



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in “Scienze Molecolari e Biomolecolari”  
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)  
CHIM/09

## *Ocular Drug Delivery Systems* per la veicolazione di molecole bioattive al segmento posteriore dell'occhio

IL DOTTORE  
**Giulia Di Prima**

IL COORDINATORE  
**Patrizia Diana**

IL TUTOR  
**Gaetano Giammona**

CICLO XXX  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2018

# Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	5
<b>1.1 Struttura Anatomica Dell'occhio</b> .....	5
<b>1.2 Vie Di Somministrazioni Nella Terapia Oftalmica</b> .....	18
<b>1.3 Forme Di Dosaggio Oftalmiche Convenzionali Vs Ocular Drug Delivery Systems Innovativi</b> .....	25
<b>1.4 Micelle Polimeriche</b> .....	35
<b>1.5 Inseri Oftalmici</b> .....	41
<b>1.5.1 L'elettrospinning</b> .....	44
<b>1.5.2 Funzionalizzazione Superficiale Plasma-Assistita</b> .....	48
<b>1.6 Principali Patologie Degenerative Retiniche E Loro Trattamento</b> .....	54
<b>1.6.1 Farmaci Anti-VEGF</b> .....	63
<b>1.6.2 Corticosteroidi</b> .....	68
<b>1.6.3 Altre Strategie Terapeutiche</b> .....	71
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	74
<b>3. PARTE SPERIMENTALE</b> .....	77
<b>3.1 Materiali E Strumenti</b> .....	77
<b>3.1.1 Materiali</b> .....	77
<b>3.1.2 Strumenti</b> .....	78
<b>3.2 Metodi</b> .....	80
<b>3.2.1 Micelle Polimeriche A Base Di Inulina Per La Somministrazione Oculare Topica Di Corticosteroidi</b> .....	80
<b>3.2.1.1 Sintesi Polimerica e Caratterizzazione Spettroscopica</b> .....	80
<b>3.2.1.2 Valutazione della Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC)</b> .....	85
<b>3.2.1.3 Preparazione delle Micelle Polimeriche vuote e cariche di Corticosteroidi</b> .....	85
<b>3.2.1.4 Preparazione delle Micelle Polimeriche Fluorescenti</b> .....	86
<b>3.2.1.5 Studi di Dynamic Light Scattering (DLS) e Potenziale Zeta</b> .....	86

3.2.1.6 Studi di Mucoadesione .....	87
3.2.1.7 Valutazione della Drug Loading % .....	88
3.2.1.8 Studi di Rilascio <i>in vitro</i> .....	89
3.2.1.9 Studi di Stabilità .....	90
3.2.1.10 Saggio di Vitalità Cellulare <i>in vitro</i> .....	90
3.2.1.11 Studi di Uptake qualitativo <i>in vitro</i> .....	91
3.2.1.12 Studi di Permeazione Transcorneale <i>in vitro</i> .....	92
3.2.1.13 Studi di Permeazione Transcorneale <i>ex vivo</i> .....	93
3.2.1.14 Modelli matematici .....	98
<b>3.2.2 Micelle polimeriche di natura polisaccaridica Vs Micelle polimeriche di natura poliamminoacidica: variazione dell'effetto enhancer nei confronti dell'Imatinib</b> .....	100
3.2.2.1 Sintesi Polimerica e Caratterizzazione Spettroscopica .....	100
3.2.2.2 Valutazione della Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC) .....	106
3.2.2.3 Preparazione delle Micelle Polimeriche vuote e cariche di Imatinib .....	106
3.2.2.4 Preparazione delle Micelle Polimeriche Fluorescenti .....	107
3.2.2.5 Studi di Dynamic Light Scattering (DLS) e Z-potential .....	107
3.2.2.6 Studi di Mucoadesione .....	107
3.2.2.7 Valutazione della Drug Loading % .....	108
3.2.2.8 Studi di Rilascio <i>in vitro</i> .....	108
3.2.2.9 Saggio di Vitalità Cellulare <i>in vitro</i> .....	109
3.2.2.10 Studi di Uptake qualitativo <i>in vitro</i> .....	109
3.2.2.11 Studi di Permeazione Transcorneale <i>in vitro</i> .....	110
3.2.2.12 Studi di Permeazione Transcorneale <i>ex vivo</i> .....	111
<b>3.2.3 Micelle Polimeriche A Base Di Inulina: Valutazione Dell'Efficacia Di Differenti Penetration/Permeation Enhancers Legati Chimicamente E Non</b> .....	113
3.2.3.1 Sintesi dei derivati Polimerici .....	113
3.2.3.2 Valutazione della Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC) .....	118
3.2.3.3 Preparazione delle Micelle Polimeriche vuote e cariche di Desametasone e delle Micelle Polimeriche Fluorescenti .....	119
3.2.3.4 Studi di Dynamic Light Scattering (DLS) e Z-potential .....	119

3.2.3.5 Studi di Mucoadesione.....	119
3.2.3.6 Valutazione della Drug Loading % .....	120
3.2.3.7 Studi di Rilascio <i>in vitro</i> .....	120
3.2.3.8 Saggio di Vitalità Cellulare <i>in vitro</i> .....	120
3.2.3.9 Studi di Permeazione Transcorneale <i>ex vivo</i> .....	121
3.2.4 Funzionalizzazione Superficiale Plasma-Assistita di Scaffold Polimerici Come Inerti Oculari Mucoadesivi Per Il Rilascio Protratto Di Triamcinolone Acetonide .....	123
3.2.4.1 Preparazione degli Scaffold di PoliButileneSuccinato (PBS) mediante Elettrospinning .....	123
3.2.4.2 Trattamento al Plasma di N <sub>2</sub> .....	123
3.2.4.3 Saggio alla Ninidrina .....	124
3.2.4.4 Funzionalizzazione Chimica con JNU, PHEA ed EPA .....	126
3.2.4.5 Caratterizzazione Spettroscopica degli Scaffold .....	128
3.2.4.6 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e Analisi Elementare.....	128
3.2.4.7 Studi di Degradazione a pH fisiologico .....	129
3.2.4.8 Studi di Swelling .....	129
3.2.4.9 Studi di Mucoadesione.....	129
3.2.4.10 Preparazione di Scaffold carichi di Triamcinolone Acetonide .....	130
3.2.4.11 Valutazione del Contenuto di Farmaco (mg/cm <sup>2</sup> ) e della Drug Loading %.....	131
3.2.4.12 Studi di Rilascio <i>in vitro</i> .....	131
3.2.4.13 Studi di Permeazione Transcorneale <i>ex vivo</i> .....	132
3.2.4.14 Studi di Citocompatibilità e Attecchimento cellulare con HCEpiC.....	132
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	133
4.1 Micelle Polimeriche A Base Di Jnulina Per La Somministrazione Oculare Topica Di Corticosteroidi.....	133
4.2 Micelle polimeriche di natura polisaccaridica Vs Micelle polimeriche di natura poliamminoacidica: variazione dell'effetto enhancer nei confronti dell'Jmatinib .....	175
4.3 Micelle Polimeriche A Base Di Jnulina: Valutazione Dell'Efficacia Di Differenti Penetration/Permeation Enhancers Legati Chimicamente E Non .....	197



<b>4.4 Funzionalizzazione Superficiale Plasma-Assistita di Scaffold Polimerici Come Inerti Oculari Mucoadesivi Per Il Rilascio Protratto Di Triamcinolone Acetonide .....</b>	<b>215</b>
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>237</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>242</b>
<b>Finanziamenti.....</b>	<b>251</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>251</b>
<b>Elenco Pubblicazioni Scientifiche, Poster e Comunicazioni a Congressi .....</b>	<b>252</b>
<i>Pubblicazioni Scientifiche:.....</i>	<i>252</i>
<i>Poster:.....</i>	<i>252</i>
<i>Comunicazioni a Congressi: .....</i>	<i>253</i>



# 1. INTRODUZIONE

*“Più di tutte, gli uomini amano la sensazione della vista. In effetti, non solo ai fini dell’azione, ma anche senza avere alcuna intenzione di agire, noi preferiamo il vedere, in un certo senso, a tutte le altre sensazioni. Il motivo sta nel fatto che la vista ci fa conoscere più di tutte le altre sensazioni.”*

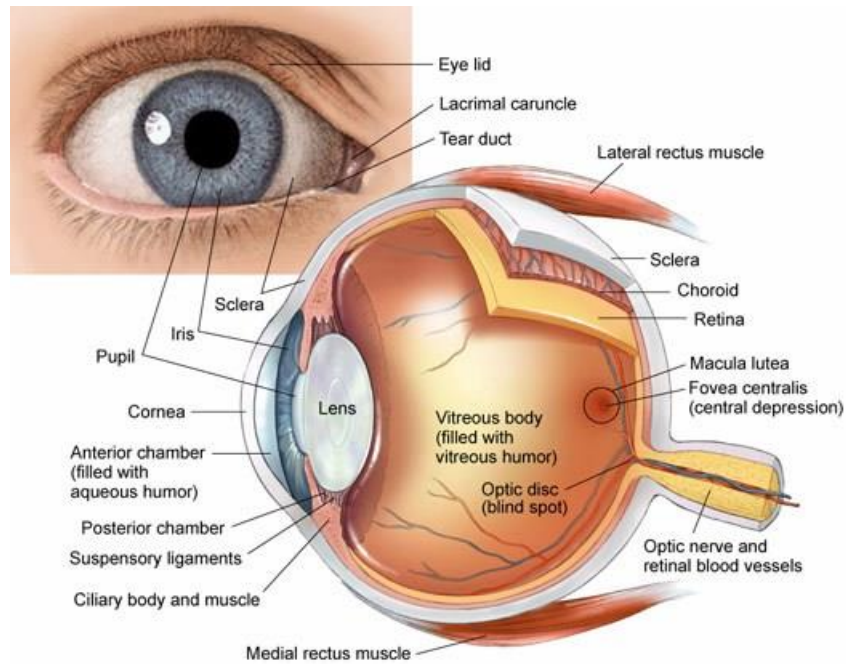
*- Aristotele.*

## **1.1 Struttura Anatomica Dell’Occhio**

Tra i 5 sensi, la vista è quello cui l’uomo fa da sempre più affidamento ed è per questo motivo che, a livello cerebrale, la corteccia visiva risulta essere molto più grande delle altre aree corticali deputate all’elaborazione delle informazioni riguardanti le altre sensibilità specifiche.

I recettori visivi si trovano all’interno di strutture altamente complesse, gli occhi, deputati non solo alla percezione della luce ma anche alla creazione di dettagliate immagini visive. Tali delicate ed importantissime strutture anatomiche si trovano localizzate all’interno di orbite ossee costituite dalle ossa frontale, sfenoide, mascellare, etmoide, lacrimale, zigomatico e palatino. Le cavità oculari ospitano i bulbi oculari, i vasi sanguigni e i nervi (ottico, oculomotore, trocleare, abducente, i rami delle branche oftalmica e mascellare del nervo trigemino e il ganglio ciliare del parasimpatico), nonché i muscoli estrinseci e l’apparato nasolacrimale.

Si tratteranno adesso nel dettaglio l'anatomia delle formazioni accessorie dell'occhio (palpebre, congiuntiva e apparato lacrimale) e del bulbo oculare (**Fig. 1**).



**Figura 1. L'occhio**

Le palpebre rappresentano una continuazione della cute e ricoprono la superficie anteriore dell'occhio. Grazie alla loro chiusura riflessa esse proteggono l'occhio dagli infortuni e lo riparano dalla luce eccessiva. Inoltre, l'ammicciamento periodico funziona come un tergicristallo mantenendo la superficie oculare costantemente lubrificata da un sottile film lacrimale e libera la polvere e da altre particelle. La fessura palpebrale separa le palpebre superiore ed inferiore che, però, durante l'ammicciamento si incontrano al livello delle estremità dei canthus mediale e laterale. Lungo il margine palpebrale vi sono le ciglia, peli corti, forti e ricurvi, disposti in file doppie o triple. Quelle superiori sono molto più lunghe e numerose e piegano verso l'alto, mentre quelle inferiori curvano verso il basso in modo che, quando le palpebre si chiudono, le ciglia superiori ed inferiori non rischiano di intrecciarsi. Lo spostamento delle ciglia durante il riflesso di ammicciamento contribuisce a impedire che particelle e corpi estranei possano giungere sulla superficie oculare. Le palpebre sono connesse con una serie di ghiandole: le grandi ghiandole sebacee di Zeis associate alle ciglia, molte ghiandole sudoripare accessorie che si aprono in superficie tra i follicoli della palpebra e le grandi ghiandole di Meibomio. Queste ultime,

chiamate anche ghiandole tarsali, sono localizzate lungo il margine interno della palpebra e secernono una sostanza ricca lipidi che impedisce alle due palpebre di sigillarsi l'una sull'altra. La superficie esterna visibile della palpebra è rivestita da un sottile strato di epitelio squamoso stratificato al di sotto del quale, a rinforzo della struttura palpebrale, si ritrovano delle ampie lamine connettivali chiamate nell'insieme piatto tarsale. Tra il piatto tarsale e la cute si trovano i muscoli orbicolare dell'occhio (deputato alla chiusura palpebrale) ed elevatore della palpebra superiore.

La congiuntiva è una mucosa sottile e trasparente rivestita da un epitelio squamoso stratificato specializzato che ricopre la superficie interna delle palpebre, ripiegandosi, poi, bruscamente su se stessa formando i fornici e continuando rivestendo la superficie esterna dell'occhio (sclera) fino al punto di congiunzione con la cornea ove l'epitelio stratificato viene sostituito da un epitelio squamoso sottilissimo, delicato e trasparente dello spessore di appena 5-7 cellule. La congiuntiva forma, quindi, un sacco che si apre anteriormente attraverso la fessura palpebrale. La congiuntiva fornisce la componente mucosa del film lacrimale precorneale assumendo, quindi, un ruolo centrale nella difesa della superficie oculare dalle infezioni. Sebbene non contenga recettori specializzati per il controllo della superficie oculare, le numerose terminazioni nervose libere presenti consentono una sensibilità ad ampio spettro.

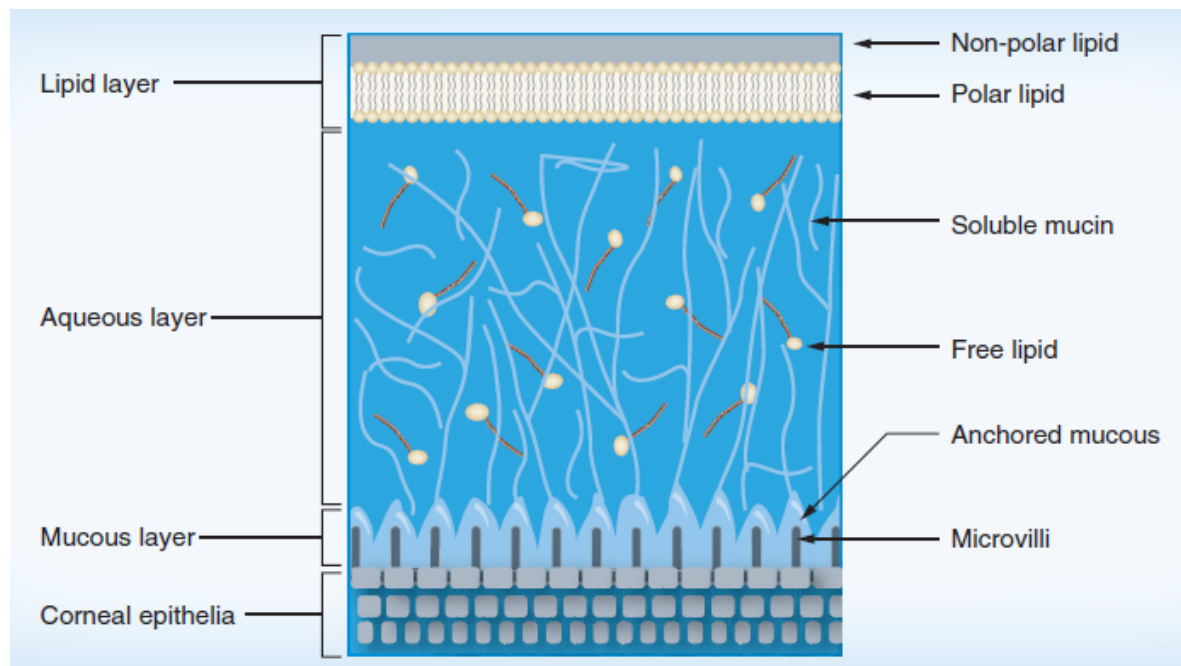
Un flusso costante di lacrime mantiene continuamente le superfici congiuntivali umettate e asettiche. Le lacrime riducono l'attrito, rimuovono i detriti, ostacolano le infezioni batteriche e forniscono nutrimento ed ossigeno all'epitelio congiuntivale. È l'apparato lacrimale che produce, distribuisce e rimuove il fluido lacrimale. L'apparato lacrimale è costituito, dunque, dalle strutture responsabili della produzione della lacrime (le ghiandole lacrimali principale ed accessorie), e dalla via di drenaggio lacrimale (canalicoli lacrimali accoppiati, sacco lacrimale e dotto naso-lacrimale) che raccoglie il fluido lacrimale e lo convoglia nella cavità nasale.

La ghiandola lacrimale è il principale produttore del fluido lacrimale: una secrezione acquosa e leggermente alcalina, con un contenuto elettrolitico simile a quello del plasma e contenente anche IgA e proteine tra cui lisozima e lattoferrina, con azione antibatterica. La ghiandola lacrimale produce circa 1 ml di lacrime al giorno che, una volta raggiunta la superficie oculare, si mescolano con le secrezioni oleose delle ghiandole accessorie precedentemente menzionate deputate alla cooperazione nella lubrificazione e al

rallentamento dell'evaporazione del fluido lacrimale dalla superficie oculare. Il volume lacrimale totale è di circa 7  $\mu\text{l}$  di cui 1-2  $\mu\text{l}$  costituiscono il film lacrimale precorneale. Tale strato più esterno è considerato una struttura tristratificata (**Fig. 2**) costituita da:

- ☉ rivestimento mucoso ancorato all'epitelio mediante microvilli (prodotto dalle cellule caliciformi congiuntivali),
- ☉ compartimento contenente una soluzione acquosa di mucina (prodotta dalle ghiandole lacrimali principale ed accessorie),
- ☉ lipidi liberi e un sottile strato lipidico superficiale (secreto dalle ghiandole di Meibomio).

(McCulley JP et al. 1997; Wilson CG et al. 2001; Bron AJ et al. 2004; Kaur IP et al. 2007; Wilson CG et al. 2007)



**Figura 2. Schematizzazione del film lacrimale**

Il film lacrimale svolge una serie di importanti funzioni:

- ☉ appiana le irregolarità corneali creando una superficie uniforme e con buone proprietà ottiche che si rigenera ad ogni riflesso di ammiccamento,
- ☉ costituisce la principale superficie refrattiva del sistema ottico dell'occhio grazie all'interfaccia aria-lacrime,

- ☉ garantisce l'ossigenazione corneale. Essendo la cornea una struttura non vascolarizzata, infatti, la sua unica fonte di ossigeno è costituita dalla riserva presente nel film lacrimale che, ad occhio aperto, è in equilibrio con l'ossigeno atmosferico,
- ☉ rimuove i prodotti di scarto e metabolismo in esso rilasciati grazie al suo continuo turnover,
- ☉ l'azione di lavaggio che opera sulla superficie oculare svolge un ruolo importante nella difesa dalla colonizzazione microbica, coadiuvata anche dalla presenza degli enzimi antibatterici precedentemente indicati.

