiti da Copritol 888 ATO, sono caratterizzati da dimensioni di 110,15 nm e Potenziale  $\zeta$  di -27,3 mV, caratteristiche che anche in questo caso denotano una notevole stabilità fisica. Il profilo farmacocinetico del principio attivo è notevolmente migliorato in quanto risulta più lento e lineare; dopo 24h, infatti, solo il 14% circa di curcumino è biodisponibile mentre la restante parte viene rilasciata in maniera costante dopo le 24h. Inoltre la citotossicità mirata verso linee cellulari di neuroblastoma umano determinata tramite saggi MTS è notevolmente migliorata rispetto ai valori ottenuti dal trattamento con Curcumino non veicolato.

I sistemi impiegati per la veicolazione dei derivati dell'R-Flurbiprofen, caratterizzati da dimensioni comprese tra i 170 ed i 250 nm, hanno aumentato notevolmente l'uptake intracellulare del Flurbiprofen senza interferire marcatamente sulla vitalità cellulare.

I sistemi adoperati per la veicolazione dell'antigene proteico ParJ2 hanno mostrato essere completamente biocompatibili e di non interferire con l'attivazione del sistema macrofagico. Inoltre rimangono fisicamente stabili anche dopo 10 mesi, mantenendo dimensioni e carica superficiale entro valori più che accettabili.

In definitiva tutti i sistemi oggetto di questo lavoro di tesi hanno mostrato eccezionali caratteristiche chimico-fisiche che ne fanno dei nanovettori dalle elevate potenzialità in ambito chimico-farmaceutico. Il loro sviluppo e la loro commercializzazione, infatti, potrebbe contribuire al miglioramento sempre crescente della qualità della vita di soggetti affetti da particolari patologie. I principi attivi che normalmente possiedono una bassa selettività e, conseguentemente, un'elevata aggressività nei confronti dei tessuti sani, potrebbero essere

somministrati a dosi più basse e senza il rischio di incorrere in rischi di sovradosaggi o nella comparsa di effetti secondari. Inoltre, l'impiego di materiali interamente biocompatibili e l'assenza di solventi organici negli step preparativi delle nanoparticelle lipidiche, ne permette una rapida metabolizzazione in vivo senza determinare effetti accessori a quelli del principio attivo veicolato. Il costo relativamente basso delle materie prime necessarie alla preparazione, infine, rende possibile una produzione industriale su larga scala.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Price, Waterhouse, Coopers, *Pharma 2005* **1998**, 1-20.
2. Collins M. A., Shaw I., Billington D. D., *Drug Des. Discov* **1999**, 16, 181-194.
3. Drews J., Ryser S., *Nature Biotechnol.* **1997**, 15, 1318-1319.
4. Drews J., Ryser, S., *Drug Disc. Today* **1997**, 2, 365-372.
5. Di Masi J.A., *Clin. Pharmacol. Ther* **2001**, 69, 286-296.
6. Kuhlmann J., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1997**, 35, (541-552).
7. Venkatesh S., Lipper, R. A., *J. Pharm. Sci* **1999**, 89, (145-154).
8. Prentis R. A., Lis Y., Walker S. R., *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1988**, 25, (384-396).
9. Calcagno A.M., Teruna J.S., Physiological, biochemical, and chemical barriers to oral drug delivery. In *Drug delivery: principles and applications*, John Wiley & Sons: 2006.
10. Bangham A.D., Hill M.W., Miller N.G.A., In *Methods in membrane biology* ed., K., Ed. Plenum press: New York, 1974; pp 1-68.
11. Damen J., Regts J., Scherphof G., Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 665, 538-554.
12. Sriram V., Rhoedes C.T., Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica acta helvetiae* **1994**, 70, 95-111.

13. Szoka F., Papahadjopoulos D., Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Biochem* **1978**, 75, 4194-4198.
14. Deamer D.W., Bangham A.D., Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 443, 629-663.
15. Schieren H., Rudolph S., Finkelstein M., Coleman P., Weissmann G., Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method, with multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 542, 137-146.
16. Pick U.I., Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. biochem. biophys.* **1981**, 212, 1986-1994.
17. Peppas N.A., Mikos A.G., Preparation methods and structure of hydrogels. In *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Peppas N.A., Ed. Boca Raton, 1986; Vol. 1, pp 1-27.
18. Brannon L., Peppas N.A., Preparation and characterization of crosslinked hydrophilic networks. In *Absorbent Polymer Technology*, Brannon L., Peppas N.A., Ed. Elsevier: Amsterdam, 1990; pp 45-66.
19. Peppas N.A., Merrill E.W., PVA hydrogels: reinforcement of radiation-crosslinked networks by crystallization. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1976**, 14, 441-457.
20. Peppas N.A., Mongia N.K., Ultrapure poly (vinil alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1997**, 43, 51-58.
21. Flory P.J., Rehner J., Statistical mechanics of cross-linked polymer networks. II. Swelling,. *J. Chem. Phys.* **1943**, 11, 521-526.