Il riflesso intermittente di ammiccamento consente lo spargimento omogeneo delle lacrime sulla superficie oculare. Infine, le lacrime si accumulano in un'area detta lacuna lacrimale situata al livello del canthus mediale che costituisce il punto di drenaggio del liquido lacrimale. Da qui, infatti le lacrime giungono al canalicolo lacrimale attraverso i punti lacrimale superiore ed inferiore, raggiungono quindi il sacco lacrimale e, successivamente, il dotto nasolacrimale. (*Knop E et al. 2002; Leigh RJ et al. 2006; Standring S 2012*)

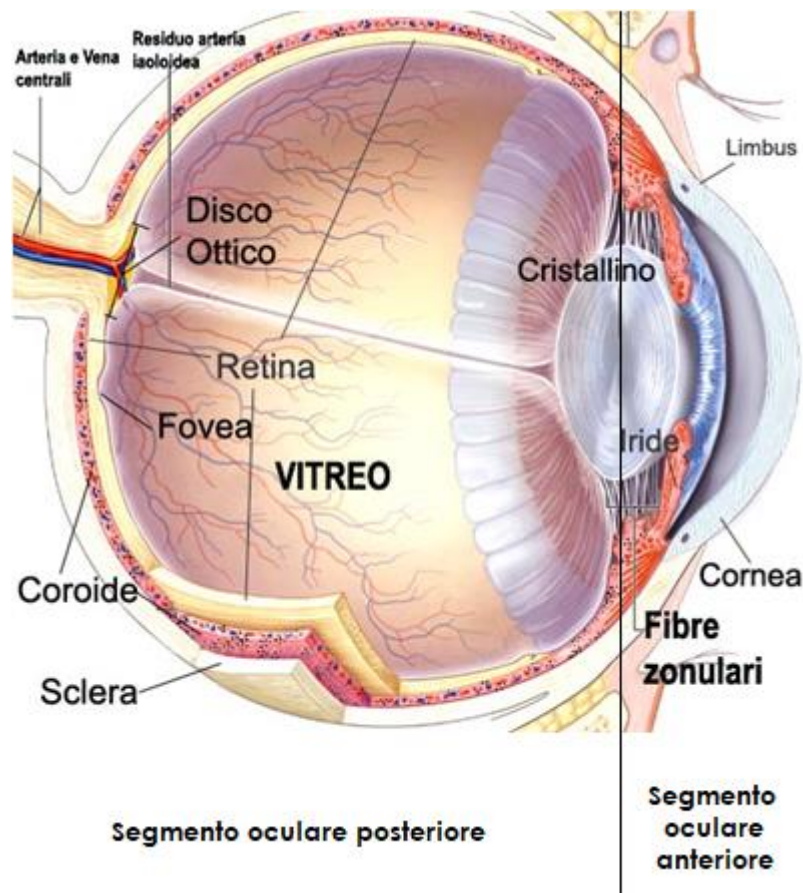
I bulbi oculari (**Fig. 3**) sono due formazioni sferoidali cave con un diametro medio di 24 mm e un peso di circa 8 g. All'interno di ciascun bulbo oculare, è possibile distinguere due cavità, separate dal cristallino: la cavità posteriore (contente l'umor vitreo o corpo vitreo) e la cavità anteriore (contenente l'umor acqueo). Quest'ultima è, a sua volta, divisibile in due camere, separate dall'iride: camera anteriore e camera posteriore. Lo scopo esclusivo degli occhi e delle strutture ad essi associate è quello di formare una valida immagine su una retina funzionale. I fotorecettori visivi sono in grado di trasdurre le radiazioni luminose in impulsi neurobiologici che porteranno all'elaborazione dell'immagine. Questo processo ha inizio a livello retinico, ma continua a livello corticale dopo che il segnale retinico viaggia lungo il nervo ottico e la via visiva. Tale percorso porterà alla percezione visiva.

La parete dell'occhio è formata da tre tonache distinte che, procedendo dall'esterno verso l'interno, sono: tonaca fibrosa, tonaca vascolare e tonaca nervosa.

La tonaca fibrosa è una capsula protettiva semielastica mantenuta turgida grazie alla pressione endoculare che offre supporto meccanico garantendo il mantenimento della geometria ottica e la forma dell'occhio anche durante il movimento dello stesso. Serve, inoltre, da attacco per i muscoli estrinseci dell'occhio e contiene le formazioni necessarie

al processo di messa a fuoco delle immagini. È costituita posteriormente dalla sclera (opaca) ed anteriormente dalla cornea (trasparente).

La sclera (il cosiddetto bianco dell'occhio) costituisce circa il 93% della tonaca fibrosa. È costituita da tessuto connettivo fibroso denso contenente fibre collagene ed elastiche. La sua superficie esterna è ricoperta da una delicata lamina episclerale di tessuto fibrovascolare lasso che presenta rari vasi sanguigni. La superficie interna è a stretto contatto con la coroide ed aderisce ad essa attraverso la lamina sopracorioidea, un esile strato fibroso che accoglie numerosi fibroblasti e melanociti. La porzione anteriore della sclera è rivestita dalla congiuntiva, mentre la porzione posteriore è perforata dal nervo ottico.



**Figura 3. Struttura anatomica dell'occhio**

Anteriormente, la sclera si continua con la cornea al livello della giunzione sclerocorneale o limbo.

A livello limbale l'epitelio corneale e quello congiuntivale di fondono formando uno strato più spesso. Il limbo è costituito principalmente da cellule staminali che, a seguito di

migrazione centripeta, garantiscono il rinnovo cellulare corneale (la cornea è infatti priva di cellule staminali). Le cellule staminali limbari si differenziano, infatti, migrando verso i margini corneali, fino a raggiungere il centro della cornea nell'arco completo della loro vita.

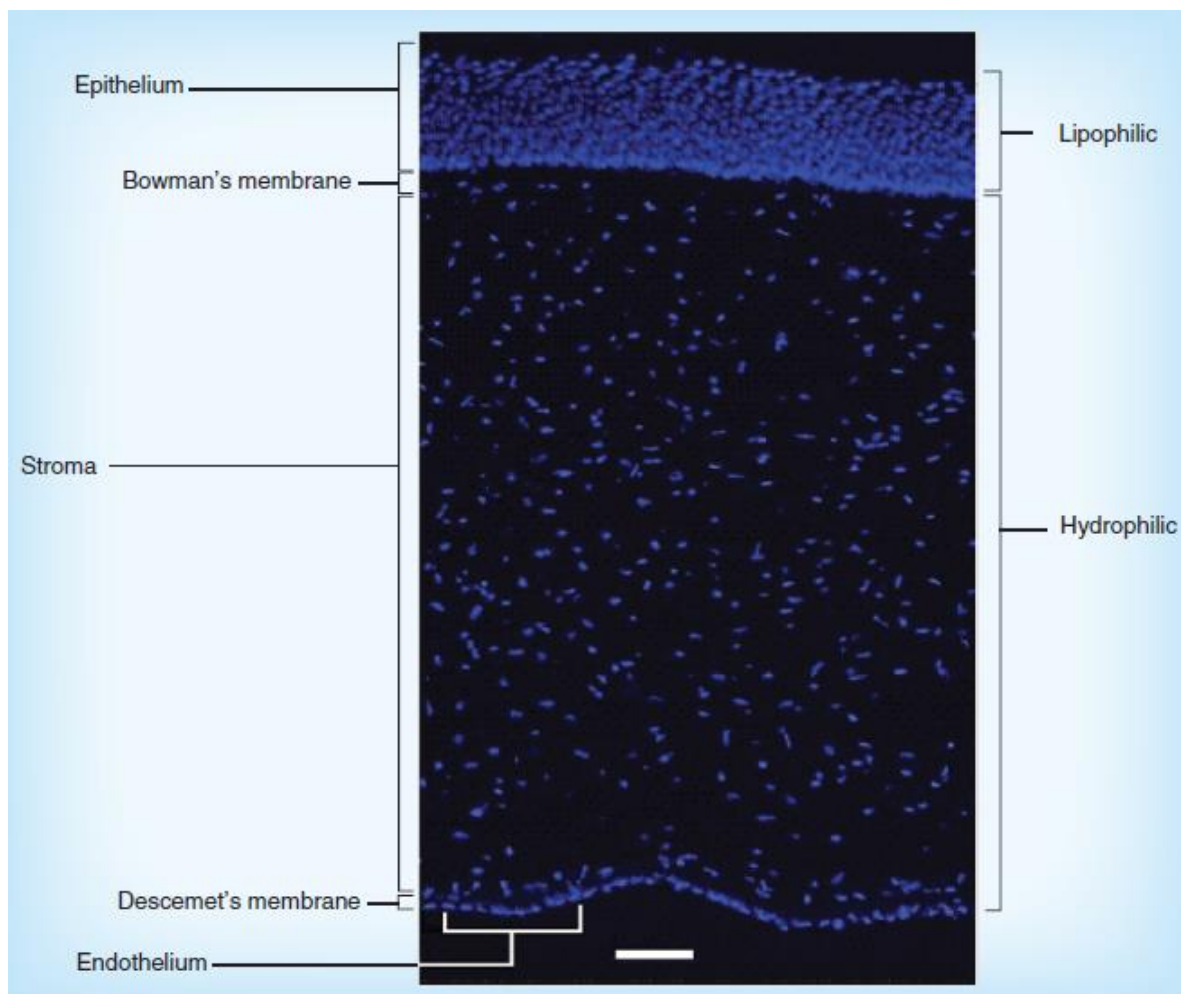
La cornea (**Fig. 4**) è una struttura anfifilica, non vascolarizzata e trasparente dotata di una propria curvatura e che, infatti, sporge dalla sclera. Il suo spessore è massimo ai margini (circa 670  $\mu\text{m}$ ) e minimo al centro (circa 520  $\mu\text{m}$ ). A livello microscopico, la cornea è composta da 5 strati ben distinti che, procedendo dall'esterno verso l'interno sono:

- ☉ Epitelio. Costituisce circa il 10% della cornea (circa 50  $\mu\text{m}$ ) e consta generalmente di 5-6 strati cellulari. Protegge la superficie oculare dall'abrasione meccanica formando una barriera altamente selettiva che impedisce l'ingresso di molecole e patogeni all'interno dell'occhio. È il primo strato lipofilo della cornea ed offre pertanto una resistenza ai farmaci idrofili di circa il 90% e del 10% circa per le preparazioni idrofobe. La superficie esterna è liscia ed otticamente perfetta, costituita da cellule sempre più piatte serrate tra di loro grazie alla presenza di tight junction, cui si deve la funzione barriera di questo strato.
- ☉ Membrana di Bowman. È costituita da un denso agglomerato di fibre collagene. Ha uno spessore di circa 12  $\mu\text{m}$  e non presenta fibroblasti.
- ☉ Stroma. Costituisce la componente idrofila della cornea. Ha uno spessore di circa 500  $\mu\text{m}$  (circa il 90% dell'intera struttura corneale) ed è uno strato compatto e trasparente formato da lamelle sequenziali costituite da fibrille sottili e parallele di collagene all'interno delle quali troviamo una rete a trama larga di fibroblasti. È costituito all'80% da acqua, ma contiene anche proteine e mucopolisaccaridi.
- ☉ Membrana di Descemet. È una membrana rigida, sottile ed apparentemente omogenea di spessore circa 6  $\mu\text{m}$ , che funge da supporto per l'endotelio.
- ☉ Endotelio. È costituito da cellule squamose esagonali monostratificate connesse tra di loro tramite tight junction e gap junction. Tali cellule posseggono un potere mitotico limitato pertanto a seguito di traumi, patologie, uso prolungato di lenti a contatto e/o senescenza il mosaico endoteliale diviene sempre meno



regolare con maggiore variabilità nelle dimensioni e nelle forme cellulari in quanto le cellule che lo compongono si distendono per riempire gli spazi vuoti. È uno strato lipofilo ad elevata attività metabolica deputato principalmente al controllo ed alla regolazione dell'idratazione stromale. Il corretto livello di idratazione corneale è, infatti, importante affinché l'intera struttura rimanga chiara e trasparente.

(Jarvinen T et al. 1996; Washington N et al. 2001; Wilson GC et al. 2001).



**Figura 4. Struttura della cornea**

La tonaca vascolare (uvea) è costituita da corioide, corpo ciliare e iride. Svolge una serie di importanti funzioni quali: via di accesso per i vasi che irrorano l'occhio, regolazione della quantità di luce in entrata, secrezione e riassorbimento dell'umor acqueo e controllo della forma del cristallino, essenziale per il processo di accomodazione.

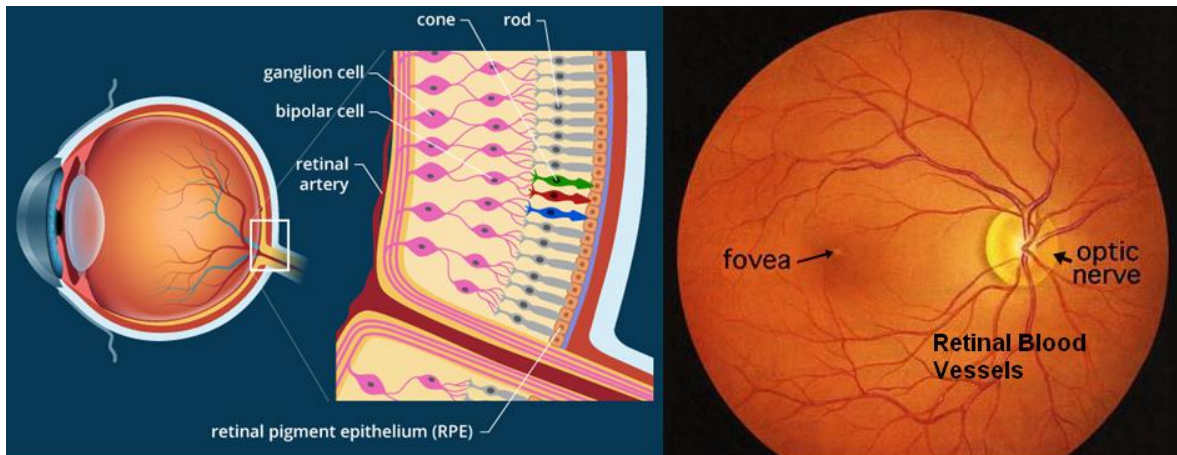
La coroide è un sottile strato pigmentato altamente vascolarizzato che riveste posteriormente circa i 5/6 dell'occhio. Esternamente la coroide è lassamente connessa alla sclera attraverso la lamina supracorioidea (o lamina fusca), ad eccezione del punto in cui viene perforata dal nervo ottico ove si ritrova strettamente a contatto con la tonaca fibrosa. Internamente, invece, aderisce all'epitelio pigmentato retinico mediante la membrana di Brunch (lamina vitrea). La principale funzione della coroide consiste nell'apportare nutrimento ed ossigeno alle porzioni retiniche più esterne.

Il corpo ciliare ha origine in corrispondenza del limbo, aderisce anteriormente alla parte periferica dell'iride e si estende posteriormente fino all'ora serrata. È costituito principalmente da un anello muscolare (muscolo ciliare) che si proietta verso l'interno dell'occhio, ed è rivestito da un epitelio che forma una serie di pieghe definite processi ciliari su cui sono inseriti i legamenti sospensori, o fibre zonulari, del cristallino. Si tratta di fibre connettivali atte a mantenere il cristallino posizionato posteriormente all'iride e centrato rispetto alla pupilla in modo che qualsiasi fascio di luce che attraversi la pupilla diretto ai fotorecettori retinici attraversi, prima, il cristallino. Riassumendo, quindi, il corpo ciliare ha la funzione di mantenere nella giusta posizione il cristallino nonché di modificarne il potere di rifrazione (accomodazione) mediante la contrazione del suo muscolo liscio. Inoltre, la porzione anteriore della faccia interna del corpo ciliare è deputata alla produzione dell'umor acqueo mentre la porzione posteriore della stessa secerne diversi componenti del corpo vitreo, al quale è adiacente.

L'iride è un diaframma regolabile intorno ad un foro centrale detto pupilla. È situato tra la cornea ed il cristallino, completamente immerso nell'umor acqueo e divide la cavità oculare anteriore in due camere: la camera anteriore circoscritta dalla cornea e dall'iride, e la camera posteriore delimitata da iride e cristallino e posizionata anteriormente al corpo vitreo e, quindi, al segmento oculare posteriore. L'iride contiene vasi sanguigni, cellule pigmentate e due strati di muscolatura liscia che costituiscono la muscolatura intrinseca dell'occhio, deputata alla regolazione del diametro pupillare. I muscoli sfinteri della pupilla sono disposti in maniera concentrica attorno alla pupilla stessa e ne determinano la chiusura (miosi, regolata dal sistema nervoso autonomo parasimpatico), mentre i muscoli dilatatori della pupilla sono disposti radialmente e, contraendosi, aumentano il diametro pupillare (midriasi, regolata dal sistema nervoso autonomo ortosimpatico). Il corpo dell'iride è costituito da tessuto connettivo superficialmente rivestito da un doppio strato di

epitelio contenente cellule pigmentate. La densità e la distribuzione di queste ultime determinano il colore degli occhi.

La tonaca nervosa o retina (**Fig. 5**) è costituita da due strati distinti: uno strato più esterno detto strato pigmentato ed uno più interno detto strato nervoso o retina propriamente detta contenente i fotorecettori e i neuroni associati. Tali strati sono tra di loro molto ravvicinati anche se non direttamente interconnessi. Lo strato pigmentato rappresenta una continuazione di iride e corpo ciliare mentre la retina continua fino all'ora serrata segnando dunque il confine tra le porzioni posteriore e laterale del segmento oculare posteriore. La retina è costituita prevalentemente da tre tipologie cellulari: le cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) e i fotorecettori, distinti in coni e bastoncelli. L'RPE svolge un ruolo cruciale nel ricambio delle componenti fotorecettoriali dei coni e dei bastoncelli. È inoltre deputato all'assorbimento delle radiazioni luminose 'in eccesso' (quelle, cioè, che non vengono catturate dai fotorecettori) impedendo che la luce dispersa peggiori la qualità delle immagini visive. I coni e i bastoncelli sono deputati alla creazione dell'immagine visiva. Sono strutture lunghe, orientate radialmente ma differenti nei dettagli. I bastoncelli funzionano a livelli di luce bassi (scotopica). Non permettono la discriminazione dei colori, tuttavia la loro alta sensibilità alla luce ci permette di vedere anche in luoghi poco illuminati. I coni, al contrario, lavorano in condizione di luce più intensa (fotopica). Sono estremamente differenziati (ne esistono tre tipi) e la loro stimolazione in varie combinazioni permette la discriminazione dei colori. La distribuzione dei fotorecettori non è uniforme a livello retinico. I bastoncelli, infatti, formano un'ampia banda nella zona più periferica mentre i coni si concentrano nel polo posteriore fino a culminare in una regione detta macula lutea, completamente priva di bastoncelli, ove giunge l'immagine dopo aver attraversato la cornea ed il cristallino. La più alta concentrazione di coni si registra nella fovea, la porzione centrale della macula lutea e sede della visione discriminata (visione fine). I coni ed i bastoncelli fanno sinapsi con le cellule bipolari la cui attività è regolata dai neurotrasmettitori rilasciati dai fotorecettori attivati. Sono le cellule orizzontali a regolare la comunicazione tra fotorecettori e cellule bipolari, in senso eccitatorio od inibitorio. In seguito, le cellule bipolari fanno a loro volta sinapsi con le cellule gangliari, le uniche cellule oculari a generare potenziali d'azione rivolti all'encefalo. La modulazione della comunicazione tra cellule bipolari e gangliari avviene ad opera delle cellule amacrine. Gli assoni delle cellule gangliari convergono al disco ottico.



**Figura 5. La retina**

Come detto, l'occhio può essere suddiviso in due cavità, anteriore e posteriore, separate dal cristallino e piene rispettivamente dell'umor acqueo e del corpo vitreo.

L'umore acqueo deriva dal plasma presente nei capillari fenestrati dei processi ciliari. La sua principale componente è l'acqua ed è molto rassomigliante al plasma stesso sebbene i due differiscano in alcuni casi in termini di concentrazione elettrolitica e di alcuni soluti organici. L'umor acqueo viene secreto attivamente a livello ciliare, attraversa l'equatore del cristallino e fluisce attraverso la pupilla nella camera anteriore dove circola grazie a correnti convettive dovute alle differenze di temperatura tra iride e cornea. La maggior parte dell'umore acqueo viene drenata dal sistema trabecolare del canale di Schlemm (o seno venoso della sclera), tuttavia, una piccola quantità fuoriesce dal muscolo ciliare (via sclerouveale). L'umore acqueo, insieme alla cornea, al cristallino ed al corpo vitreo, costituisce parte dei mezzi diottrici dell'occhio. In aggiunta, esso fornisce nutrimento a cornea e cristallino (entrambe strutture non vascolarizzate), ne rimuove i prodotti di scarto metabolico e produce la pressione endoculare grazie alla quale viene preservata la forma dell'occhio. Ne consegue però che, qualsiasi anomalia od interferenza nel drenaggio dell'umor acqueo comporti un aumento della pressione endoculare con conseguente glaucoma.

Il cristallino è un corpo trasparente, capsulato e bioconvesso immerso nell'umore acqueo atto alla regolazione della messa a fuoco oculare. Forma, anteriormente, un anello di contatto con il margine posteriore dell'iride. È circondato dai processi ciliari cui è ancorato a mezzo delle fibre zonulari, atte alla sua distensione. Alla nascita il cristallino è

incolore e lascia pertanto passare tutte le lunghezze d'onda. Tuttavia, nel corso della vita, esso va assumendo una sfumatura sempre più ambrata con conseguente assorbimento delle radiazioni ad onde corte che si traduce, negli anziani, in una minore sensibilità al colore blu. Stati patologici come la cataratta comportano una progressiva opacizzazione del cristallino. Il cristallino è costituito da tre strati circondati dalla capsula del cristallino. Sulla faccia anteriore troviamo cellule epiteliali, ma per la maggior parte esso è composto da cellule allungate note come fibre del cristallino. Il cristallino è una struttura non vascolarizzata e priva di fibre nervose. È un sistema immunologicamente isolato in quanto la sua superficie forma una barriera molto efficace nei confronti dell'invasione di cellule o fattori del sistema immunitario. Inoltre, è l'unica struttura del corpo umano che conserva in se tutte le cellule che le si vanno formando nel corso della vita.

Il corpo vitreo occupa circa 4/5 del bulbo oculare. Sulla sua faccia anteriore è scavata una profonda concavità della fossa jaloidea che si adatta alla forma del cristallino. L'umore vitreo è costituito al 99% d'acqua ed è pertanto incolore sebbene non sia completamente privo di struttura. Il suo perimetro ha, infatti, una consistenza simil-gelatinosa che si fa via via sempre più liquida avvicinandosi al centro. Il corpo vitreo contiene acido ialuronico, fibrille collagene di tipo II ed anche alcune cellule sparse, gli ialociti, con caratteristiche simili ai fagociti mononucleati e atte alla produzione di acido ialuronico. Alla nascita il corpo vitreo è assente. Compare intorno al 4-5° anno di età ed aumenta in volume fino circa ai 70 anni. Il corpo vitreo ha lo scopo di stabilizzare la forma dell'occhio nonché di fungere da supporto anteriormente per il cristallino e posteriormente per la retina. In quest'ultimo caso esso agisce "premendo" lo strato nervoso contro lo strato pigmentato ed è per questo che, se il vitreo si retrae, come si verifica nell'anziano, possono verificarsi trazioni e danni retinici con conseguente fori maculari o rotture periferiche che possono condurre a distacco retinico (Carbone E et al. 2008; Martini FH et al. 2008; Standring S 2012).

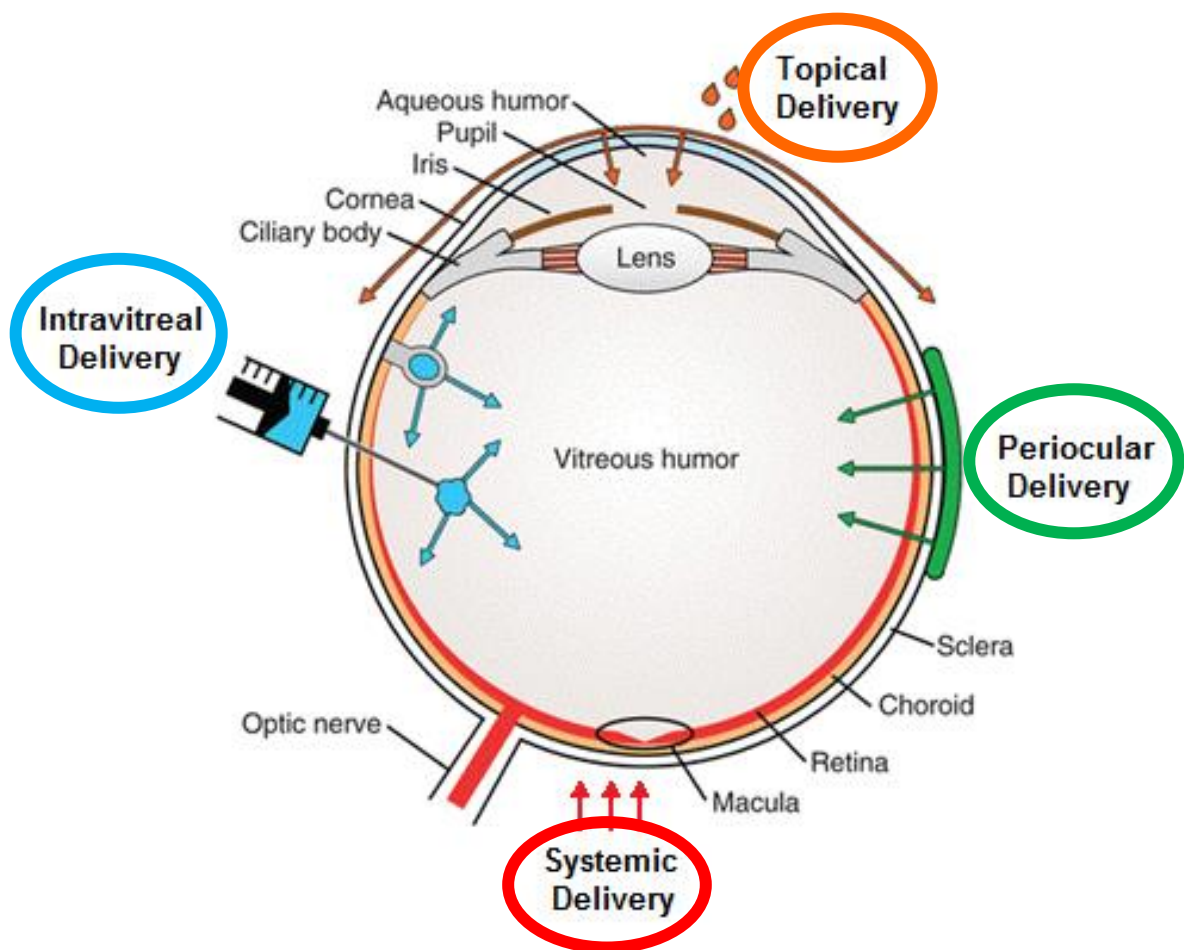
Le cosiddette *Blood-Ocular Barrier* (BOB) sono costituite dalla *Blood-Aqueous Barrier* (BAB) e dalla *Blood-Retinal Barrier* che costituiscono le principali barriere a protezione del segmento oculare anteriore e posteriore rispettivamente. Costituiscono il principale ostacolo che limita il raggiungimento retinico del farmaco a seguito di somministrazioni sistemiche o perioculari. La BAB è costituita da due strati cellulari posizionati nel segmento oculare anteriore: l'endotelio dei capillari di iride e corpo ciliare e l'epitelio non

pigmentato del corpo ciliare. Entrambi gli strati cellulari esprimono complesse tight junction e prevengono l'ingresso di soluti nelle regioni interne dell'occhio, come l'umore acqueo. Tuttavia la BAB non è considerata una barriera completa a causa delle fenestrature presenti nei capillari dei processi ciliari che, di conseguenza, possono risultare altamente permeabili a piccole molecole. Tuttavia, le piccole molecole presenti nell'umor acqueo possono facilmente essere eliminate dal segmento oculare anteriore entrando nel circolo ematico dell'iride. La BRB è generalmente suddivisa in due porzioni, BRB interna ed esterna, costituite da tipologie cellulari differenti. Le cellule endoteliali dei capillari retinici formano la BRB interna mentre e le RPE costituiscono la BRB esterna. Entrambi i layer cellulari costituenti la BRB sono tenuti coesi dalla presenza di tight junction che limitano fortemente il passaggio intercellulare di varie molecole. Anatomicamente la BRB interna è molto rassomigliante alla *Blood-Brain Barrier* (BBB), ma presenta una maggiore densità di tight junction e periciti. (Gaudana R et al. 2010; Ravi DV et al. 2014)

Come visto, l'anatomia dell'occhio è molto complessa ed articolata e lo sono anche tutti i suoi meccanismi protettivi e le barriere, sia statiche che dinamiche, che esso erge a difesa dalle incursioni esterne. Di conseguenza, sebbene esso sembri un organo fortemente in contatto con il mondo esterno, in realtà potrebbe essere considerato come un organo isolato. Questo rende oltremodo difficoltosa la somministrazione di farmaci che devono agire selettivamente a livello oftalmico.

## 1.2 Vie Di Somministrazioni Nella Terapia Oftalmica

La somministrazione di farmaci a livello oculare è sempre stata, ed è tutt'oggi, una sfida per i tecnologi farmaceutici a causa dell'elevata selettività ed efficacia di tutte le barriere innate presenti a protezione dell'occhio. Per somministrare principi attivi che devono agire in maniera specifica a livello oculare abbiamo a disposizione differenti vie di somministrazione: sistemica, periculare, intravitreale e topica (**Fig. 6**). Ogni via è caratterizzata da vantaggi e svantaggi e necessita della capacità del farmaco, innata o acquisita grazie al sistema carrier, di superare una o più barriere specifiche.



**Figura 6. Vie di somministrazione nella terapia oftalmica**

La via sistemica si attua a seguito di somministrazione orale o parenterale. Perché questa via di somministrazione risulti efficace, tuttavia, la concentrazione plasmatica di

farmaco deve essere relativamente alta, al fine di consentire il raggiungimento di concentrazioni terapeutiche efficaci a livello oftalmico. La bassa biodisponibilità oftalmica richiede dunque frequenti somministrazioni ed alti dosaggi che possono facilmente tradursi in fenomeni di accumulo in altri siti corporei e conseguente tossicità sistemica. Inoltre, mantenere la concentrazione plasmatica di farmaco costantemente alta non è sinonimo di successo terapeutico a causa della BRB che risulta selettivamente permeabile solo a molecole lipofile od in grado di attraversarla mediante meccanismi di trasporto attivo. Infatti, i farmaci somministrati per via sistemica, in realtà, possono facilmente entrare nel bulbo oculare sfruttando l'elevata vascolarizzazione della coroide. I coriocupillari sono fenestrati e consentono la creazione di un rapido equilibrio tra la concentrazione di farmaco presente nel torrente ematico e quella osservata al livello dello spazio extravascolare della coroide. Tuttavia la BRB esterna, costituita dall'RPE, limita fortemente l'ingresso dei farmaci, specialmente se di natura idrofila, dalla coroide alla retina. È proprio per questo motivo che alcune classi di farmaci come ad esempio gli amminoglicosidi ed i beta-lattamici, farmaci idrofili impiegati per il trattamento delle endoftalmiti, non sono in grado di raggiungere concentrazioni terapeuticamente efficaci al livello del corpo vitreo se somministrati per via sistemica. Alla luce di quanto detto, questa via di somministrazione resta marginale nel panorama delle possibili strategie per la terapia oftalmica. Nonostante tutto, l'esclusiva anatomia oftalmica potrebbe un giorno consentire lo sviluppo di nuovi carrier in grado di accumularsi selettivamente a livello oftalmico sfruttando un effetto simil-EPR (*Washington N et al. 2001; Hughes PM et al. 2005; Gaudana R et al. 2010; Boddu SHS et al., 2013*).

Le vie iniettive oftalmiche comprendono la somministrazione perioculare o intravitreale.

La somministrazione perioculare include iniezioni subcongiuntivali, subtenon, retrobulbari e peribulbari. Si tratta di una tipologia di somministrazione invasiva che comporta una bassa compliance del paziente. È comunque generalmente più accettata della via intravitreale poiché comporta un minore rischio di complicanze, anche se risulta meno efficace. In particolare, nella pratica clinica oftalmica, sono molto impiegate le iniezioni subcongiuntivali, subtenon e peroculari mentre si ricorre meno frequentemente alle iniezioni retrobulbari in quanto esse sono associate a possibili complicanze cerebrali. La somministrazione perioculare è particolarmente indicata per il *delivery* di farmaci



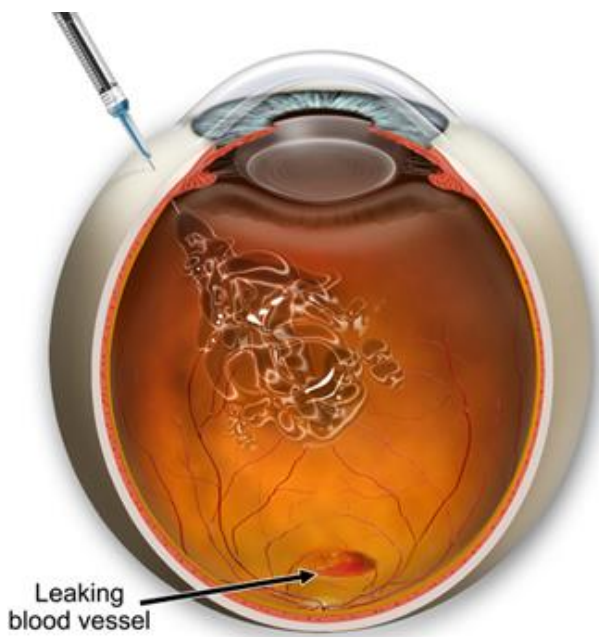
scarsamente idrosolubili, come i corticosteroidi, e offre una serie di vantaggi quali la possibilità di bypassare alcune importanti barriere oftalmiche come il film lacrimale, la cornea e la congiuntiva, nonché la possibilità di dar luogo ad un effetto depot che, in relazione alla profondità dell'iniezione, può comportare un efficace *delivery* al segmento oculare posteriore. Le barriere che possono opporsi all'assorbimento dei farmaci somministrati per questa via sono la vascolarizzazione episclerale, la sclera, la vascolarizzazione coroideale e la BRB. Dopo somministrazione il farmaco può raggiungere le regioni più interne dell'occhio attraverso tre differenti vie:

- ☉ Via transclerale. Consente di bypassare sia la cornea che la congiuntiva. Nonostante ciò è comunque caratterizzata da barriere statiche, dinamiche (es. circolazione sanguigna e linfatica) e metaboliche che si oppongono ad *delivery* al segmento posteriore.
- ☉ Via Ematica, comporta il passaggio attraverso la coroide ed è sfavorita dalla BRB.
- ☉ Attraversamento della camera anteriore, comporta il passaggio attraverso l'umore acqueo e l'umore vitreo.

Tutte e tre le vie considerate possono in qualche modo e con differente entità comportare anche l'eliminazione del farmaco. Un importante fattore che limita l'efficacia delle somministrazioni perioculari è l'elevata vascolarizzazione dei tessuti implicati in questa tipologia di somministrazione. Infatti, a differenza della cornea, i tessuti episclerali e subtenon posseggono un ricco e complesso network vascolare che risulta determinante nella perdita sistemica del farmaco. Inoltre, le molecole in grado di sfuggire a questo tipo di clearance vascolare, vengono in seguito in contatto con la sclera e, immediatamente dopo con la coroide, anch'essa altamente vascolarizzata e caratterizzata da un elevato flusso ematico, responsabile di ingenti perdite di ulteriori quote di farmaco. Di conseguenza sarà proprio l'eliminazione del farmaco dallo spazio subcongiuntivale il principale fattore determinante l'effettiva concentrazione di principio attivo in grado di raggiungere il vitreo. Una metodica emergente e meno invasiva per la somministrazione perioculare sfrutta i cosiddetti microneedle e può garantire un efficiente trattamento per le patologie degenerative retiniche. Questa strategia riduce ulteriormente il rischio delle complicazioni associate alla via iniettiva consentendo nel contempo di superare la BRB e ottenere concentrazioni terapeutiche a livello di retina e coroide. Sfrutta dei microaghi

(microneedle) appositamente sviluppati in modo da penetrare solo di alcuni micron nella sclera in modo da non danneggiare i tessuti oculari più in profondità, ma consentire la deposizione del farmaco o del sistema carrier nella sclera o nello spazio supracoroideale. (Gaudana R et al. 2010; Patel A et al. 2013; Awwad S et al. 2017)

Generalmente per raggiungere efficacemente elevate concentrazioni di farmaco nel segmento oculare posteriore si ricorre alle iniezioni intravitreali (**Fig. 7**). Si tratta di una tecnica invasiva che prevede la somministrazione di soluzioni o sospensioni di farmaco e



**Figura 7. Somministrazione intravitreale**

che consente la maggiore biodisponibilità in situ. Inoltre, per la somministrazione di grandi molecole, come le proteine, è l'unica strategia attualmente impiegata in clinica. Il principale vantaggio apportato da questa tecnica è rappresentato dalla possibilità di ottenere concentrazioni terapeutiche elevate nonché riproducibili in situ. Tuttavia le iniezioni intravitreali comportano bassa compliance del paziente poiché si tratta di procedure invasive e dolorose che alla stregua di veri e propri interventi chirurgici richiedono

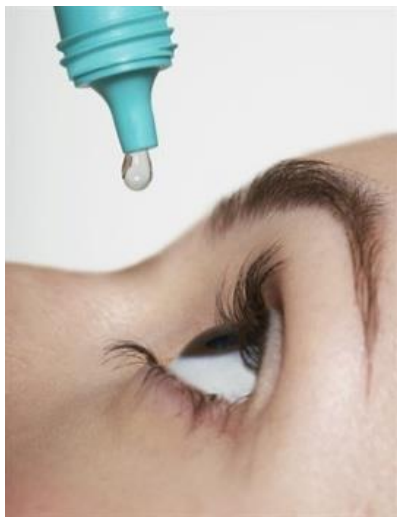
l'ospedalizzazione. Inoltre, generalmente si ricorre a questa via di somministrazione per il trattamento di patologie dal carattere degenerativo cronico e per consentire un effetto terapeutico protratto sono necessarie iniezioni ripetute con cadenza generalmente mensile. Questo comporta un piccolo ma rilevante rischio di serie complicazioni quali endoftalmiti, cataratta traumatica, infezioni oftalmiche, emorragie intraoculari, distacco retinico e cecità. Va inoltre considerato che a seguito di somministrazione intravitreale la distribuzione del farmaco al livello del corpo vitreo non è purtroppo uniforme. In genere, solo molecole di piccole dimensioni possono distribuirvisi mentre per molecole grandi questo processo è limitato. La distribuzione del farmaco nel vitreo è influenzata dalle condizioni fisiopatologiche, dal peso molecolare e dalla carica superficiale. L'acido ialuronico e i glicosamminoglicani carichi negativamente presenti nell'umore vitreo agiscono infatti da

barriera interagendo con molecole o nanosistemi carichi positivamente. Il tempo di emivita nel vitreo è uno dei principali fattori determinanti l'efficacia terapeutica. Generalmente, farmaci con PM inferiore a 500 Da tendono ad essere eliminati piuttosto rapidamente mostrando un tempo di emivita massimo di 3 giorni. Dopo somministrazione i farmaci possono essere eliminati attraverso la via del segmento anteriore o del segmento posteriore. La via anteriore di eliminazione comporta la diffusione dal vitreo all'umore acqueo attraverso gli spazi zonulari, seguita da eliminazione legata al turnover dell'umore acqueo ed al drenaggio ematico uveale. La via di eliminazione posteriore, invece, coinvolge la permeazione della BRB e la successiva eliminazione sistemica. Quest'ultima si può verificare solo se il coefficiente di diffusione passiva del farmaco attraverso la BRB è molto alto o se il farmaco è in grado di sfruttare un meccanismo di trasporto attivo. Ne consegue che fattori quali idrofilia ed elevato peso molecolare siano in grado di aumentare l'emivita intravitreale dei farmaci. Talvolta per prolungate l'azione di farmaci lipofili a basso peso molecolare si ricorre alla somministrazione di sospensioni del farmaco scarsamente idrosolubile (es. corticosteroidi). In alternativa è possibile impiantare appositi device intravitreali, biodegradabili o meno, senza incorrere in plateali eventi flogistici grazie allo sfruttamento del particolare stato immunitario delle porzioni più interne dell'occhio (*Inoue M et al. 2004; Rosenfeld PJ et al. 2006; Gaudana R et al. 2010; Yasukawa T et al. 2011; Kitagawa T et al. 2013; Sarao V et al. 2014; Awwad S et al. 2017*).