22. Flory P.J., Statistical mechanics of swelling of network structures. *J. Chem. Phys.* **1950**, 18, 108-111.
23. Flory P.J., Principles of Polymer Chemistry. *Cornell University Press* **1953**.
24. Ratner B.D., Hoffman A.S. In *Synthetic hydrogels for biomedical applications*, Hydrogels for Medical and Related Applications, 31<sup>th</sup> ACS Symposium Series, 1976; Andrade J.D., Ed. 31<sup>th</sup> ACS Symposium Series, 1976; pp 1-36.
25. Peppas N.A., Hydrogels in Medicine. *CRS Press* **1986**.
26. Peppas N.A., New challenges in biomaterials. *Science* **1994**, 263, 1725-1720.
27. Park K., *Controlled Release: Challenges and Strategies*. ACS: Washington, 1997.
28. Peppas N.A., Hydrogels and drug delivery. *Curr. Opin. Coll. Int. Sci.* **1997**, 2, 531-537.
29. Peppas N.A., Merrill E.W., Differential scanning calorimetry of crystallized PVA hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* **1976**, 20, 1457-1465.
30. Peppas N.A., Hydrogels of polyvinylalcohol and its copolymers. In *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Peppas N.A., Ed. Boca Raton, 1986; Vol. 2, pp 1-48.
31. Stauffer S.R., Peppas N.A., Poly (vinil alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. *Polymer* **1992**, 33, 3932-3936.
32. Hickey A.S., Peppas N.A., Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly (vinil alcohol) membranes prepared by freezing/thawing techniques. *J. Membr. Sci* **1995**, 107, 229-237.

33. Kabanov V.A., Papisov I.M., Formation of complexes between complementary synthetic polymers and oligomers in dilute solution. *Vysokolmol. Soedin.* **1979**, 43, 243-281.
34. Bekturov E.A., Bimendina L.A., Interpolymer complexes. *Adv. Polym. Sci.* **1981**, 43, 100-147.
35. Tsuchida E., Abe K., Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes *Adv. Polym. Sci.* **1982**, 45, 1-119.
36. Klier J., Peppas N.A., Structure and swelling behavior of poly (ethylene glycol)/poly (methacrylic acid) complexes. In *Absorbent Polymer Technology*, Brannon L., Peppas N.A., Harland R.S., Ed. Elsevier: Amsterdam, 1990; pp 147-169.
37. Bell C.L., Peppas N.A., Biomedical membranes from hydrogels and interpolymer complexes. *Adv. Polym. Sci.* **1995**, 122, 125-175.
38. Peppas N.A., Physiologically responsive gels. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1991**, 6, 117-118.
39. Langer R., Drug delivery and targeting. *Nature* **1998**, 392, 5-10.
40. Huang Y., Leobandung W., Foss A., Peppas N.A., Molecular aspects of muco. And bio-adhesion: tethered structures and site-specific surfaces. *J. Control. Release* **2000**, 65, 63-71.
41. Peppas N.A., Physiological responsive gels. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1991**, 6, 241-246.
42. Szejtli J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743-1753.
43. Singh M., Rohit S., Banerjee U.C., Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances* **2002**, 20, 341-359.

44. Merkus F.W., Verhoef J.C., Marttin E., Romeijn S.G., Van der Kuy P.H.M., Hermens W.A., Schipper N.G., Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **1999**, 36, 41-57.
45. Loftssona T., Jarvinen T., Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **1999**, 36, 59-79.
46. Matsuda H., Arima H., Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 36, 81-99.
47. Croyle M.A., Cheng X., Wilson J.M., Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Ther.* **2001**, 8, 1281-1290.
48. Hoar T.P., Schulman J.H., Transparent water-in-oil disper- vestigations into the formation and characterisation of phossions: the oleopathic hydro-micelle. *Nature* **1943**, 152, 102-103.
49. Schulman J.H., Stoeckenius W., Mechanism of influence of oil. *Int. J. Pharm.* **1995**, 125, 107-116.
50. Danielsson I., Lindman B., The definition of a microemul- phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diasion. *Colloids and Surfaces* **1981**, 3, 391-392.
51. Shinoda K., Lindman B., Organised surfactant systems: myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, microemulsions. *Langmuir* **1987**, 3, 135-149.
52. Lawrence M.J., Rees G.D., Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 45, 89-121.
53. Bhargava H.N., Narurkar A., Lieb L.M., Using microemulsions for drug delivery. *Pharm. Tech.* **1987**, 11, 46-52.