In genere, la maggior parte della farmacoterapia oculare consiste nell'autosomministrazione da parte dei pazienti di preparazioni per uso topico (**Fig. 8**). La via topica è, infatti, la via d'elezione per il trattamento dei disturbi oculari nonché la più accettata ed è proprio per questo che circa il 90% delle forme di dosaggio oftalmiche presenti in commercio si trova sotto forma di preparati topici, in particolare colliri. In questo caso il sito di applicazione è costituito principalmente da cornea, congiuntiva e sclera. Sebbene la via oculare topica sia la migliore in quanto a semplicità di accesso al sito di somministrazione e compliance del paziente essa può risultare spesso inefficace a causa delle innumerevoli barriere fisiche e biochimiche atte alla protezione dell'occhio. I meccanismi protettivi innati dell'occhio risultano pertanto in una bassa biodisponibilità (< 5%) che si abbatte ancora di più (< 0.001%) se si considera la frazione di farmaco in grado non solo di penetrare a livello oftalmico ma anche di raggiungere effettivamente il

segmento oculare posteriore. Tra i vari fattori che concorrono a impedire l'ingresso del farmaco nelle regioni più interne dell'occhio ritroviamo:

- ☉ Film lacrimale precorneale,
- ☉ Riflessi di lacrimazione e ammiccamento.
- ☉ Limitata capacità del fornice congiuntivale,
- ☉ Struttura anatomica e fisiologia corneale,
- ☉ Presenza della BAB,
- ☉ Fenomeni di assorbimento non produttivo attraverso la congiuntiva,
- ☉ Drenaggio nasolacrimale.



**Figura 8. Somministrazione topica**

Il turnover del film lacrimale è il principale fenomeno che limita il tempo di residenza dei farmaci sul sito di assorbimento. Il volume lacrimale umano è pari a circa 7  $\mu\text{l}$ . Il volume di una goccia oculare è pari a circa 50  $\mu\text{l}$  e il fornice congiuntivale può, anche se solo temporaneamente, espandersi fino ad un volume massimo di 30  $\mu\text{l}$ . Il film lacrimale ha un turnover molto rapido (0.66  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) che aumenta ulteriormente se si innesca il riflesso di lacrimazione. In genere la somministrazione di una forma di dosaggio sulla superficie dell'occhio, la somministrazione di farmaci irritanti, la presenza di alcuni eccipienti o le alterazioni del pH fisiologico causate dalla formulazione, costituiscono uno stimolo che scatena sia il riflesso di lacrimazione che il riflesso di ammiccamento ed è per questo che la maggior parte delle soluzioni somministrate per via topica ha un tempo di residenza medio di soli 15-20 secondi. L'ammiccamento e la lacrimazione riflessa hanno, infatti, lo scopo di lavare via i corpi estranei dalla superficie oculare mantenendola sempre pulita e asettica. Costituiscono pertanto un ostacolo in quanto limitano enormemente il tempo di permanenza del farmaco sul sito di somministrazione e di assorbimento, con conseguente crollo della biodisponibilità. Inoltre, l'ammiccamento continua ulteriormente ad aumentare il drenaggio lacrimale in quanto la contrazione muscolare incoraggia lo spostamento del fluido lacrimale che defluisce verso il dotto nasolacrimale. Le lacrime trascineranno quindi

con sé il farmaco a tale livello. Tale fenomeno prende il nome di assorbimento o drenaggio nasolacrimale e comporta l'arrivo del farmaco al torrente ematico anche dopo instillazione oculare topica con conseguente possibilità di sviluppo di effetti avversi sistemici. Ne consegue che somministrare una goccia di volume superiore non risulti certamente utile per aumentare la quantità di farmaco realmente biodisponibile, ma anzi possa solo aumentare la probabilità di effetti avversi sistemici.

La quota di farmaco che riesce a permanere sul sito di assorbimento entra quindi in contatto con strutture quali la cornea, la congiuntiva e la sclera.

Le principali vie di assorbimento per il farmaco a questo punto sono due: la via corneale e la via non corneale. La via corneale comporta l'attraversamento di tutti gli strati che costituiscono la cornea. La cornea è, infatti, una membrana anfifilica selettivamente permeabile, ma è lo strato epiteliale con le sue tight junctions a conferire la maggior parte della resistenza alla diffusione dei soluti. A causa della natura anfifilica della cornea (epitelio ed endotelio sono lipofili mentre lo stroma è idrofilo) esiste una relazione parabolica tra coefficiente di diffusione e permeabilità corneale. Per quanto riguarda la via non corneale essa comporta l'attraversamento di congiuntiva, tenon e sclera. La permeabilità di questi tessuti e la farmacocinetica associata a queste vie di permeazione, tuttavia, è meno nota. L'assorbimento attraverso la congiuntiva in genere sembra favorito da due fattori fondamentali: l'elevata area disponibile (circa 17 volte maggiore dell'area corneale) e la dimensione dei pori. Tuttavia l'assorbimento congiuntivale è considerato non produttivo in quanto l'elevata presenza di vasi sia sanguigni che linfatici a questo livello comporta ulteriori importanti perdite sistemiche di farmaco. Infine l'assorbimento attraverso la sclera è considerato assimilabile a quello che avviene attraverso lo stroma corneale (Awwad S et al. 2017).

### ***1.3 Forme Di Dosaggio Oftalmiche Convenzionali Vs Ocular Drug Delivery Systems Innovativi***

Come visto precedentemente è la via topica quella maggiormente impiegata per la somministrazione di farmaci a livello oftalmico. Pertanto le forme di dosaggio oftalmiche convenzionali sono generalmente progettate per la somministrazione attraverso questa via. Tra le forme di dosaggio convenzionali ritroviamo colliri (soluzioni, emulsioni e sospensioni) unguenti e gel.

I colliri costituiscono il mezzo più accettato per l'applicazione oculare dei farmaci. Sono di semplice somministrazione (possibilità dunque di autosomministrazione), convenienti e sicuri, non invasivi e generalmente graditi ai pazienti. Tuttavia essi comportano la somministrazione di una quantità pulsatile di farmaco in quanto, a causa di tutti i limiti della via topica, precedentemente descritti, dopo l'istillazione della goccia la concentrazione precorneale di farmaco, da cui dipende l'assorbimento, scende bruscamente e rapidamente. Una prima strategia per aumentare il tempo di residenza in situ può essere banalmente quella di chiedere al paziente di chiudere gli occhi subito dopo l'istillazione della goccia ed applicare una pressione al livello del dotto nasolacrimale al fine di minimizzare i riflessi di lacrimazione e ammiccamento nonché il drenaggio nasolacrimale rispettivamente. Alternative tecnologiche volte alla minimizzazione degli ostacoli della via topica e al miglioramento del tempo di residenza, della permeazione corneale e della biodisponibilità possono consistere nell'inserimento nella formulazione di opportuni additivi quali agenti viscosizzanti e/o mucoadesivi, *permeation enhancers*, *enhancer* di solubilità e ciclodestrine. Gli agenti viscosizzanti sono in genere polimeri naturali, semisintetici o sintetici quali, ad esempio, derivati della cellulosa (idrossi-metil-cellulosa, idrossi-propil-cellulosa, sodio carbossi-metil-cellulosa, idrossi-propil-metil-cellulosa) o polialcool che vengono aggiunti al fine di ottenere formulazioni resistenti alla clearance. Spesso gli agenti viscosizzanti agiscono in maniera duplice in quanto oltre ad aumentare la viscosità della formulazione rendendone quindi più difficoltosa l'eliminazione, possono anche conferire al sistema carattere mucoadesivo. In genere l'aumento della viscosità ed il carattere mucoadesivo sono direttamente proporzionali al peso molecolare del polimero impiegato. La mucoadesione è un processo complesso che dipende dall'interpenetrazione tra le catene polimeriche e lo strato epiteliale mucoso. L'instaurarsi di opportune e salde

interazioni si traduce in un protratto tempo di residenza. Il fenomeno della mucoadesione può essere spiegato combinando le seguenti differenti teorie:

- ☉ Teoria elettrica. Le interazioni sono dovute a trasferimenti di elettroni dalla forma di dosaggio al muco e instaurazione di interazioni elettrostatiche.
- ☉ Teoria dell'adsorbimento. I meccanismi di attrazione sono dovuti ad interazioni elettrostatiche (le mucine posseggono residui di acido sialico carichi negativamente), legami a idrogeno ed interazioni Van der Waals. Le interazioni idrofobiche risultano più rilevanti quando il polimero utilizzato ha un carattere anfifilico.
- ☉ Teoria della bagnabilità. Una riduzione della tensione superficiale comporta mucoadesione ed espansione della goccia somministrata sulla superficie oculare.
- ☉ Teoria della diffusione. Comporta l'interpenetrazione del polimero con la mucina e la diffusione della frazione solubile di mucina presente nel fluido lacrimale con conseguente mucoadesione.

Nessuna delle teorie su menzionate può da sola spiegare il complesso fenomeno che porta alla mucoadesione di una forma di dosaggio sulla superficie oculare. Considerando una tipica serie di eventi concatenati che va dall'istillazione all'instaurazione di una forza mucoadesiva per prima entra in gioco la teoria della bagnabilità associata allo swelling polimerico. Questa fase porta alla formazione di legami non covalenti tra formulazione e superficie oculare (interazioni elettrostatiche, legami a idrogeno e interazioni idrofobiche (teoria elettrica e teoria dell'adsorbimento). Infine entra in gioco la teoria della diffusione in quanto, a questo punto, le catene polimeriche si intrecciano alle mucine mediante creazione di legami chimici e fisici. Mentre nei classici colliri il tempo di residenza è dettato dal rapido turnover lacrimale in questi casi esso dipende dal turnover mucosale che è nettamente più lento (*Morrison PWJ et al. 2014*).

I *permeation enhancers* sono molecole in grado di promuovere l'assorbimento corneale andando a modificare temporaneamente e reversibilmente la struttura del tessuto corneale stesso mediante differenti strategie. Tra questi ritroviamo il benzalconio cloruro (BAC), il cloruro di cetil piridinio (CPC), l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA), il poliossietilen steril-etero (PSE) ed il derivato poliossietilenico dell'olio di castoreo (PCO). Il loro meccanismo d'azione è legato alla destabilizzazione del film lacrimale e dei suoi componenti mucosi (nel caso del BAC) ed all'induzione di alterazioni strutturali nonché

solubilizzazione dei componenti delle membrane cellulari. Inoltre l'EDTA agisce chelando e sequestrando ioni calcio con conseguente destabilizzazione delle tight junctions la cui integrità strutturale dipende proprio dalla presenza e dalla disponibilità di questo ione. Anche i gelucire sono stati dimostrati essere utili *permeation enhancers*. Si tratta di gliceridi composti da mono-, di- e trigliceridi e diesteri del PEG anfifilici e dotati di differenti proprietà. Ad esempio il gelucire 44/14 (temperatura di ebollizione a 44°C e bilancio idrofilico/idrofobico pari a 14) è in grado di aumentare la permeabilità di farmaci sia idrofili che lipofili a concentrazioni non irritanti. Questo risulta cruciale in quanto inducendo destrutturazione del film lacrimale o alterazioni corneali i *permeation enhancers* irritazioni e danni corneali permanenti. Quindi oltre ad essere efficace un buon *permeation enhancer* dovrebbe essere non tossico, non irritante, compatibile con gli altri componenti della formulazione, inerte, efficace anche a basse concentrazioni e in grado di agire rapidamente e reversibilmente. Gli *enhancer* di solubilità sono impiegati per aumentare la quantità di farmaco somministrabile in quanto l'assorbimento e quindi la biodisponibilità sono ovviamente funzione della concentrazione di farmaco nello spazio precorneale. Inoltre, un aumento della solubilità del farmaco può portare alla possibilità di somministrare gocce di volume inferiore e quindi meno soggette a clearance per drenaggio, mantenendo comunque costante la dose instillata. Le ciclodestrine sono ben tollerate a livello oftalmico e sono state valutate come *enhancer* sia di solubilità che di permeazione in particolare per farmaci lipofili. Si tratta di oligosaccaridi con struttura tridimensionale a forma di tronco di cono costituiti da una superficie esterna idrofilica che li rende solubili in acqua e da una cavità interna idrofobica. Sono quindi in grado di formare complessi di inclusione (o complessi host-guest) con molecole lipofile. I complessi ciclodestrina-farmaco si trovano inoltre in equilibrio dinamico con la loro forma dissociata che prevede dunque il farmaco libero in soluzione e disponibile all'assorbimento. La costante di dissociazione del complesso regola il rilascio del farmaco mantenendo costante la concentrazione dello stesso nello spazio precorneale. Se da una parte agiscono quindi da promotori di solubilità per farmaci lipofili altrimenti scarsamente solubili in acqua, dall'altra la ciclodestrina scarica può anche agire da *permeation enhancers* in quanto in grado di sequestrare molecole di colesterolo dalle membrane cellulari comportando temporanea modifiche istologiche del tessuto corneale e alterazioni della permeabilità. Altre forme di dosaggio convenzionali come le emulsioni, le sospensioni e gli unguenti sono stati opportunamente messi a punto per promuovere la solubilità, il tempo di

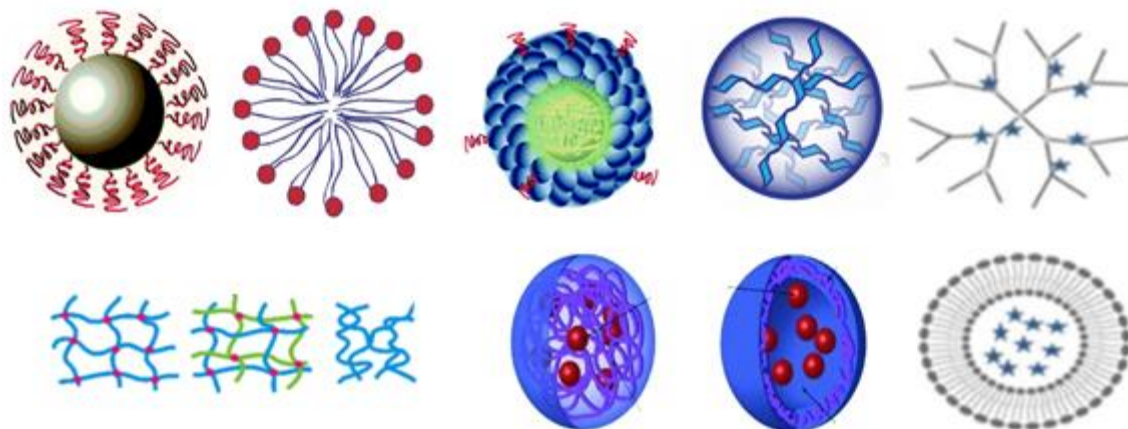


residenza e la biodisponibilità. Tuttavia queste opzioni farmaceutiche sono spesso associate a problematiche quali irritazione locale, arrossamento, instabilità e alterazioni della visione. Le emulsioni sono sistemi commercialmente impiegati al fine di incrementare la solubilità di farmaci lipofili scarsamente idrosolubili e quindi difficoltosi da somministrare nella dose necessaria. Le emulsioni possono essere di due tipi o/w o w/o. In genere le più impiegate in campo oftalmico sono le emulsioni o/w in quanto la presenza della base esterna lipofila in quelle w/o le rende più irritanti o comunque caratterizzate da una minore tolleranza oftalmica. Inoltre le emulsioni w/o possono dare spesso problematiche di alterazioni della visione dopo instillazione. Rispetto ai colliri classici le emulsioni sono più viscosi e comportano un aumento del tempo di residenza della formulazione, la loro componente oleosa può incrementare notevolmente la solubilità del farmaco scelto e di conseguenza la dose somministrabile e la biodisponibilità, inoltre possono dar luogo ad un rilascio sostenuto di farmaco. Talvolta per sfruttare le caratteristiche positive delle emulsioni i farmaci sono opportunamente derivatizzati al fine di sfruttare l'emulsione come carrier. Recentemente, inoltre, sono stati anche introdotti dei coating a base di polimeri mucoadesivi come il chitosano o i derivati della cellulosa per incrementare la resistenza alla clearance di questa tipologia di forma di dosaggio. Un'altra metodica per la somministrazione di farmaci scarsamente idrosolubili si avvale della somministrazione di sospensioni. Si tratta infatti di dispersioni fini di farmaco insolubile in acqua e di opportuni agenti sospendenti. Le particelle solide di farmaco sono in grado di permanere nel fornice congiuntivale più a lungo di una goccia di un classico collirio e in base alla loro cinetica di dissoluzione possono mantenere costante la concentrazione precorneale di farmaco a lungo promuovendo l'assorbimento. La clearance delle particelle sospese e la loro dissoluzione sono funzione della dimensione particellare: particelle più grandi prolungano il tempo di residenza mentre particelle più piccole mantengono costante la concentrazione del principio attivo. Tuttavia la presenza di particelle solide in genere è fastidiosa per i pazienti in quanto è associata alla percezione di un corpo estraneo sulla superficie oculare e questo può comportare anche arrossamenti ed irritazioni locali. Inoltre la stabilità di queste formulazioni non è generalmente eccelsa. Esse necessitano shaking presomministrazione per la risospensione del farmaco nel flacone e tuttavia la distribuzione del farmaco nelle gocce rimane comunque non uniforme. Gli unguenti sono sistemi semisolidi e di conseguenza più viscosi progettati appositamente per l'ottenimento di un maggiore tempo di residenza. Tuttavia i fattori positivi di questo tipo di formulazioni

sono anche il loro limite in quanto a causa dell'elevata viscosità possono comportare offuscamento della vista, irritazioni e arrossamenti con conseguente abbattimento della compliance del paziente (*Chandran S et al. 2008; Patel A et al. 2013; Morrison PWJ et al. 2014; Awwad S et al. 2017*).

Tra le altre formulazioni convenzionali ricordiamo soluzioni e sospensioni di farmaco somministrate per via iniettiva oftalmica nonché formulazioni per os o endovenose somministrate allo scopo di essere assorbite a livello oculare attraverso la via sistemica.

Nonostante i numerosi sforzi volti a migliorare l'efficacia delle forme di dosaggio convenzionali esse rimangono spesso inefficienti dal punto di vista terapeutico o caratterizzate da effetti avversi locali come irritazione, arrossamento, offuscamento della visione ed effetti avversi sistemici legati alla perdita sistemica di farmaco che diventano particolarmente rilevanti nel trattamento di patologie dal carattere cronico. Di conseguenza oggi l'attenzione dei tecnologi farmaceutici in ambito oftalmico è rivolta verso lo sviluppo di *ocular drug delivery systems* innovativi basati sulla nanotecnologia. Le formulazioni oftalmiche nanotecnologiche si stanno infatti dimostrando sempre più efficienti e promettenti anche per il trattamento di disturbi cronici del segmento oculare posteriore sfruttando però la via di somministrazione topica. Gli *ocular drug delivery systems* nanotecnologici hanno dimensione nanometrica (< 500 nm) con conseguente riduzione dell'irritazione oculare, sono in genere ben tollerati dai tessuti oftalmici nonché capaci di incrementare la dose di farmaco somministrata ed anche la dose biodisponibile. Tra gli *ocular drug delivery systems* innovativi ricordiamo i nanocarrier quali nanoparticelle, nanosospensioni, liposomi, dendrimeri e micelle nonché altri sistemi intelligenti come in situ gelling systems, lenti a contatto medicate e impianti intravitreali. È anche possibile ottenere fibre micro- e nanometriche da impiegare per la produzione di inserti oftalmici intelligenti. Dopo un breve excursus sulle varie tipologie di *drug delivery systems* innovativi focalizzeremo la nostra attenzione in particolare sulle micelle e gli inserti oftalmici micro- e nanofibrillari (**Fig. 9**).



**Figura 9. Drug Delivery Systems nanostrutturati**

Le nanoparticelle sono sistemi colloidali di dimensione generalmente compresa tra i 10 e i 500 nm. Possono essere costituiti da lipidi, proteine, polimeri naturali o sintetici quali albumina, sodio alginato, chitosano, acido polilattico (PLA), acido polilattico-co-glicolico (PLGA) e policaprolattone (PCL). In base alla loro organizzazione strutturale, a sua volta dipendente dalla metodica di preparazione impiegata, possiamo distinguere nanocapsule o nanosfere. Nelle prime distinguiamo uno shell esterno e un core ove generalmente è incapsulato il farmaco mentre le seconde sono matrici uniformi all'interno delle quali troviamo il farmaco omogeneamente distribuito. Questa tipologia di nanocarrier è stata proposta sia per la somministrazione topica che iniettiva. Per quanto riguarda la via topica, le nanoparticelle sono un carrier promettente in quanto le loro piccole dimensioni le rendono poco irritanti e la loro capacità di dar vita ad un rilascio sostenuto di farmaco può comportare una riduzione nella frequenza delle somministrazioni. Tuttavia, alla stregua di una soluzione acquosa le nanoparticelle potrebbero subire una rapida clearance. Dunque, per superare questo ostacolo può essere opportuno impiegare per la loro realizzazione polimeri in grado di conferire al sistema finale capacità mucoadesive quali il PEG, il chitosano e l'acido ialuronico (**Fig. 10**). Per quanto riguarda la via iniettiva, modulando opportunamente la dimensione e la carica superficiale dei sistemi è possibile controllare la disposizione delle nanoparticelle dopo somministrazione sia perioculare che intravitreale. Per quanto riguarda la via perioculare è stato osservato che particelle molto piccole (20 nm) hanno una clearance molto rapida, al contrario particelle più grandi (> 200 nm) possono essere ritenute anche per mesi. In questo caso, se il sistema è in grado di attuare un rilascio controllato, sostenuto e protratto l'efficacia terapeutica anche al livello del

segmento oculare posteriore è raggiungibile. Per somministrazione intravitreali è importante valutare la capacità della nanoparticelle di migrare nel vitreo ed accumularsi al livello dell'RPE agendo a tale livello come depot di farmaco a rilascio protratto. Molto importante però in tal senso è anche la capacità dei sistemi nanoparticellari di essere eliminati o degradati in quanto fenomeni di accumulo del carrier potrebbero comunque portare a tossicità.

Le nanosospensioni sono dispersioni colloidali di farmaco submicronizzato insolubile ed idrofobico, stabilizzato dalla presenza di polimeri o surfattanti. La dimensione submicrometrica del farmaco annulla tutta una serie di problematiche relative alla somministrazione delle sospensioni classiche come l'irritazione ed il rossore. Nel contempo la presenza di farmaco solido permette di sfruttare i vantaggi della somministrazione di una sospensione come l'aumentato tempo di residenza e la possibilità del mantenimento di elevate concentrazioni di farmaco nello spazio precorneale per un lungo periodo di tempo, in dipendenza della cinetica di dissoluzione del farmaco solido. Tuttavia questa strategia terapeutica si è dimostrata più efficace nel trattamento di patologie del segmento oculare anteriore ma non consente spesso un efficace raggiungimento del segmento oculare posteriore.

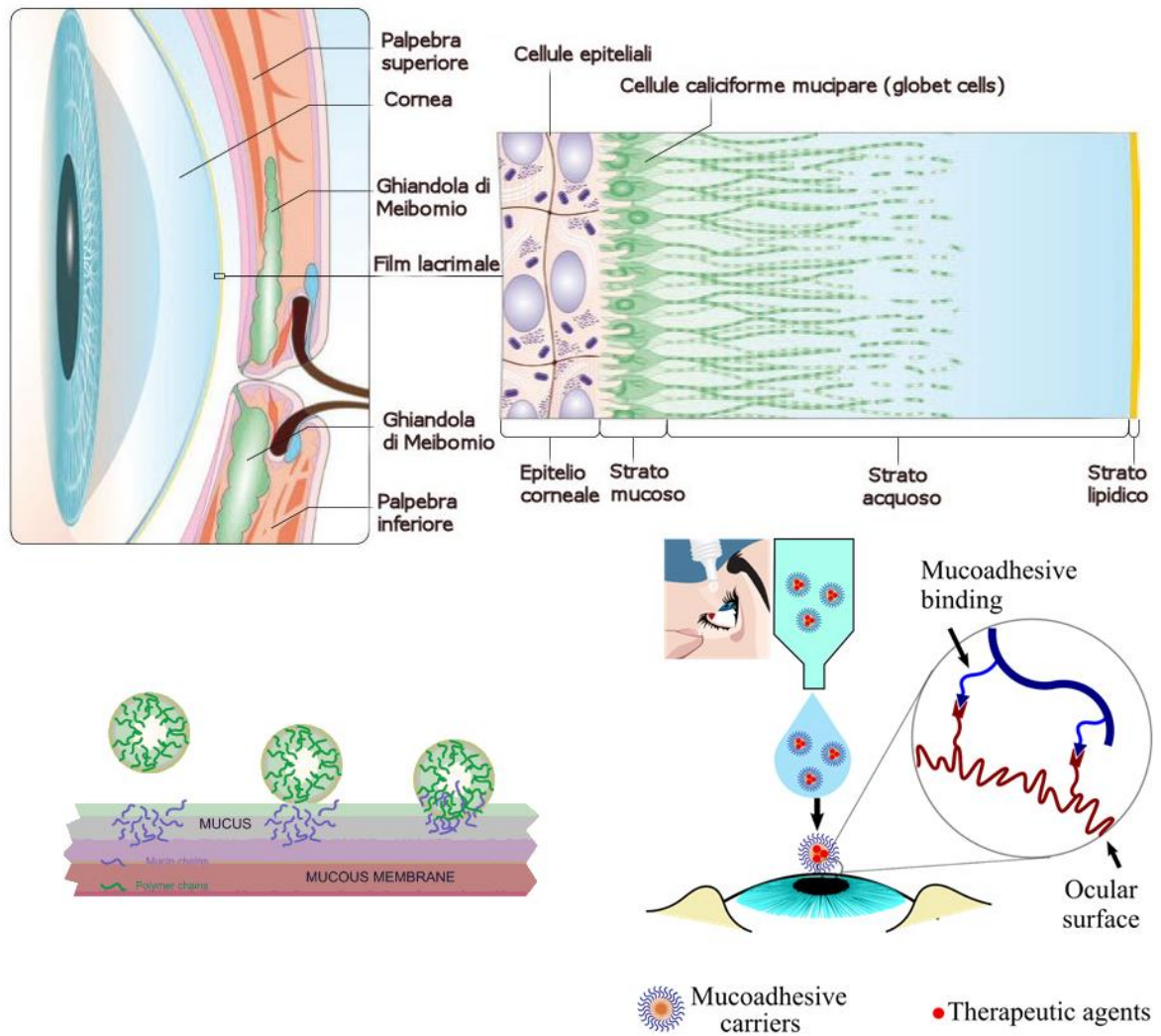
I liposomi sono vescicole lipidiche, formate da uno o più doppi strati fosfolipidici ed un core acquoso, che hanno già dimostrato una buona efficacia sia nel trattamento del segmento oculare anteriore che posteriore. In base alla loro dimensione ed al numero di bilayers fosfolipidici possono essere catalogati in: small unilamellar vesicles (10-100 nm), large unilamellar vesicles (100-300 nm) e multilamellar vesicles. Teoricamente, i liposomi rappresentano il carrier ideale per la somministrazione oftalmica grazie alla loro elevata rassomiglianza alle membrane cellulari che gli conferisce eccellente biocompatibilità, nonché alla loro capacità di incorporare farmaci sia idrofobici che idrofilici. I liposomi sono già stati proposti con buoni risultati per il trattamento delle patologie sia del segmento oculare anteriore che posteriore. In quest'ultimo caso, è opportuno formulare liposomi in grado di proteggere molecole sensibili come proteine, peptidi e oligonucleotidi ed incrementarne il tempo di emivita nel corpo vitreo garantendo un rilascio sostenuto.

I dendrimeri sono nanosistemi altamente ramificati di natura polimerica. Le loro caratteristiche sono funzione del materiale di partenza e cioè della complessità della

ramificazione polimerica, del peso molecolare, della dimensione, della geometria molecolare, della carica superficiale e della presenza di estremità reattive quali ammine, ossidrili e funzioni carbossiliche. La reattività del terminale è importante in quanto può essere sfruttata per la coniugazione chimica con agenti veicolanti o farmaci. La struttura altamente ramificata dei dendrimeri può comportare l'incorporazione di una vasta gamma di farmaci idrofobici e idrofilici. Tuttavia, finora, in campo oftalmico i risultati ottenuti non risultano particolarmente promettenti.

Le micelle polimeriche sono sistemi dinamici costituiti da polimeri anfifilici che, in ambiente acquoso si auto-organizzano con formazione di una struttura core-shell. Verranno trattate in maniera più approfondita in seguito.

Un'altra particolare tipologia di *ocular drug delivery forming* innovativa è costituita dagli *in situ gelling forming*. Si tratta di soluzioni polimeriche che, in risposta a stimoli ambientali quali variazioni della temperatura, del pH e della forza ionica o induzione mediata da raggi UV, vanno incontro ad una transizione sol-gel con formazione di un gel viscoelastico sulla superficie oculare. Molti polimeri in grado di gelificare in risposta a stimoli termici sono già stati proposti per il *drug delivery* oculare. In questo caso le soluzioni di polimero sono miscelate con l'opportuno farmaco e quando la soluzione è somministrata la temperatura corporea porta alla formazione di un gel che funge da depot di farmaco alle condizioni fisiologiche. Questa strategia potrebbe rivelarsi promettente in termini di aumento della biodisponibilità sia a livello del segmento oculare anteriore che posteriore grazie alla possibilità di modulare un rilascio sostenuto di farmaco, al prolungamento del tempo di contatto con la cornea ed alla riduzione nella frequenza delle somministrazioni che si accompagna ad una riduzione degli effetti collaterali sistemici. Di conseguenza i gel termosensibili potrebbero essere una buona strategia per il trattamento dei disturbi oculari cronici.



**Figura 10. Comportamento mucoadesivo di un sistema di *Drug Delivery* innovativo**

Le formulazioni in grado di aumentare ancor di più il tempo di permanenza in situ e quindi l'efficacia terapeutica del sistema somministrato potrebbero essere le lenti a contatto. Sono dischi sottili e curvilinei di materiale plastico e trasparente disegnato appositamente per l'applicazione corneale. Dopo la somministrazione esse aderiscono al film lacrimale corneale grazie alla tensione superficiale esistente. In genere, il farmaco è caricato nelle lenti a contatto semplicemente per imbibizione delle stesse in una soluzione di farmaco. Sebbene questi prodotti risultano più efficaci della corrispondente somministrazione del collirio in quanto chiaramente mostrano un tempo di residenza nettamente superiore, essi sono spesso contraddistinti da inadeguata drug loading e rapida cinetica di rilascio del farmaco caricato, con forti limitazioni sulle loro potenzialità e sul loro utilizzo. Per superare questi ostacoli le lenti a contatto possono essere medicate con

nanosistemi come liposomi, nanoparticelle e microemulsioni caricati a loro volta con il farmaco scelto. In questo caso la lente a contatto svolge la funzione di mezzo disperdente e supporto garantendo nel contempo una prolungata permanenza a livello corneale. Inoltre, lo sviluppo di particelle stimolo sensibili potrebbe portare alla produzione di lenti a contatto intelligenti in grado di rilasciare il carrier ed in seguito il farmaco solo in risposta a stimoli quali pH e temperatura.

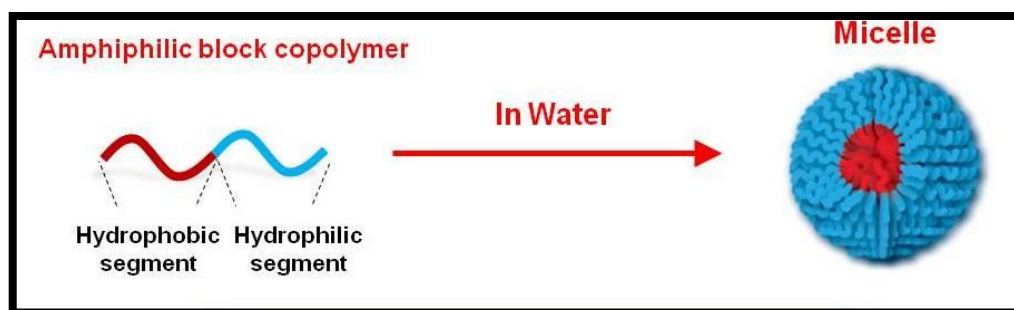
Un compromesso tra la necessità di ricorrere a frequenti iniezioni intraoculari per il trattamento dei disturbi cronici del segmento oculare posteriore e la scarsa capacità di differenti preparazioni oftalmiche di garantire elevate concentrazioni di farmaco nel vitreo è costituito dagli impianti intraoculari. Sono device disegnati appositamente per garantire un rilascio di farmaco localizzato e sostenuto per un lungo periodo di tempo. Normalmente per il *drug delivery* nel segmento oculare posteriore gli impianti vengono allocati nel vitreo, posteriormente al sistema di lenti e anteriormente alla retina, mediante una piccola incisione chirurgica. La procedura è invasiva ma comunque sfruttata grazie ai vantaggi che tali sistemi comportano quali il rilascio sostenuto e locale di farmaco al livello del tessuto da trattare con raggiungimento in situ di concentrazioni terapeutiche, i ridotti effetti avversi e la possibilità di bypassare la BRB. Gli impianti possono essere biodegradabili o meno. I primi sono i più accettati in quanto non è necessario un intervento di espunti tuttavia i secondi possono consentire un rilascio di farmaco maggiormente a lungo tempo mediante il raggiungimento di una cinetica di ordine zero. Inoltre nel caso di impianti biodegradabili è necessario valutare il meccanismo di degradazione ed eliminazione poiché questo non deve comportare sviluppo di metaboliti tossici, né fenomeni di accumulo che potrebbero risultare problematici nel lungo tempo (*Patel A et al. 2013*).

Infine gli inserti oftalmici sono device solidi appositamente formulati per essere posti nel fornice congiuntivale per periodi di tempo protratti.

Adesso si tratteranno in maniera più approfondita i sistemi carrier oggetto del presente lavoro di tesi: le micelle polimeriche e gli inserti oftalmici micro- e nanofibrillari.

## 1.4 Micelle Polimeriche

Le micelle sono sistemi colloidali costituiti da molecole anfifiliche generalmente in grado di autoaggregarsi in mezzo acquoso con conseguente formazione di strutture supramolecolari di tipo core-shell. Le micelle possono avere varie dimensioni (10-1000 nm) e forme (sferica, cilindrica, a stella ecc...) in dipendenza del peso molecolare delle porzioni formanti il core idrofobico e la corona idrofilica e del loro rapporto in peso. Il self-assembling delle micelle avviene al di sopra di un valore soglia di concentrazione definito concentrazione di aggregazione critica (CAC). La forza guida per il self-assembling e per il mantenimento strutturale dell'aggregato sopramolecolare risiede nelle interazioni idrofobiche che si generano tra i blocchi idrofobici formanti il core micellare. Le porzioni formanti lo shell o corona sono idrofiliche e garantiscono la "solubilità" o più propriamente la disperibilità delle micelle in mezzi acquosi (**Fig. 11**). Grazie alla presenza di un core idrofobico, questo tipo di nanosistema può essere considerato un carrier innato per molecole lipofile ed in grado, tra l'altro, di promuoverne la solubilità in mezzo acquoso.



**Figura 11. Formazione di micelle polimeriche a seguito di self-assembling**

Tra le varie tipologie di nanocarrier per la veicolazione oftalmica le micelle risultano particolarmente promettenti grazie alle loro peculiari caratteristiche.

Le micelle intese come *ocular drug delivery systems* possono essere fondamentalmente di due tipi: complessi poli-ionici (PIC) e micelle polimeriche.