54. Attwood D., Microemulsions. In *Colloidal Drug Delivery Systems*, Kreuter J., Ed. Dekker: New York, 1994; pp 31-71.
55. Eccleston J., Microemulsions. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Swarbrick J., Boylan J.C., Ed. Dekker: New York, 1994; Vol. 9, pp 375-421.
56. Lawrence M.J., Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1994**, 3, 257-269.
57. Lawrence M.J., Microemulsions as drug delivery vehicles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, 1, 826-832.
58. Tenjarla S., Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* **1999**, 16, 461-521.
59. Sarciaux J.M., Acar L., Sado P.A., Using microemulsion formulations for drug delivery of therapeutic peptides. *Int. J. Pharm.* **1995**, 120, 127-136.
60. Constantinides S.S., Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.* **1995**, 12, 1561-1572.
61. Lee V.H.L., Enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1988**, 5, 69-97.
62. Malcomson C., Satra C., Kantaria S., Sidhu A., Lawrence M.J., Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into nonionic oil-in-water microemulsions. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 109-116.
63. Stella V.J., Borchardt R.T., Hageman M., Oliyai R., Maag H., Tilley J., Prodrugs: challenges and rewards. *AAPS Press* **2007**.
64. Testa B., Mayer J.B., Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. *Chemistry, Biochemistry and Enzymology* **2003**.

65. Ettmayer P., Amidon G.L., Clement B., Testa B., Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2393-2404.
66. Testa B., Prodrug research: futile or fertile. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 68, 2097-2106.
67. Stella V.J., Kwame W., Nti-Addae, Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, 59, 677-694.
68. Heimbach T., Oh D.M., Li L.Y., Forsberg M., Savolainen J., Leppanen J., Matsunaga Y., Flynn G., Fleisher D., Absorption rate limit considerations for oral phosphate prodrugs. *Pharm. Res.* **2003**, 20, 848-856.
69. Perry C.M., McTavish D., Estramustine phosphate sodium. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in prostate cancer. *Drugs Aging* **1995**, 7, 49-74.
70. Wadsten T., Lindberg N.O., Polymorphism of estramustine. *J. Pharm. Sci.* **1989**, 7, 563-566.
71. Falcoz C., Jenkins J.M., Bye C., Hardman T.C., Kenney K.B., Studenberg S., Fuder H., Prince W.T., Pharmacokinetics of GW433908, a prodrug of amprenavir, in healthy male volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, 8, 887-989.
72. Becker S., T. L., Fosamprenavir: advancing HIV protease inhibitor treatment options. *Exp. Opin. Pharmacotherapy* **2004**, 5, 1995-2005.
73. Furfine E.S., Baker C.T., Hale M.R., Reynolds D.J., Salisbury J.A., Searle A.D., Studenberg S.D., Todd D., Tung R.D., Spaltenstein A., Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 791-798.
74. Corbett A.H., Kashuba A.D.M., Fosamprenavir. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2002**, 3, 384-390.

75. Wire M.B., S. M. J., Studenberg S., Fosamprenavir: clinical pharmacokinetics and drug interactions of the amprenavir prodrug. *Clin. Pharmacokinet.* **2006**, 45, 137-168.
76. Stella V.J., A case for prodrugs: fosphenytoin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1966**, 19, 311-330.
77. Gerber N., Mays D.C., Donn K.H., Laddu A., Guthrie R.M., Turlapaty P., Quon C.Y., Rivenburg W.K. , Safety, tolerance and pharmacokinetics of intravenous doses of the phosphate ester of 3-hydroxymethyl-5,5-diphenylhydantoin: a new prodrug of phenytoin. *J. Clin. Pharmacol.* **1988**, 28, 1023-1032.
78. Allemann E., Patricia G., Leroux G.C., Luc B., Gurnay R., Kinetics of blood component-adsorption on poli(D,L-lactide) nanoparticles: evidence of compliment C3 component involvement. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37, 229-234.
79. Blunk T., Lück M., Calvoer A., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C., Muller B.W., Müller R.H., Kinetics of plasma protein adsorption on model particles for controlled drug delivery and drug targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1996**, 42, 262-268.
80. Gref R., Domb A., Quellec P., Blunk T., Müller R.H., Verbavatz J.M., Langer R., The controlled intravenous delivery of drug using PEG-coated sterically stabilized nonospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, 16, 215-233.
81. Peracchia M.T., Harnisch S., Pinto-Alphandary H., Gulic A., Dedieu J.C., Desmaële D., D'Angelo J., Müller R.H., Couvreur P., Visualization of in vitro protein-rejecting proprieties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* **1999**, 20, 1269-1275.
82. Monfardini C., Veronese F.M., Stabilization of substances in circulation. *Biocong. Chem.* **1998**, 9, 418-450.

83. Gref R., Miralles G., Dellacherie E., Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis. *Polymer Int.* **1999**, 48, 251-256.
84. Scholes P.D., Coombes A.G.A., Illum L., Davis S.S., Vert M., Davies M.C., The preparation of sug-500 nm poly(lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery. *J. Control. Rel.* **1993**, 25, 145-153.
85. Behan N., Birkinshaw C., Clarke N., A study of the factors affecting the formation of poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Proced. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **1999**, 26, 1134-1135.
86. Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y., Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug delivery behavior. *J. Control. Rel.* **1993**, 25, 89-98.
87. Wehrle P., Magenheimer B., Benita S., The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design. *J. Pharm. Biopharm.* **1995**, 41, 19-26.
88. Murakami H., Yoshino H., Mizobe M., Kobayashi M., Takeuchi H., Kawashima Y., Preparation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) latex for surface modifying material by a double coacervation method. *Proced. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **1996**, 23, 361-362.
89. Allemann E., Gurnay R., Doelker E., Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size *Int. J. Pharm.* **1992**, 87, 247-253.
90. Allemann E., Leroux J.C., Gurnay R., Doelker E., In-vitro extended-release properties of drug-loaded poly(D,L-lactic) acid nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm. Res.* **1993**, 10, 1732-1737.
91. Tom J.W., Debenedetti P.G., Particle formation with supercritical fluids: a review. *J. Aerosol Sci.* **1991**, 22, 555-584.

92. Randolph T.W., Randolph A.D., Mebes M., Yeung S., Submicron-sized biodegradable particles of poly(L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process. *Biotechnol. Prog.* **1993**, 9, 429-435.
93. Benedetti L., Bertucco A., Lora M., Pallado P In I fluidi supercritici e le loro applicazioni, 2008; Kikic I., Alessi P. , Ed. 2008; p 221.
94. Mishima K., Matsuyama K., Tanabe D., Yamauchi S., Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent. *AIChE J.* **2000**, 46, 857-865.
95. Tom J.W., Debenedetti P.G., Formation of bioerodible polymeric microspheres and microparticles by rapid expansion of supercritical solution. *Biotechnol. Prog.* **1991**, 7, 403-411.
96. Tom J.W., Debenedetti P.G., Jerome R., Preparation of poly(L-lactic acid) and composite poly(L-lactic acid)-pyrene by rapid expansion of supercritical solution. *J. Supercritic. Fluid* **1994**, 7, 9-29.
97. Mawson S., Johnston K.P., Combes J.R., De Simone J.M., Formation of poly(1,1,2,2-tetrahydroperfluorodecyl acrylate)submicron fibers and particles from supercritical carbon dioxide solutions. *Macromolecules* **1994**, 28, 481-489.
98. Smith A., Hunneyball I.M., Evaluation of polylactid as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int. J. Pharm.* **1986**, 30, 215-230.
99. Mehnert W., Mader K., Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47, 165-196.
100. Muller R.H., Mader K., Gohla S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, 161-177.

101. Mehnert W., Muhlen A., Dingler A., Weyhers H., Muller R.H., Solid lipid nanoparticles (SLN): ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika: II. Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung und Sterilisierbarkeit. *Pharm. Ind.* **1997**, 59, 511-514.
102. Jennings V., Gohla S., Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Microencapsul.* **2001**, 18, 149-158.
103. Jennings V., Thunemann A.F., Gohla S.H., Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* **2000**, 1999, 167-177.
104. Jennings V., Mader K., Gohla S.H., Solid lipid nanoparticles (SLN) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a <sup>1</sup>H-NMR study. *Int. J. Pharm.* **2000**, 205, 15-21.
105. Anon A., Code of federal regulations. *Food Drugs* **2001**, 21, 170.
106. Almeida A.J., Runge S., Muller R.H., Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence of production parameters. *Int. J. Pharm.* **1997**, 149, 255-265.
107. Lander R., Manger W., Scouloudis M., Ku A., Davis C., Lee A., Gaulin homogenization: a mechanistic study. *Biotechnol. Prog.* **2000**, 16, 80-85.
108. Jahnke S., The theory of high pressure homogenization. In *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*, Muller R.H., Benita S., Bohm B., Ed. Medpharm Scientific: 1998; pp 177-200.
109. Siekmann B., Westesen K., Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol: preparation and particle size determination. *Pharm. Pharmacol.* **1994**, 3, 194-197.
110. Bunjes H., Siekmann B., Westesen K., Emulsions of supercooled melts: a novel drug delivery system. In *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, Benita S., Ed. Harwood Academic: 1998; pp 175-204.