Le micelle polimeriche hanno valori di CAC bassi e risultano stabili nei confronti della diluizione (stabilità cinetica). I farmaci lipofili sono incorporati nel core micellare mediante interazioni idrofobiche, interazioni di van der Waals e legami a idrogeno. I polimeri formanti le micelle PIC, invece, sono solubili in acqua e dotati di una porzione carica formante il core. L'instaurarsi di interazioni elettrostatiche tra le porzioni formanti il core ed il principio attivo costituisce la forza guida per la formazione delle micelle e la stabilizzazione dell'aggregato sopramolecolare.

La scelta del tipo di micelle da impiegare dipende da diversi fattori come le proprietà fisico-chimiche del farmaco, le interazioni farmaco/polimero o farmaco/surfattante, il sito di azione, la velocità di rilascio del farmaco, la biocompatibilità del polimero/surfattante e del sistema nonché la sua stabilità fisica. Ad esempio, l'uso di micelle PIC è raccomandato per la somministrazione di agenti bio-terapeutici quali i polianioni come gli oligonucleotidi antisenso o i frammenti di DNA plasmidico.

La tipologia più versatile di micelle è, tuttavia, quella a base polimerica. Idealmente, il polimero usato per la realizzazione delle micelle dovrebbe essere biodegradabile/bioeliminabile e biocompatibile. Il PEG è, in genere, uno dei polimeri più frequentemente impiegati per la formazione del segmento idrofilico grazie alla sua eccellente solubilità in acqua e biocompatibilità. La biodegradazione dei polimeri assicura l'eliminazione di frazioni polimeriche inattive dai tessuti oculari. Tuttavia, i prodotti di degradazione dovrebbero essere non tossici né proinfiammatori nei confronti dei sensibili tessuti oculari e particolarmente nei confronti della delicatissima retina.

Sono numerose le fondamentali caratteristiche da valutare nel design razionale di una formulazione polimerica micellare oftalmica. Alcuni dei fattori più importanti sono il sito di azione, la composizione polimerica, la drug loading, la cinetica di rilascio, l'interazione tessuto-micelle, le dimensioni e la carica superficiale dell'aggregato. Durante il processo di formazione delle micelle i farmaci idrofobici sono incorporati nel core micellare in quantità spesso dipendente dal metodo di preparazione scelto. Il processo di formazione di aggregati micellari carichi di farmaco coinvolge la formazione di interazioni idrofobiche e legami a idrogeno tra polimero e principio attivo. I più comuni metodi per la formazione delle micelle polimeriche sono la dissoluzione diretta, l'evaporazione del solvente, la reidratazione del film (o casting) e il metodo della dialisi. La scelta del metodo di preparazione più opportuno dipende dalle caratteristiche chimico/fisiche del polimero

come ad esempio la loro solubilità. Un'efficiente incapsulazione nel core micellare è funzione sia del metodo di preparazione selezionato che dall'ottimizzazione delle interazioni farmaco/polimero. Generalmente metodi come l'evaporazione del solvente e la reidratazione del film risultano in valori di drug loading più alti rispetto a quelli ottenuti mediante dissoluzione diretta o dialisi. In dipendenza del tipo di polimero e delle interazioni farmaco/polimero che si instaurano il metodo della dissoluzione diretta può essere modificato in modo da eliminare l'impiego di solventi organici come la DMF o l'acetone che dovrebbero necessariamente essere completamente rimossi prima dell'utilizzo clinico. Il metodo della reidratazione del film può essere un'alternativa alla dissoluzione diretta in quanto l'esposizione prolungata della soluzione di farmaco e polimero al vuoto può garantire il completo allontanamento del solvente organico volatile impiegato incoraggiando nel contempo un protratto contatto tra farmaco e polimero, base essenziale per la formazione di micelle cariche con elevata drug loading.

La stabilità delle micelle è un ulteriore fattore determinante per l'efficacia *dell'ocular drug delivery system*. La stabilità termodinamica è raggiunta grazie alle interazioni idrofobiche che tengono coesi i blocchi idrofobici formanti il core come anche grazie alle porzioni polimeriche idrofiliche che garantiscono la "solubilizzazione" in acqua dell'aggregato sopramolecolare. Per di più, l'incorporazione di farmaci idrofobici può aumentare la stabilità delle micelle in quanto le interazioni idrofobiche all'interno del core aumentano in numero rendendo l'intera struttura sempre più coesa. Inoltre, la stabilità delle micelle nei vari tessuti oculari dovrebbe essere valutata poiché a seguito di somministrazione le micelle incontreranno vari e differenti ambienti cellulari. Per esempio, la stabilità fisica delle formulazioni nel fluido lacrimale dovrebbe essere valutata al fine di sviluppare un *ocular drug delivery system* di successo da somministrare come collirio per via topica.

Il meccanismo di rilascio del farmaco dalle micelle polimeriche dipende dalla natura e dalla forza dell'interazione tra il core polimerico e il farmaco nonché dalla stabilità delle micelle nel tessuto oculare, dall'eventuale degradazione del polimero e dalla velocità di diffusione delle molecole di farmaco dal core micellare. Il rilascio del farmaco dovrebbe essere modulato considerando l'effettivo sito di azione del farmaco. Per esempio, se il sito di azione è lo spazio precorneale come la congiuntiva o la cornea il rilascio di farmaco

dovrebbe avvenire nell'area precorneale e il farmaco rilasciato dovrebbe essere assorbito dopo somministrazione topica.

Inoltre, le micelle possono garantire un buon tempo di ritenzione nello spazio precorneale e prevenire perdite di formulazione attraverso i meccanismi di clearance precorneale. Per raggiungere questo obiettivo basta progettare la formulazione impiegando opportuni polimeri mucoadesivi. Nello scenario più produttivo di assorbimento, le micelle somministrate per via topica dovrebbero essere assorbite e rilasciate al livello del sito target. La stabilità delle micelle nell'ambiente precorneale e l'interazione cellule-micelle può determinare la durata della ritenzione precorneale. La lacrimazione riflessa può rimuovere grosse quantità di farmaco e di carrier rapidamente. Questo, però, può essere prevenuto mantenendo delle dimensioni appropriate ( $< 5$  nm) nonché l'isotonia e l'osmolarità della dispersione micellare. D'altro canto, l'umore vitreo è un compartimento relativamente stagnante e la velocità di rilascio può dipendere da stabilità fisica, velocità di degradazione polimerica e interazione farmaco/polimero. Tuttavia, per via intravitreale ancora mai nessuno sistema micellare è stato in grado di garantire un rilascio sostenuto di farmaco per più di qualche giorno.

Le dimensioni e la carica superficiale delle micelle sono un aspetto di cruciale importanza per la realizzazione di un *ocular drug delivery system* efficace. Per le micelle polimeriche, le dimensioni possono essere opportunamente modulate variando il peso molecolare dei polimeri impiegati e la drug loading. La disposizione oculare delle micelle a seguito di somministrazione topica può essere influenzata proprio dal loro particle size. In generale il trasporto dei nanocarrier statici, come le nanoparticelle, attraverso le membrane biologiche dipende prevalentemente dalla loro dimensione: più sono piccoli più aumenta la permeabilità. Per le micelle la situazione è un po' differente in quanto, come già visto, si tratta di sistemi in continuo equilibrio dinamico. Il trasporto paracellulare delle micelle attraverso la cornea, la congiuntiva e la sclera potrebbe comportare alti livelli di farmaco nei tessuti intraoculari anche a seguito di semplice istillazione topica. Inoltre, la dimensione delle micelle potrebbe influenzare i processi di ingresso del carrier all'interno delle cellule, come l'endocitosi. Questo potrebbe essere il principale meccanismo di uptake del farmaco da parte di cornea e congiuntiva.

Come riportato in letteratura, a causa della presenza di elettroliti in genere la dimensione delle micelle aumenta. Inoltre anche l'incorporazione di molecole idrofobiche

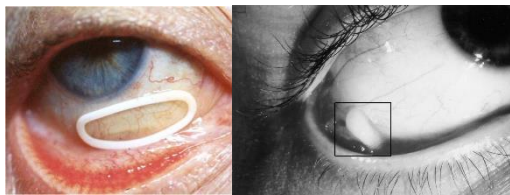
nel core micellare può comportare un aumento di dimensioni. La carica superficiale, invece, può influenzare l'interazione cellula-micella e quindi giocare un ruolo chiave nel determinare la disposizione oculare delle micelle al livello dello spazio precorneale. La superficie delle cellule e il layer di mucina del film lacrimale sono infatti carichi negativamente. Di conseguenza, lo sviluppo di una formulazione micellare con carica superficiale positiva può consentire un prolungato tempo di contatto precorneale ed incrementare la permeazione transcorneale mediante la promozione di interazioni favorevoli tra le micelle e la superficie oculare. Al fine di aumentare il tempo di residenza precorneale e quindi la biodisponibilità molti sforzi dovrebbero essere volti alla promozione dell'interazione cellula-micella. Le due principali strategie impiegate a tale scopo sono il rivestimento della superficie micellare con polimeri policationici come il chitosano o l'inserimento di catene lipidiche nella porzione formante il core idrofobico. Ulteriori requisiti chiave da valutare prima di selezionare il polimero e gli eccipienti per la formulazione micellare sono la sterilità e la biocompatibilità (Ravi DV et al. 2014).

Un altro importante fattore da considerare nel design di sistemi micellari da somministrare per via topica oftalmica è la loro capacità di fungere da *permeation/penetration enhancer*. Non va dimenticato che i carrier micellari possono agire di per sé da promotori dell'assorbimento transcorneale grazie alla natura anfifilica degli unimeri costituenti l'aggregato supramolecolare che li rende in grado di interagire efficacemente con tutti i differenti layers corneali siano essi idrofobici o idrofilici. Inoltre, in tal senso, è molto importante considerare anche la versatilità delle micelle in termini di modifiche chimiche superficiali. La superficie delle micelle può essere, infatti, decorata con opportune molecole ad azione *enhancer* in grado di incrementare le già esistenti proprietà di *enhancer* del sistema. La funzionalizzazione chimica è una tecnica molto sfruttata in tecnologia farmaceutica. Nella tecnologia classica, tuttavia, si ricorre in genere alla derivatizzazione chimica del principio attivo, con conseguente ottenimento di un profarmaco. Questa procedura comporta, però, la creazione di una nuova entità chimica che deve essere nuovamente valutata in termini di attività, biodisponibilità, tossicità ecc... In questo caso, infatti il profarmaco può essere progettato in modo da avere le opportune caratteristiche in termini di solubilità, lipofilia e permeazione, tuttavia l'attività biologica è legata allo smascheramento o liberazione della molecola attiva mediante opportuni processi chimici o enzimatici che idealmente dovrebbero avvenire solo al livello del sito target e senza comportare la formazione di prodotti di scarto tossici. Al fine di evitare

queste problematiche, la procedura può essere trasposta al sistema carrier. In questo caso diventa di vitale importanza la scelta dell'agente derivatizzate avente proprietà di *enhancer*. Una strategia vincente può essere quella di legare chimicamente il carrier ad una molecola che sia substrato dei trasportatori presenti a livello corneale tra cui trasportatori di amminoacidi, peptidi, vitamine, glucosio, lattato, nucleotidi e basi azotate (*Gaudana R et al. 2010*).

## 1.5 Inserti Oftalmici

Un approccio innovativo nell'ambito dell'*ocular drug delivery* consiste nell'applicazione di inserti oftalmici in grado di modulare un rilascio sostenuto, controllato e protratto di farmaco. Gli inserti oftalmici sono preparazioni sterili con consistenza solida o semisolida e con dimensioni e forma appositamente progettati per la somministrazione oculare topica (**Fig. 12**). Sono generalmente posti nel fornice congiuntivale inferiore e, più raramente, in quello superiore e possono garantire un rilascio prolungato di farmaco mediante meccanismi quali la diffusione, l'osmosi o la bioerosione.



**Figura 12. Inserti oftalmici e loro posizionamento**

Negli ultimi anni, è esploso l'interesse verso lo sviluppo di device polimerici da inserire nel fornice congiuntivale. L'opportuno design degli inserti polimerici è un'area attrattiva nonché promettente per superare alcuni importanti limiti legati alla somministrazione di forme di dosaggio convenzionali quali i colliri o gli unguenti. Primo vantaggio tra tutti è il notevole aumento del tempo di residenza precorneale. Questo, unito alla possibilità di modulare un rilascio di farmaco sostenuto continuo e prolungato, evita l'ingresso pulsatile di farmaco all'interno dell'occhio e riduce la frequenza delle somministrazioni necessarie per il raggiungimento dell'effetto terapeutico, comportando un notevole aumento della compliance del paziente.

Gli inserti oftalmici sono costituiti da un supporto polimerico caricato di farmaco il quale può essere rilasciato fondamentalmente attraverso 3 meccanismi:

- ☉ Diffusione. Il farmaco è rilasciato continuamente al livello del film lacrimale secondo una cinetica controllata dal polimero. Se il materiale che compone gli inserti non è erodibile allora il rilascio è modulato dalla dimensione dei pori polimerici, fino ad esaurimento del sistema. Se, invece, il sistema è erodibile si

assisterà ad una iniziale diffusione dai pori, seguita da swelling della matrice e successivo rilascio per bioerosione (come illustrato in seguito),

- ② Osmosi. Gli inserti in questo caso sono pompe osmotiche costituite spesso da due compartimenti distinti. Il primo compartimento è delimitato da una membrana semipermeabile che lo mantiene in contatto con il fluido lacrimale e da una membrana impermeabile elastica che rappresenta il punto di contatto col secondo compartimento. Mentre il secondo compartimento è carico di farmaco, il primo contiene solo un agente osmotico che, a seguito del posizionamento dell'inserto nel fornice congiuntivale, richiama acqua per osmosi dall'ambiente circostante con conseguente rigonfiamento che si ripercuote sulla membrana elastica tra i due compartimenti comportando quindi un rilascio di farmaco,
- ③ Bioerosione. Questo meccanismo di rilascio del farmaco è alla base degli inserti biodegradabili. L'erosione del polimero formante l'inserto comporta il rilascio del farmaco in esso incorporato. I due fattori più importanti da considerare sono quindi l'uniformità di contenuto del principio attivo in tutto il corpo dell'inserto e la cinetica di erosione dell'inserto stesso.

In base alle loro caratteristiche gli inserti oftalmici possono essere, quindi, classificati come insolubili (non biodegradabili) o solubili (biodegradabili).

Gli inserti insolubili (es. Ocusert) sono quelli che più facilmente possono essere progettati in modo da ottenere una specifica cinetica predefinita e controllata di rilascio del farmaco, tuttavia, una volta esauriti, devono essere rimossi. Possono essere inserti di diffusione o inserti osmotici. Anche le lenti a contatto possono essere considerate un particolare tipo di inserto insolubile solo che il loro collocamento non avviene nel fornice congiuntivale, ma sulla cornea e, di conseguenza, è necessario valutare altri parametri come la trasparenza e la permeabilità all'ossigeno. In generale gli inserti insolubili possono essere sistemi reservoir o sistemi matriciali.

Gli inserti solubili o biodegradabili (es. Lacrisert) hanno il vantaggio di essere completamente solubilizzati al livello del sito di somministrazione e, pertanto, non necessitano la rimozione. Possono essere costituiti da polimeri naturali (es. collagene) o semisintetici/sintetici (es. derivati della cellulosa, copolimeri dell'acido metacrilico) soggetti a processi di degradazione chimica o enzimatica a livello della superficie oculare che comportano al contestuale rilascio di farmaco nello spazio precorneale.

Riassumendo i principali vantaggi di una terapia oftalmica basata sulla somministrazione di un inserto sono:

- ☉ Aumento del tempo di contatto con conseguente incremento della biodisponibilità,
- ☉ Possibilità di garantire un rilascio prolungato di farmaco e quindi un aumento dell'efficacia,
- ☉ Somministrazione di una dose accurata e quindi miglioramento della terapia,
- ☉ Riduzione degli effetti avversi sistemici,
- ☉ Riduzione della frequenza e del numero delle somministrazioni con conseguente aumento della compliance del paziente,
- ☉ Comfort,
- ☉ Ridotto burst effect,
- ☉ Facilità della gestione terapeutica e nel posizionamento dell'inserto,
- ☉ Nessuna interferenza con la visione o con la permeabilità all'ossigeno,
- ☉ Cinetica di rilascio del farmaco riproducibile,
- ☉ Sterilizzabilità,
- ☉ Stabilità,
- ☉ Non è necessario inserire dei conservanti,
- ☉ Aumento della shelf life rispetto a formulazioni acquose.

Per contro i principali svantaggi e quindi alcuni importanti fattori da attenzionare sono:

- ☉ Perdita dell'inserto,
- ☉ Ripiegamento dell'inserto su se stesso con conseguente riduzione del rilascio di farmaco,
- ☉ Dislocazione dell'inserto verso la pupilla.

Tutte queste problematiche possono comunque essere superate formulando un inserto mucoadesivo (*Kumar KPS et al. 2013*).

Una tipologia innovativa di inserti polimerici potrebbe essere costituita dagli scaffold fibrillari. Gli scaffold sono strutture tridimensionali sintetiche porose ampiamente utilizzate in differenti campi, dall'ambito energetico a quello biomedico. In quest'ultimo sono spesso sfruttate per la rigenerazione tissutale ma anche per il *drug delivery*. Le principali caratteristiche che li rendono ottimi candidati per il *drug delivery* sono la loro elevata ed interconnessa porosità, l'elevato rapporto superficie/volume, la possibilità di solubilizzare e somministrare farmaci altrimenti scarsamente solubili nei mezzi fisiologici



e la possibilità di modulare le caratteristiche dello scaffold variando la composizione polimerica o i parametri di produzione.

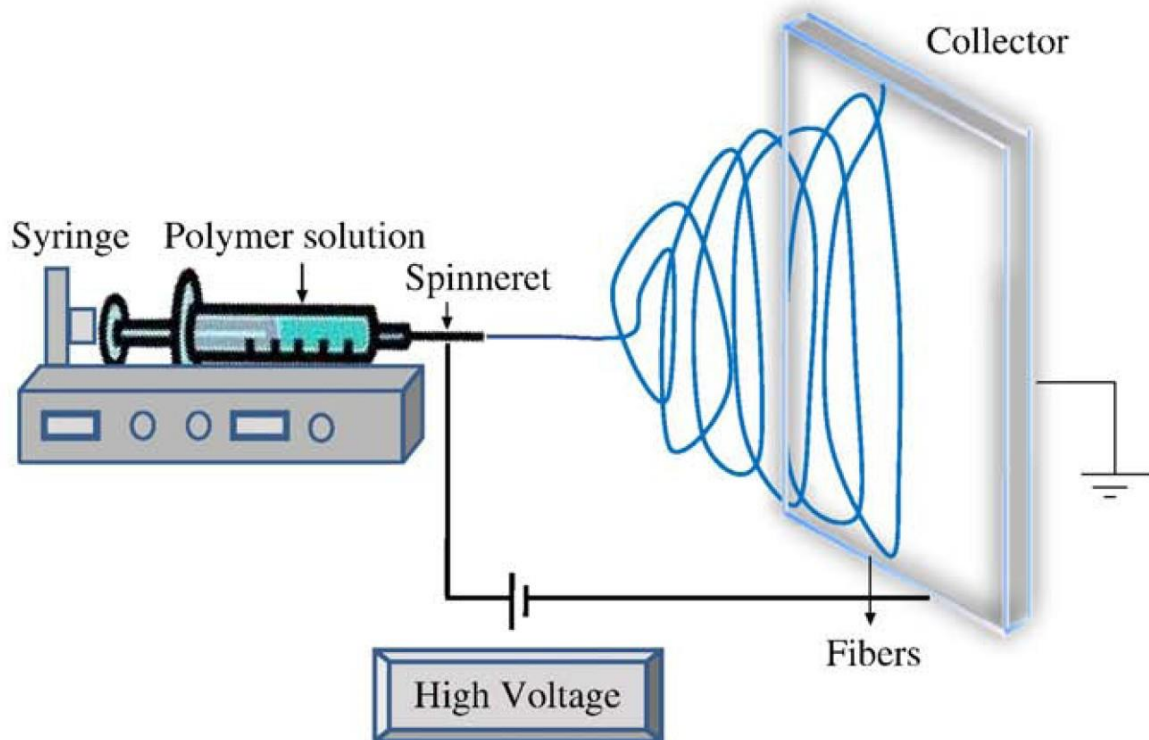
Esistono differenti metodiche per la produzione di scaffold fibrillari, selezionate poi in base al polimero impiegato e all'applicazione del sistema finale, in modo da modulare opportunamente le caratteristiche finali sia macroscopiche che microstrutturali. Le tecniche di preparazione degli scaffold sono distinte in convenzionali (es. solvent casting/particulate leaching, gas foaming, separazione di fase freeze drying, fiber bonding) ed innovative (es. elettrospinning).