111. Muhlen A. Feste Lipid-Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation: Herstellung, Langzeitstabilitat, Charakterisierung, Freisetzungverhalten und mechanismen. Free university of Berlin, 1996.
112. Siekmann B., Westesen K., Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1996**, 43, 104-109.
113. Ahlin P., Kristl J., Smid-Kobar J., Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions. *Acta Pharm.* **1998**, 48, 257-267.
114. Borgstrom B., On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate and the importance of bile salts. *J Lipid Res* **1975**, 16, 411-417.
115. Müller R. H., Mehnert W., Luck J. S., Solid lipid nanoparticles (SLN): an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* **1995**, 41, 62-69.
116. Muller R.H., Radtke M., Wissing S.A., Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* **2002**, 242, 121-128.
117. Alyautdin R.N., Petrov V.E., Langer K., Berthold A., Kharkevich D.A., Kreuter J., Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with Polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* **1997**, 14, 325-328.
118. Muller R.H., Luck M., Kreuter J. Arzneistofftragerpartikel fur die gewebsspezifische arzneistoffapplikation. 1997.
119. Mehnert W., Mader K., Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliver Rev* **2001**, 47, 165-196.
120. Bocca C., Caputo O., Cavalli R., Gabriel L., Miglietta A., Gasco M.R., Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **1998**, 175, 185-193.

121. Cavalli R., Bocca C., Miglietta A., Caputo O., Gasco M.R., Albumin adsorption on stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *STP Pharma Sci.* **1999**, 9, 183-189.
122. Alyautdin R.N., Petrov V.E., Langer K., Berthold A., Kharkevich D.A., Kreuter J., Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with Polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* **1997**, 14, 325-328.
123. Yang S.C., Lu L.F., Cai Y., Zhu J.B., Liang B.W., Yang C.Z., Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Control. Release* **1999**, 59, 299-307.
124. Asghar L.F., Chandran S., Multiparticulate formulation approach to colon specific drug delivery: current perspectives. *J Pharm Pharmaceut Sci* **2006**, 9, 327-338.
125. Francis M.F., Cristea M., Winnik F.M., Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. *Pure Appl Chem.* **2004**, 76, 1321-1335.
126. Fetzner A., Bohm S., Schreder S., Schubert R. , Degradation of raw or film-incorporated  $\beta$ -cyclodextrin by enzymes and colonic bacteria. *Eur J Pharm Biopharm* **2004**, 58, 91-97.
127. Cattaneo L., *Compendio di anatomia umana.* 1988.
128. Guarner F., Malagelada J.R., Gut flora in health and disease. *The Lancet* **2003**, 8, 360.
129. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings *Adv Drug Del Rev* **2001**, 46, 3-26.
130. Brain J.D., Inhalation, deposition, and fate of insulin and other therapeutic proteins. *Diabetes Technol Ther* **2002**, 9, S4-S15.

131. Patton J.S., Byron P.R., Inhaling medicines: Delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 67-74.
132. Edwards D.A., Dunbar C., Bioengineering of therapeutic aerosols. *Annu Rev Biomed Eng* **2002**, 4, 93-107.
133. Musante C.J., Schroeter J.D., Rosati J.A., Crowder T.M., Hickey A.J., Martonen T.B., Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles. *J Pharm Sci* **2002**, 91, 1590-1600.
134. Patton J.S., The promise of pulmonary drug delivery. *Drug Deliv Rep* **2004**, 35-38.
135. Proksch E., Brandner J.M., Jensen J.M., The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* **2008**, 17, 1063-1072.
136. Madison K.C., Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* **2003**, 121, 231-241.
137. Tarl W.P., Jeffrey E.G., Lynlee L.L., Rokhaya F., Butler M., Wolfgang B., Wurm E.M.T., Yoong C., Robertson T.A., Soyer P.H., Roberts M.S., Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63, 470-491.
138. Muller R.H., Radtke M., Wissing S.A., Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, S131-S155.
139. Viores S.A., Assessment of blood-retinal barrier integrity. *Histology and Histopathology* **1995**, 1, 141-154.
140. Saishin Y., Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal neovascularization in a porcine model. *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.* **2003**, 44, 4989-4993.

141. Gomes dos Santos A.L., Sustained release of nanosized complexes of polyethylenimine and anti-TGF-beta2 oligonucleotide improves the outcome of glaucoma surgery. *J. Control. Release* **2006**, 112, 369-381.
142. Mehnert W., Mader K., Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47, 165-196.
143. Olbrich C., Mehnert W., Müller R.H. In *Effect of surfactant and lipid composition on the vitro degradation time of solid lipid nanoparticles SLN*, International Symposium Controlled Release Bioactive Materials, 1997; 1997; pp 921-922.
144. Muller R.H., Ruhl D., Runge S.A., Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *International Journal of Pharmaceutical* **1996**, 144, 115-121.
145. Muller R.H., Olbrich C., Solid lipid nanoparticles:phagocytic uptake, in vitro cytotoxicity and in vitro biodegradation. *Pharm. Ind.* **1999**, 61, 546-569.
146. Olbrich C., Muller R.H., Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int. J. Pharm.* **1999**, 180, 31-39.
147. Olbrich C., Mehnert W., Müller R.H. In *Development of an in vitro degradation assay for solid lipid nanoparticles*, 2th world Meeting APGI/APV, Paris, 1998; Paris, 1998; pp 627-628.
148. Stroffolini T., Chiaromonte M., Tiribelli C., HBsAg carrier state and hepatocellular carcinoma: relative risk and population attributable risk from a case-control study in Italy. *J. Hepatol.* **1992**, 360-363.
149. Simonetti R.G., Cammà C., Fiorello F., Hepatitis C virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. A case-control study. *Ann. Int. Med* **1992**, 116, 97-102.

150. Simonetti R.G., Liberati A., Angiolini C., Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Ann Oncol* **1997**, 8, 117-136.
151. Farinati F., Salvagnini M., De Maria N., Unresectable hepatocellular carcinoma: A Prospective controlled trial with tamoxifene. *J Hepatol* **1990**, 15, 665.
152. Martinez-Cerezo F.J., Tomàs A., Donoso L., Controlled trial of tamoxifen in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **1994**, 20, 702-706.
153. Elba S., Giannuzzi V., Misciagna G., Randomized controlled trial of tamoxifen versus placebo in inoperable hepatocellular carcinoma. *Ital J Gastroenterol* **1994**, 18, 287-292.
154. Manesis E.K., Giannoulis G., Zoumboulis P., Treatment of hepatocellular carcinoma with combined suppression and inhibition of sex hormones: a randomized, controlled trial. *Hepatology* **1995**, 26, 444-450.
155. Villa E., Moles A., Ferretti I., Buttafoco A., Grottola A., Natural history of inoperable hepatocellular carcinoma: estrogen receptor's status in the tumour is the strongest prognostic factor for survival. *Hepatology* **2000**, 159, 1011-1016.
156. Livraghi T., Giorgio A., Marin G., Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* **1995**, 197, 101-108.
157. Rossi S., Di Stasi M., Buscarini E., Percutaneous radiofrequency interstitial thermal ablation in the treatment of liver cancer. *AJR* **1996**, 167, 759-768.
158. Uchida H., Matsuo N., Nishimine K., Transcatheter arterial embolization for hepatoma with lipiodol. Hepatic arterial and segmental use. *Sem Intervent Radiol* **1993**, 10, 19-26.

159. Nakamura H., Mitani T., Murakami T., Five-year survival after transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **1994**, 33, S89-S92.
160. Chang J.M., Tzeng W.S., Pan H.B., Transcatheter arterial embolization with or without cisplatin in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer* **1994**, 74, 2449-2453.
161. Hatanaka Y., Yamashita Y., Takahashi M., Unresectable hepatocellular carcinoma: analysis of prognostic factors in transcatheter management. *Radiology* **1995**, 165, 61-63.
162. Nagino M., Nimura Y., Kamiya J., Selective percutaneous transhepatic embolization of the portal vein in preparation for extensive liver resection: the ipsilateral approach. *Radiology* **1996**, 205, 372.
163. Katzung B.G., *Farmacologia generale e clinica*. 2003.
164. Ito Y., Takeda T., Sakon M., Tsujimoto M., Higashiyama S., Noda K., Miyoshi E., Monden M., Matsuura N., Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* **2001**, 84, 1377-1383.
165. Kira S., Nakanishi T., Suemori S., Kitamoto M., Watanabe Y., Kajiyama G., Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma. *Liver* **1997**, 17, 177-182.
166. Sahu A., Bora U., Kasoju N., Goswami P., Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater.* **2008**, 4, 1752-1761.
167. Sou K., Inenaga S., Takeoka S., Tsuchida E., Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2008**, 352, 287-293.

168. Shishodia S., Sethi G., Aggarwal B.B., Curcumin: getting back to the roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, 1056, 206-217.
169. Chen Y.C., Tsai S.H., Shen S.C., Lin J.K., Lee W.R., Alternative activation of extracellular signal-regulated protein kinases in curcumin and arsenite-induced HSP70 gene expression in human colorectal carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2001**, 80, 213-221.
170. Bukau B., Horwich A.L., The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **1998**, 92, 351-366.
171. Wang H.G., Rapp U.R., Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* **1996**, 87, 629-938.
172. Tran S., Holmstrom T., MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from FAS, TNF and TRAIL receptors. *J Biol Chem* **2001**, 276, 16484-16490.
173. Chen Y.C., Tsai S.H., Shen S.C., Lin J.K., Lee W.R., Alternative activation of extracellular signal-regulated protein kinases in curcumin and arsenite-induced HSP70 gene expression in human colorectal carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2001**, 80, 231-221.
174. Brookmeyer R., Gray S., Kawas C., Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *American Journal of Public Health* **1998**, 88, 1337-1342.
175. Liesi E.H., Paul A.S., Judith J., Laurel A., Denis A., Evans R., Is the Risk of Developing Alzheimer's Disease Greater for Women than for Men? *Am. J. Epidemiol.* **2001**, 153, 132-136.
176. Bermejo-Pareja F., Benito-Leon J., Vega S., Medrano M.J., Roman and on behalf of the Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. *Journal of the Neurological Sciences* **2008**, 264, 63-72.
177. Selkoe D.J., Podlisny M.B., Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2002**, 3, 67-99.