Per di più va considerata anche l'opportunità di modificare chimicamente o decorare ulteriormente la superficie degli scaffold già ottenuti in modo da modularne opportunamente le proprietà o conferirne di nuove *ad hoc*. A tale scopo risulta molto versatile il ricorso alla tecnica di funzionalizzazione assistita da plasma.

Si vedranno adesso più nel dettaglio la metodica di preparazione degli scaffold impiegata nel presente lavoro (elettrospinning) e la tecnica di funzionalizzazione plasma-assistita.

### **1.5.1 L'Elettrospinning**

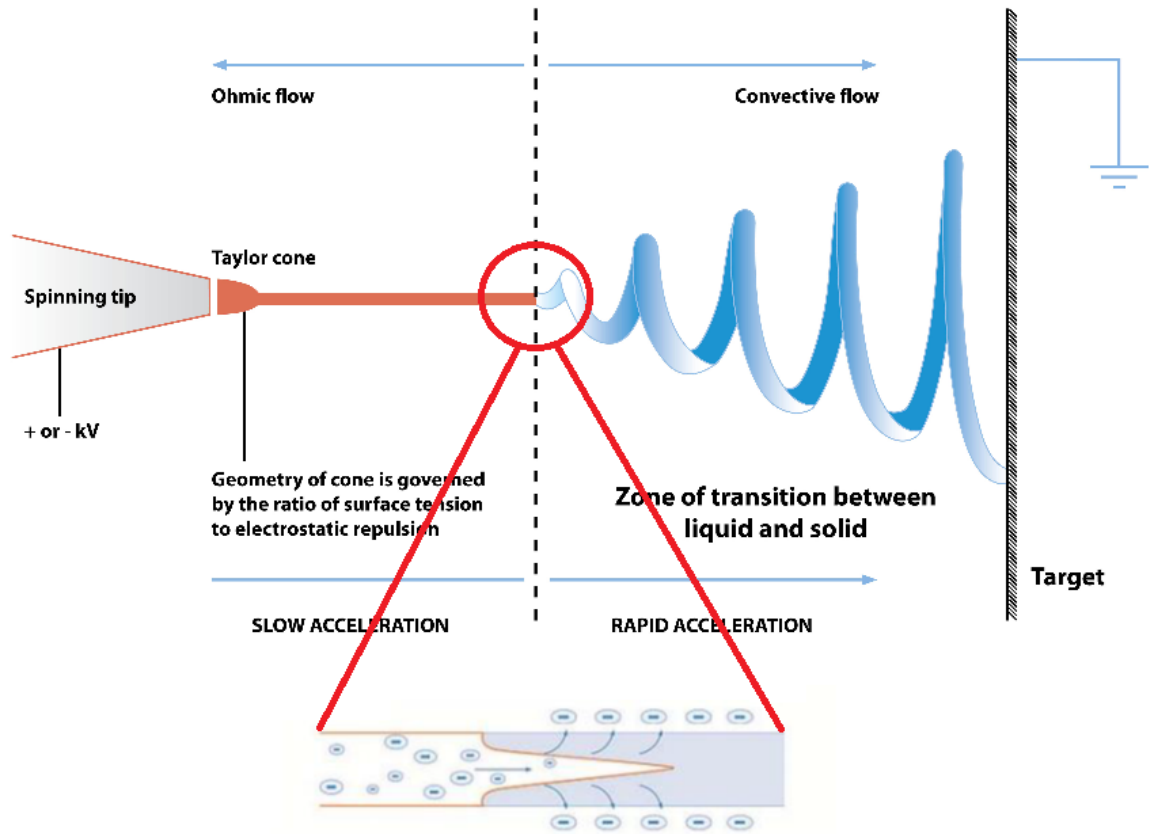
L'elettrospinning (o elettrofilatura) è una tecnica che consente di ottenere fibre polimeriche solide mediante l'applicazione di un opportuna differenza di potenziale ad un sistema in fase liquida (una soluzione polimerica o, qualora non si trovassero condizioni di solubilità favorevoli, un polimero fuso). Questa tecnica si distingue dalle metodiche convenzionali di formazione degli scaffold in quanto non sfrutta sollecitazioni di tipo meccanico, bensì, di tipo elettrostatico, portando ad eccellenti risultati in termini di porosità, area superficiale, flessibilità ed uniformità delle fibre.



**Figura 13. Set up di un apparecchio per l'elettrospinning**

I componenti essenziali di un apparecchio per l'elettrospinning sono 3: una pompa a siringa, un generatore di corrente ed un collettore (**Fig. 13**). Il processo di elettrospinning è ormai ben noto. Brevemente, una soluzione polimerica è caricata all'interno dell'opportuna siringa collegata ad una pompa di flusso avente un ruolo di "assistente" nel processo di elettrospinning. Infatti sarà la differenza di potenziale a consentire la creazione della fibra polimerica e non la pressione meccanica esercitata dalla pompa, la cui funzione è quindi solo quella di fornire nuova soluzione alla punta dell'ago man mano che questa viene elettrofilata e quindi sottratta all'ago stesso. Al livello dell'ago, infatti, fa capo uno dei due elettrodi collegati al generatore di corrente mentre il secondo elettrodo si trova al livello del collettore. Grazie alla presenza del campo elettrico si assiste, alla punta dell'ago, alla formazione di una goccia che si sviluppa poi formando il cono di Taylor quando la tensione superficiale della goccia viene controbilanciata dal campo elettrico applicato. Quando la differenza di potenziale è abbastanza forte da superare la tensione superficiale della goccia si osserva lo sviluppo di una fibra che è emessa dal cono e catturata al livello del collettore. La distanza tra l'ago ed il collettore è lo spazio utile per l'evaporazione del

solvente che comporta l'ottenimento, al collettore, di fibre asciutte di dimensione micrometrica o submicrometrica che si avvolgono sul collettore formando uno scaffold altamente poroso (**Fig. 14**).



**Figura 14. Processo di elettrospinning**

La formazione delle fibre, la loro morfologia ed il loro diametro, così come lo spessore dello scaffold risultante sono correlati a differenti parametri suddivisibili in tre categorie:

- ☉ Parametri di soluzione, quali conduttività, tensione superficiale e viscosità (direttamente correlata alla concentrazione polimerica),
- ☉ Parametro di processo, quali differenza di potenziale applicata, distanza tra ago e collettore, velocità del flusso di soluzione e campo elettrico indotto al livello del collettore,
- ☉ Parametri ambientali, quali temperatura e umidità.

Gli scaffold polimerici sono generalmente in grado di incorporare efficacemente varie tipologie di farmaci sia idrofili che lipofili semplicemente modulando la composizione

dello scaffold stesso. La sfida più ardua consiste, però, nel modulare il rilascio di farmaco in modo da ottenere, ad esempio, una cinetica di rilascio protratto, cosa che risulta particolarmente difficoltosa da ottenere soprattutto per farmaci idrofilici. Le tecniche di caricamento del farmaco sono molteplici (imbibizione, modifiche superficiali, co-elettrospinning, elettrospinning coassiale, inclusione di micro- e nanosistemi) e vengono opportunamente scelte in base alle caratteristiche chimico-fisiche del farmaco ed alle possibili interazioni farmaco/scaffold.

La tecnica dell'imbibizione consiste nell'immergere lo scaffold in una soluzione contenente il farmaco o nell'imbibirlo con piccoli volumi di soluzione e successiva evaporazione del solvente. Il farmaco risulta così adsorbito sulla superficie delle fibre polimeriche.

La superficie degli scaffold polimerici fibrillari può essere modificata chimicamente introducendo una vasta gamma di molecole bioattive.

Nel co-elettrospinning il farmaco è disciolto direttamente nella soluzione polimerica prima del procedimento di elettrospinning. L'efficienza di incapsulazione e la distribuzione del farmaco nello scaffold così come la cinetica di rilascio dallo stesso sono funzione delle interazioni farmaco/polimero e delle proprietà chimico-fisiche del polimero. Una bassa solubilità del farmaco può comportare una distribuzione non omogenea all'interno della soluzione polimerica così come una migrazione di farmaco verso la superficie delle fibre che può causare un indesiderato burst effect iniziale. Requisito essenziale per la scelta del co-elettrospinning è la compatibilità chimica e fisica di farmaco e polimero.

Il processo coassiale può essere utile per localizzare il principio attivo all'interno delle fibre prodotte. In questo modo il farmaco è protetto da uno shell polimerico che lo tutela dagli insulti ambientali.

L'elettrospinning in emulsione comporta la dispersione del farmaco in una soluzione polimerica prima dell'elettrospinning. La preparazione è analoga al co-elettrospinning, con la differenza che mentre nel co-elettrospinning farmaco e polimero sono entrambi in soluzione nell'elettrospinning in emulsione il farmaco è disperso e non solubilizzato. Questa tecnica porta alla formazione di una struttura core-shell che può comportare una cinetica di rilascio molto lenta in quanto il farmaco, per essere rilasciato, deve prima diffondere attraverso lo shell polimerico che funge da membrana di permeazione.

Altre tecniche comportano l'incorporazione di micro- e nanoparticelle in grado a loro volta di modulare il rilascio di farmaco al fine di ottenere una terapia ulteriormente protratta.

Il farmaco può essere rilasciato secondo differenti meccanismi che possono dipendere dalla metodica di caricamento. I principali meccanismi di rilascio del farmaco sono il desorbimento dalla superficie delle fibre, la diffusione attraverso le fibre e la degradazione delle fibre. Tutti questi meccanismi possono, inoltre, coesistere simultaneamente.

Tra i tre meccanismi menzionati quello del desorbimento può risultare in un veloce burst effect e non è in genere considerato utile per ottenere un rilascio protratto e controllato. Tuttavia esso è grandemente influenzato dalla solubilità del farmaco nei fluidi fisiologici. In genere la tecnica di caricamento per modifiche superficiali, specialmente fisiche, è la migliore per l'ottenimento di una cinetica di rilascio controllato. Un diverso tipo di meccanismo di rilascio comprende la diffusione del farmaco attraverso i canali e i pori delle fibre e dipende dal gradiente di concentrazione che si genera tra i vari canali intrascaffold e tra essi e il mezzo esterno nonché dal grado di diffusività e dalla via di diffusione (es. dimensione dei pori e degli spazi tra le fibre) (*Hadjiargyrou M et al. 2008; Gupta KC et al. 2014; Zhang Q et al. 2017*).

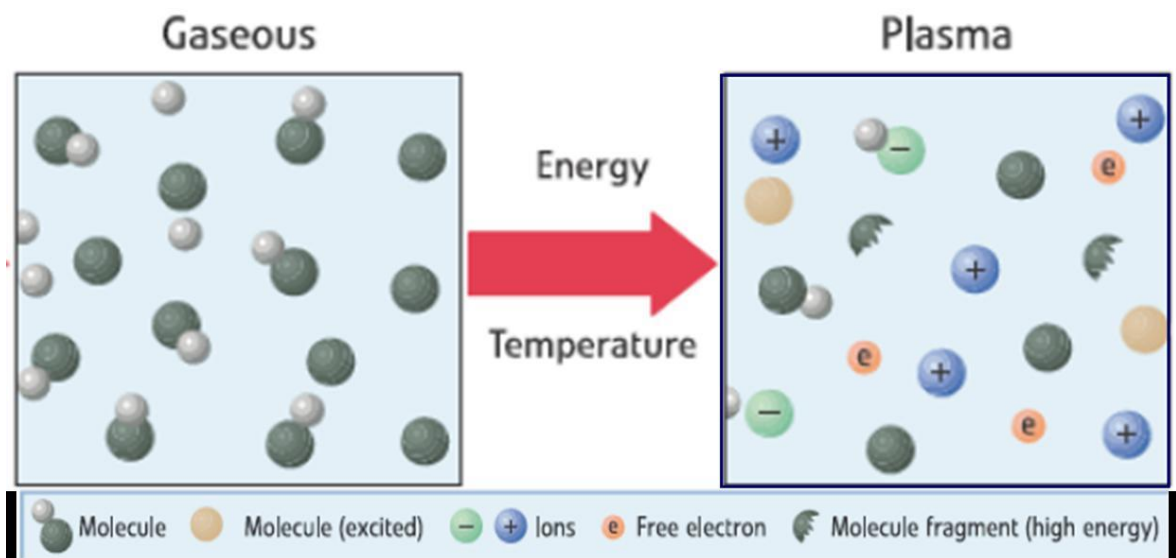
### **1.5.2 Funzionalizzazione Superficiale Plasma-Assistita**

Le caratteristiche superficiali degli scaffold sono cruciali nel determinare le proprietà del sistema e la sua efficacia.

Generalmente le tecniche di funzionalizzazione superficiale di uno scaffold prevedono procedure chimico-fisiche in eterofase che comportano l'impiego di solventi organici, catalizzatori chimici ed altre sostanze che, se non opportunamente rimosse, possono causare tossicità o flogosi. Per di più, non va dimenticato che le tecniche convenzionali di funzionalizzazione prevedono spesso come prerequisito l'esistenza, sulla superficie del materiale da funzionalizzare, di gruppi chimici reattivi da sfruttare opportunamente.

Una strategia alternativa ed innovativa che permette il superamento di tutti i limiti delle strategie convenzionali è rappresentata dal trattamento al plasma.

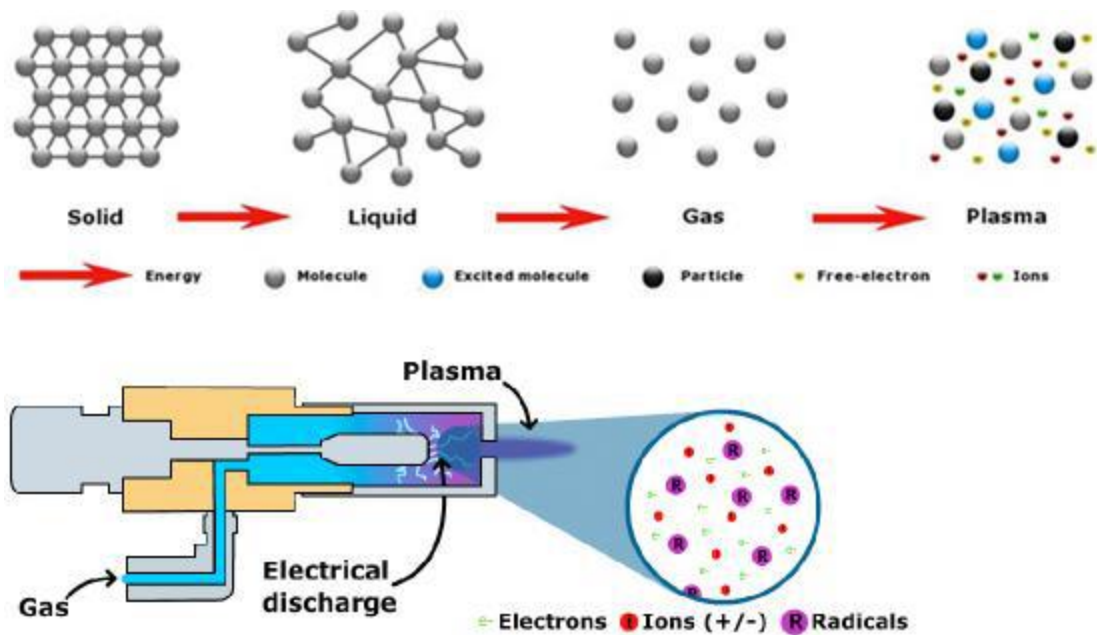
Il plasma è un gas ionizzato che contiene ioni positivi e negativi, radicali ed elettroni, globalmente neutro. In quanto tale, il plasma è considerato come il quarto stato della materia, che si distingue quindi dagli stati solido, liquido e aeriforme, mentre il termine "ionizzato" indica che una frazione significativamente grande di elettroni è stata strappata dai rispettivi atomi. Il termine plasma viene usato, quindi, per definire un insieme di particelle cariche che globalmente si mantiene neutro (**Fig. 15**). Questa definizione è comunemente accettata, anche se esistono sistemi particolari chiamati plasmi, costituiti da una sola specie.



**Figura 15. Composizione del plasma**

Procedendo, quindi, dallo stato solido a quello liquido, fino allo stato gassoso, lo stato di plasma costituisce un'ulteriore progressione nello stato energetico interno alla materia. Se nello stato gassoso le interazioni fra le singole particelle (per semplicità pensiamo ad un gas monoatomico, ad esempio un gas nobile come l'elio o l'argon) possono essere in prima approssimazione dovute all'effetto degli urti reciproci ed assolutamente casuali tra i singoli atomi, nel caso del plasma le interazioni fra le particelle sono a più lungo raggio e precedono di gran lunga un eventuale contatto o "urto" fra di esse. Nel plasma i movimenti di ogni particella elettricamente carica sono condizionali dalle altre particelle di carica uguale e di carica opposta anche lontane, e quindi non solo dalle particelle vicine. Comunque, in linea di principio i movimenti delle singole particelle sono influenzati da

tutte le altre particelle che compongono la massa. Il plasma si comporta quindi come un fluido unitario, nel suo insieme elettricamente neutro (**Fig. 16**).



**Figura 16. I quattro stati della materia e la formazione del plasma**

Il plasma è caratterizzato da alcune peculiarità che ne dettano il particolare comportamento.

Poiché è costituito da particelle elettricamente cariche, il plasma gode di due fondamentali proprietà:

- ☉ E' in grado di condurre una corrente elettrica (al contrario dei gas, che di solito sono considerati dei buoni isolanti);
- ☉ Interagisce con i campi elettromagnetici, sia attivamente perché è in grado di generarne (come d'altronde qualsiasi carica elettrica in movimento), sia passivamente, in quanto subisce gli effetti di campi elettromagnetici esercitati dall'esterno.

Analogamente ad un gas, il plasma non ha una forma definita, ma, contrariamente a un gas, non si può dire che assuma la forma del contenitore nel quale è posto.

Infatti, il plasma cessa di essere tale dal momento che entra in contatto con qualcosa, anche con le pareti di un eventuale contenitore. Quando questo avviene, infatti, almeno parte della carica elettrica, e sicuramente dell'energia, di ciascuna particella ionizzata viene facilmente scaricata sulle pareti del contenitore stesso.