178. Areosa S.A., Sherriff F., McShane R., Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* **2005**, 3.
179. Hook V.Y., Toneff T., Aaron W., Yasothornsrikul S., Bunday R., Reisine T.,  $\beta$ -Amyloid peptide in regulated secretory vesicles of chromaffin cells: evidence for multiple cysteine proteolytic activities in distinct pathways for b-secretase activity in chromaffin vesicles. *J Neurochem.* **2002**, 81, 237-256.
180. Sastre M., Dewachter I., Robner S., Bogdanovic N., Rosen E., Borghgraef P., Evert B., Dumitrescu-Ozimek L., Thal D., Landreth G., Walter J., Klockgether T., van Leuven F., Heneka M.T., NSAIDs repress BACE1 gene promoter activity by activation of the peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 443-448.
181. Robner S., Sastre M., Bourne K., Lichtenthaler S.F., Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression: implications for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* **2006**, 79, 95-111.
182. Lehmann J.M., Lenhard J.M., Oliver B.B., Ringold G.M., Kliewer S.A., Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 3406-3410.
183. Leipold D.D., Kantoci D., Murray E.D., Quiggle D.D., Wechter W.J., Bioinversion of R-Flurbiprofen to S-Flurbiprofen at Various Dose Levels in Rat, Mouse, and Monkey. *Chirality* **2004**, 16, 379-387.
184. Goppert T.M., Müller H., Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, 60, 361-372.
185. Linchtenstein I., IgE antibody measurements in ragweed hayfever, relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest* **1973**, 52, 472-482.

186. Gleich G.J., Effects of immunotherapy on Immunoglobulin E and Immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens : a six years prospective study. *JACI* **1982**, 70, 261-271.

187. Durham S.R., Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* **1991**, 1, S206-S210.

# SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 LIPOSOMI</b>	<b>6</b>
<b>1.2 IDROGEL</b>	<b>10</b>
<b>1.3 CICLODESTRINE</b>	<b>15</b>
<b>1.4 MICROEMULSIONI</b>	<b>21</b>
<b>1.5 PROFARMACI</b>	<b>26</b>
<b>1.6 NANOPARTICELLE POLIMERICHE</b>	<b>29</b>
<b>1.7 NANOPARTICELLE LIPIDICHE</b>	<b>33</b>
1.7.1 TECNICHE DI PREPARAZIONE DELLE NANOSTRUTTURE LIPIDICHE	39
1.7.2 CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA	52
1.7.3 VIE DI SOMMINISTRAZIONE	56
<b>2.SCOPO DELLA TESI</b>	<b>85</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>87</b>
<b>3.1 APPROCCIO TERAPEUTICO A EPATOCARCINOMI E NEUROBLASTOMI CON NANOPARTICELLE LIPIDICHE SOLIDE</b>	<b>87</b>
3.1.1 CENNI GENERALI SULL'EZIOPATOLOGIA DEI TUMORI	87
3.1.2 EPATOCARCINOMI	95
3.1.3 NLC CARICATE CON TYRPHOSTIN AG1478	102
3.1.4 NEUROBLASTOMI	118
3.1.5 NLC CARICATE CON CURCUMINO	124
<b>3.2 EZIOPATOLOGIA DEL MORBO DI ALZHEIMER</b>	<b>137</b>
3.2.1 PREPARAZIONE DI SISTEMI NLC CARICATI CON PROFARMACI DELL' R-FLURBIPROFEN	155
<b>3.3 PARJ2 E PROCESSI ALLERGICI</b>	<b>183</b>
3.3.1 PREPARAZIONE DI NANOVETTORI PER LA VEICOLAZIONE DI PARJ2	192
<b>4 PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>202</b>
<b>4.1 TRATTAMENTO DI NEUROBLASTOMI</b>	<b>202</b>
4.1.1 PREPARAZIONE DEI CARRIER NANOSTRUTTURATI CONTENENTI CURCUMINO	202
4.1.2 DETERMINAZIONE DELLE DIMENSIONI DELLE NANOPARTICELLE	202
4.1.3 MISURE DI POTENZIALE ZETA	203
4.1.4 ANALISI CROMATOGRAFICA DEL CURCUMINO	203
4.1.5 DETERMINAZIONE DELLA LOADING CAPACITY	204

4.1.6	STABILITÀ DEL CURCUMINO IN TAMPONE FOSFATO PH 7.4/OTTANOLO	204
4.1.7	PROFILO DI RILASCIO DI CURCUMINO DALLE NANOPARTICELLE IN TAMPONE FOSFATO PH 7.4/OTTANOLO	205
4.1.8	STABILITÀ DEL CURCUMINO IN PLASMA UMANO	206
4.1.9	PROFILO DI RILASCIO DI CURCUMINO DALLE NLC IN PLASMA UMANO	206
4.1.10	COLTURE CELLULARI	207
<b>4.2</b>	<b>TRATTAMENTO EPATOCARCINOMI</b>	<b>208</b>
4.2.1	MATERIALI	208
4.2.2	PREPARAZIONE NLC CARICATE CON TYRPHOSTIN AG1478	208
4.2.3	ANALISI DIMENSIONALI E DI CARICA SUPERFICIALE	209
4.2.4	CONDIZIONI HPLC	210
4.2.5	DETERMINAZIONE LC%	210
4.2.6	STUDIO DELLE CINETICHE DI RILASCIO	211
4.2.7	SAGGI DI CITOTOSSICITÀ	212
<b>4.3</b>	<b>TRATTAMENTO DEL MORBO DI ALZHEIMER</b>	<b>213</b>
4.3.1	MATERIALI	213
4.3.2	METODI	214
4.3.3	ESTERIFICAZIONE DI FISCHER IN CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	214
4.3.4	ESTERIFICAZIONE DI FISCHER IN DMF/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	215
4.3.5	ESTERIFICAZIONE CON CARBONILDIIMIDAZOLO (CDI)/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	215
4.3.6	ESTERIFICAZIONE CON CARBONILDIIMIDAZOLO (CDI) E TRIETILAMMINA (TEA)	216
4.3.7	ESTERIFICAZIONE CON CARBONILDIIMIDAZOLO (CDI) E DIMETILFORMAMMIDE (DMF) ANIDRA	216
4.3.8	ESTERIFICAZIONE CON DCC, NHS, 1-ESANOLO IN DIMETILFORMAMMIDE DMF ANIDRA	217
4.3.9	ESTERIFICAZIONE VIA CLORURO ACILICO ED 1-ESANOLO	217
4.3.10	ESTERIFICAZIONE VIA CLORURO ACILICO ED ETANOLO	218
4.3.11	PREPARAZIONE DELLE NLC CONTENENTI GLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN	219
4.3.12	DETERMINAZIONE DELLE DIMENSIONI DELLE NANOPARTICELLE	220
4.3.13	MISURE DI POTENZIALE ZETA	220
4.3.14	ANALISI CROMATOGRAFICA DEGLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN	221
4.3.15	STABILITÀ DEGLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN IN PBS A PH 7.4 IN ASSENZA DI ESTERASI	222
4.3.16	STABILITÀ DEGLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN IN PBS A PH 7.4 IN PRESENZA DI ESTERASI	222
4.3.17	STABILITÀ DEGLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN IN PLASMA UMANO	223
4.3.18	PROFILI DI RILASCIO DEGLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN DALLE NLC IN PBS A PH 7.4 IN ASSENZA DI ESTERASI	223
4.3.19	PROFILO DI RILASCIO DEGLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN DALLE NLC IN PBS A PH 7.4 IN PRESENZA DI ESTERASI	224
4.3.20	PROFILI DI RILASCIO DEGLI ESTERI DEL FLURBIPROFEN DALLE NLC IN PLASMA UMANO	225
<b>4.4</b>	<b>TRATTAMENTO DELLE ALLERGIE</b>	<b>226</b>
4.4.1	MATERIALI	226
4.4.2	SINTESI E PURIFICAZIONE DI PAR J2	226

<i>4.4.3 SLN E NLC CARICATE CON PARJ2</i>	<i>227</i>
<i>4.4.4 MISURE DI DIMENSIONI E DI POTENZIALE ZETA</i>	<i>229</i>
<i>4.4.5 ANALISI CROMATOGRAFICA DI PARJ2</i>	<i>229</i>
<i>4.4.6 DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ DI PAR J 2 INCORPORATA NELLE NANOPARTICELLE</i>	<i>230</i>
<i>4.4.7 SAGGIO BIOLOGICO DI ESPRESSIONE DI CD203C</i>	<i>230</i>
<i>4.4.8 SAGGIO BIOLOGICO PER LA VALUAZIONE DEI PIROGENI</i>	<i>231</i>
<i>4.4.9 STABILITÀ DELLE SLN CREATE IN CONDIZIONI DI STERILITÀ</i>	<i>231</i>
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>233</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>236</b>