Grazie ai campi elettromagnetici impartiti dall'esterno, il plasma può essere opportunamente "modellato" in diverse forme, come un filamento, un raggio, oppure un doppio strato con le particelle di carica opposta disposte in modo ordinato.

Essendo costituito da particelle cariche, i moti complessivi delle particelle del plasma sono in gran parte dovuti alle forze elettriche a lungo raggio che si vengono a creare continuamente e che, a loro volta, tendono a mantenere il plasma complessivamente neutro. Ciò comporta una importante differenza rispetto ai gas ordinari, nei quali invece i moti delle particelle sono dovuti a forze che si estendono al massimo fino a qualche particella di gas vicina.

Mediante trattamento al plasma le superfici possono essere attivate a seguito di processi di dissociazione causata dagli elettroni, ionizzazione ed eccitazione. Questa tecnologia è studiata fin dai primi anni '60 e trova applicazione in un moltitudine di processi quali pulizia, disinfezione, rivestimento, polimerizzazione, trattamento di membrane semipermeabili, dispositivi ottici e funzionalizzazione delle superfici.

Esistono due principali tipologie di reattori al plasma da laboratorio: quelli che operano ad alte temperature e quelli che lavorano a basse temperature, impiegando in genere forti campi elettromagnetici. In quest'ultimo caso il campo elettromagnetico, che può essere prodotto tramite corrente diretta, radiofrequenza o microonde, porta alla rimozione degli elettroni del gas (fenomeno noto come breakdown elettrico) in prossimità degli elettrodi. La presenza del campo elettrico, inoltre, comporta l'accelerazione di questi elettroni liberi promuovendone la collisione con altre molecole di gas. La collisione causa una perdita di energia detta rilassamento che genera raggi UV (fase glow) visibili come luce di colorazione violacea per tutta la durata del trattamento al plasma. Qualsiasi sostanza immersa nel plasma si trova quindi bombardata da specie ad elevata energia cinetica e potenziale con conseguente ottenimento di modifiche chimiche della struttura superficiale.

La tecnica a bassa temperatura offre numerosi vantaggi e possiede caratteristiche uniche che promuovono un aumento della attivazione catalitica, riduzioni delle emissioni e dell'inquinamento ambientale, alta distribuzione di specie altamente reattive, riduzione della richiesta energetica, ridotto tempo di operazione. Risulta quindi superiore ad altri approcci in termini di facilità, efficienza e basso costo.

Può apportare opportune modifiche alle superfici trattate senza modificarne o distruggerne l'integrità né le principali caratteristiche e proprietà. Per di più è possibile



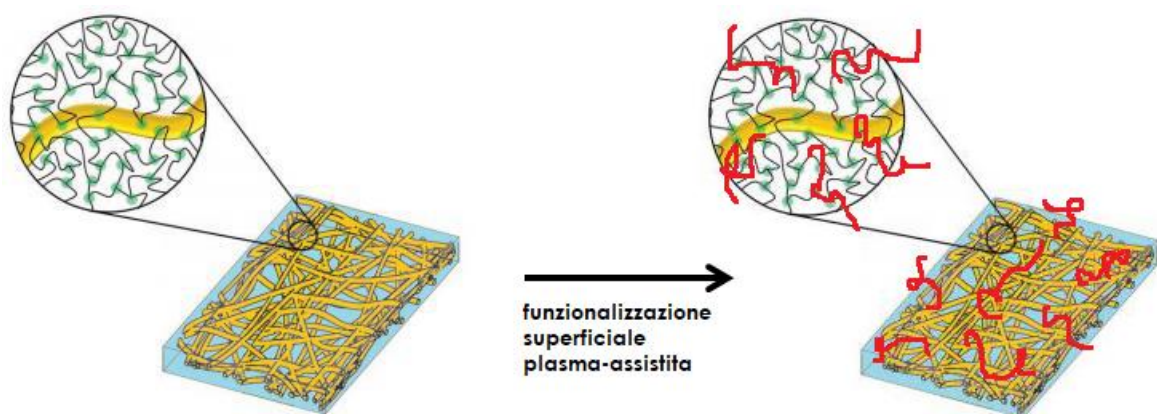
impiegare differenti tipologie di gas tra cui gas inerti, ossidativi e riducenti e diverse sorgenti generanti il plasma al fine di ottenere un plasma più attivo e forte.

In generale, nei reattori che operano a bassa temperatura, il plasma può essere generato mediante due metodi:

- ☉ Metodo capacitivo. Un condensatore produce un campo elettromagnetico in grado di ionizzare il gas. È il metodo più blando, più controllabile e più riproducibile.
- ☉ Metodo induttivo. Un filo metallico si trova al centro della camera che ospita il campione da trattare al plasma. Attraverso tale filo metallico è fatta passare una corrente che consente la generazione di un campo elettrico puro in grado di ionizzare il gas. Tale metodo è più aggressivo e meno controllabile, inoltre a causa della strutturazione dell'apparecchio, il campo elettrico investe anche il campione da trattare col plasma che, di conseguenza, può essere “danneggiato”.

Il trattamento al plasma può essere condotto a pressione atmosferica, a pressione elevata o in condizioni di vuoto. In quest'ultimo caso le condizioni sono in genere più controllabili e riproducibili.

Le caratteristiche delle tecniche a bassa temperatura comportano la possibilità di impiego del plasma per la sintesi di differenti tipi di nanomateriali, le modifiche su strato sottile, l'attivazione superficiale e l'inserimento di gruppi reattivi per consentire il grafting superficiale con opportune molecole.



**Figura 17. Funzionalizzazione superficiale plasma-assistita di uno scaffold fibrillare**

La tipologia di gruppi reattivi inseriti sulla superficie trattata al plasma varia al variare del gas impiegato (es.  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ) e comporta la modifica della struttura chimica

superficiale a seguito di reazioni di addizione ai doppi legami, estrazione di idrogeno o inserimenti in legami C-H e C-C. Ad esempio, impiegando azoto possono essere inseriti gruppi amminici, impiegando ossigeno possono essere inseriti gruppi ossidrilici o epossidici, impiegando anidride carbonica possono essere inseriti carbonili aldeidici e chetonici o carbossilici ecc... I gruppi reattivi inseriti sono, però, ad alta energia e risultano, pertanto, instabili, tendendo di conseguenza a decadere velocemente. Possono essere, però, fissati se impiegati per reazioni ulteriori di funzionalizzazione o grafting che dovrebbero essere condotte immediatamente dopo il trattamento al plasma, cioè prima che i gruppi inseriti decadano. È importante ricordare e precisare che l'inserimento di questi gruppi funzionali reattivi avviene solo in superficie senza, quindi, intaccare o alterare le proprietà di bulk del materiale.

La funzionalizzazione o grafting plasma assistita è, quindi, una procedura che avviene in due step. Inizialmente il materiale da funzionalizzare è trattato opportunamente col plasma e, subito dopo, è indotta la reazione di grafting tra la superficie attivata e il reagente scelto. Tale reazione può avvenire in fase gassosa, introducendo un reagente gassoso nella camera del reattore al plasma dopo allontanamento del plasma stesso, o in eterofase, immergendo il campione trattato al plasma nell'opportuna soluzione di reazione (**Fig. 17**) (*Pappa AM et al. 2015; Wang X et al. 2016*).

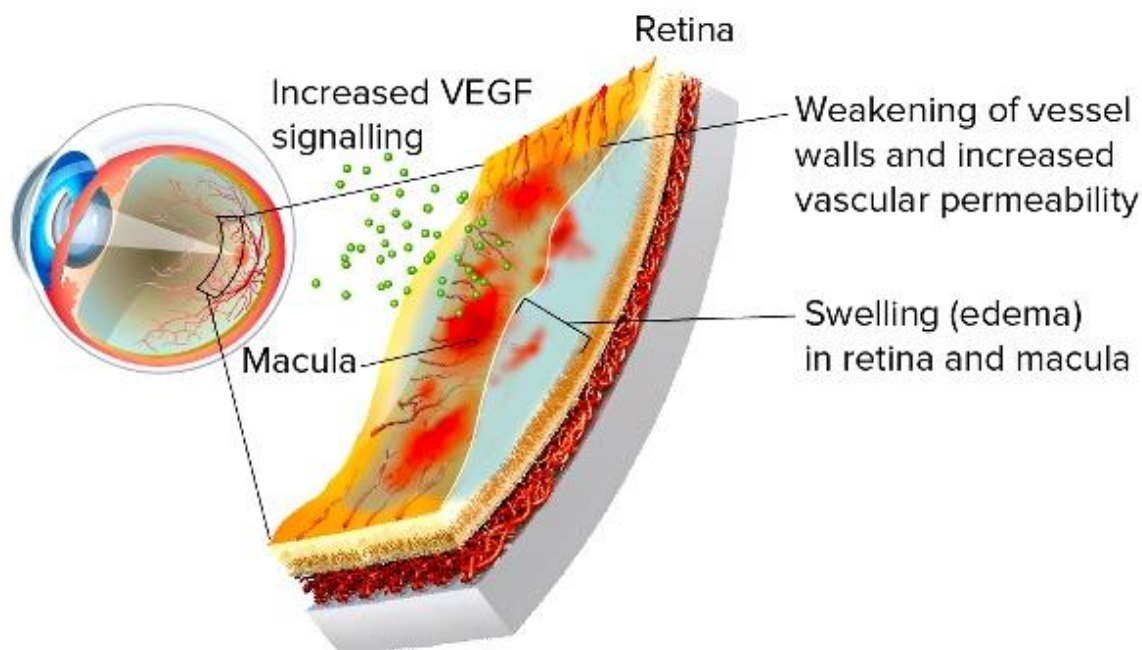
## **1.6 Principali Patologie Degenerative Retiniche e Loro Trattamento**

Circa il 55% delle patologie oculari maggiormente debilitanti colpisce il segmento oculare posteriore.

Per combattere o almeno limitare la perdita della vista indotta da tali patologie, considerevoli sforzi continuano ad essere fatti nel campo della ricerca oftalmica, soprattutto considerando il fatto che l'incidenza delle neuropatie degenerative ottiche è in continuo aumento, parallelamente al continuo aumento dell'età media della popolazione. Le principali cause di deficit visivi o cecità irreversibile sono, come già detto, le patologie del segmento oculare posteriore, tra cui la degenerazione maculare legata all'età (DMLE), la retinopatia diabetica (RD), l'edema maculare diabetico (EMD) o secondario ad occlusione della vena retinica, le retiniti da citomegalovirus, l'uveite posteriore, e la retinite pigmentosa.

Nei paesi industrializzati la principale causa di cecità 100 anni era costituita dalle patologie corneali, 50 anni fa dalla cataratta e adesso dalla DMLE.

Processi infiammatori, angiogenetici e fibrotici causano il danno tissutale che conduce a perdita della vista (**Fig. 18**). L'aumento di conoscenza circa i meccanismi molecolari delle patologie precedentemente menzionate ha permesso, negli anni, lo sviluppo di principi attivi *ad hoc* spesso di natura proteica tra cui farmaci a base di anticorpi. Tuttavia è ancora lunga la strada che conduce allo sviluppo di una terapia di successo a 360 gradi in quanto oltre all'efficacia del farmaco di per sé devono essere valutati anche altri importanti fattori come il costo del principio attivo, la frequenza di somministrazione necessaria e la compliance del paziente.



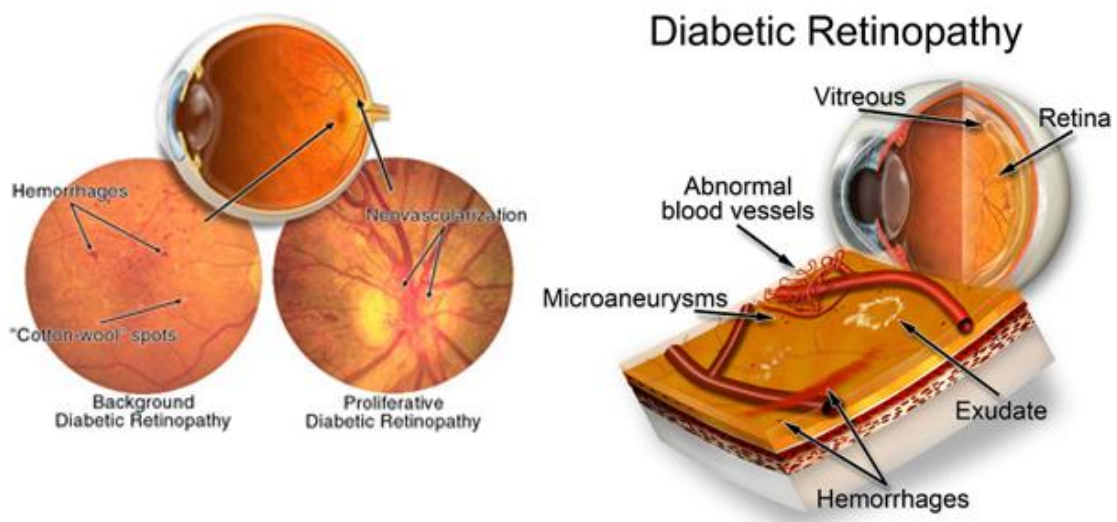
**Figura 18. Neoangiogenesi patologica alla base dei processi di degenerazione retinica**

Come già detto, comunque, comprendere la fisiopatologie delle malattie degenerative del segmento oculare posteriore è il primo passo per la realizzazione di strategie terapeutiche di successo.

Si tratteranno, dunque, adesso nello specifico le principali patologie degenerative retiniche quali la RD con conseguente EMD e la DLME.

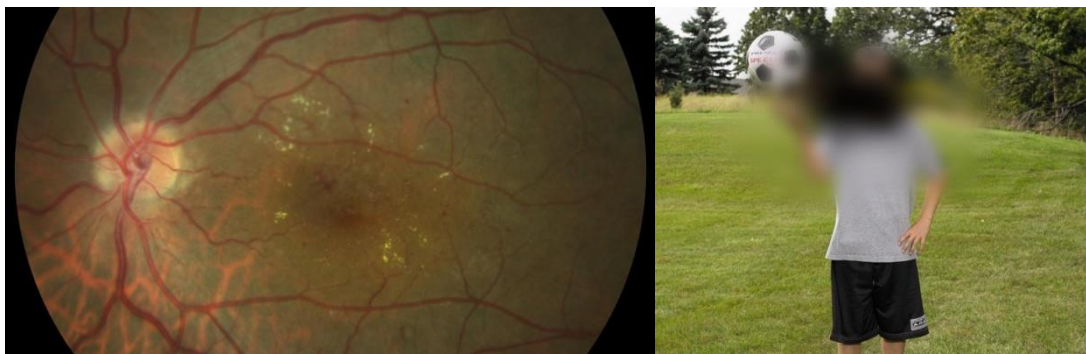
Le stime sulla prevalenza mondiale di diabete mellito promettono un drammatico incremento nei prossimi decenni, da 382 milioni di persone nel 2013 a 592 milioni nel 2035. In particolare il diabete mellito di tipo 2 ha già raggiunto livelli epidemici mentre l'incidenza del diabete mellito di tipo 1 è in continuo aumento. I pazienti con diabete risentono di diverse complicazioni tra cui ictus macrovascolari, ischemie cardiache, alterazioni alle arterie periferiche, retinopatie, neuropatie e nefropatie legate ad alterazioni del microcircolo. La retinopatia diabetica (RD) è la più comune complicanza microvascolare del diabete mellito. Sebbene alcuni recenti studi suggeriscano che l'incidenza dei deficit visivi legati a RD sia diminuita negli ultimi anni in US grazie ai miglioramenti nel controllo sistemico della glicemia, la RD resta un problema globale ed in continua crescita. Attualmente la RD colpisce almeno 100 milioni di persone in tutto il mondo e si pensa che diventerà una patologie sempre più incidente in quanto, come è già stato osservato, tra il 1990 e il 2010 i disturbi visivi e la cecità correlate a RD sono

aumentati rispettivamente del 64% e del 27%. Sulla base delle loro ovvie manifestazioni durante la progressione dell'RD, le lesioni microvascolari sono state utilizzate come principale criterio per la valutazione e la classificazione della RD. Tuttavia, le modifiche indotte da diabete si verificano anche in tipologie cellulari oculari non vascolari ed anche queste alterazioni giocano un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione della RD, insieme alle alterazioni vascolari. Possono essere distinte due forme di RD: le prime fasi di RD non proliferante e gli stadi avanzati di RD proliferante (**Fig. 19**). La RD non proliferante è caratterizzata da alterazioni dei capillari retinici con conseguente rilascio di essudati che provocano edema retinico, emorragie ripetute e accumulo di grassi e proteine (essudati duri). L'occlusione dei capillari causa ischemia che favorisce il passaggio alla forma proliferante. In questa forma l'ipossia tissutale stimola la neoangiogenesi. Tuttavia, i fragili neovasi che si formano vanno incontro a ripetuti processi emorragici con formazione di tessuto cicatriziale che contraendosi spontaneamente e progressivamente può causare distacco retinico parziale o totale. La classificazione della forma non proliferante si attua in base a marcatori visibili come microaneurismi, emorragie retiniche, anomalie vascolari intraretiniche e alterazioni del calibro venoso. La forma proliferante, invece, è caratterizzata da neovascolarizzazione patologica preretinica.



**Figura 19. Le due forme di retinopatia diabetica: non proliferante e proliferante**

È importante valutare e definire, durante la diagnosi, se la RD è già progredita in edema maculare diabetico (EMD), la conseguenza più seria e frequente della RD che si può verificare a vari stadi di progressione della RD sia essa in forma non proliferante che proliferante. L'EMD è la principale causa di cecità legata a RD (**Fig. 20**). L'insorgenza dell'EMD è legata alla possibilità che, in corso di diabete, si verifichi rottura della BRB con conseguente stravasamento di fluidi e proteine ematiche a livello della zona perifoveale con conseguente espansione degli spazi extracellulari e/o intracellulari della macula. Questo può comportare ispessimento retinico e, spesso, edema cistoide della macula.



**Figura 20. Alterazione retinica in corso di edema maculare diabetico e conseguente deficit visivo**

Sono molte le caratteristiche sistemiche del diabete mellito che influenzano la RD. Ad esempio, l'iperglicemia è indissolubilmente legata allo sviluppo di RD. L'importanza del mantenimento della glicemia fin da subito una volta diagnosticato il diabete è stata enfatizzata da studi preclinici e clinici che valorizzano l'impatto a lungo termine di un intensivo controllo della glicemia. Sebbene l'iperglicemia da sola sia già responsabile delle manifestazioni di un diabete scarsamente controllato, tuttavia il concetto di memoria metabolica è ancora oggetto di studio. I fenomeni di memoria sono stati supportati da studi in vivo su modelli animali di retinopatia diabetica sottoposti dapprima a iperglicemia e, in seguito, ricondotti a normoglicemia. L'iperglicemia pregressa scatena fenomeni di stress ossidativo con conseguente alterazione di alcuni fattori di trascrizione e conseguenti alterazioni degli enzimi responsabili delle catene di trasporto degli elettroni. È stato osservato che tali modifiche perdurano negli animali anche dopo che la loro glicemia è stata normalizzata. Anche la dislipidemia e l'ipertensione possono indurre RD, sebbene nel contesto di pazienti individuali, l'associazione tra concentrazione plasmatica di lipidi,

lipoproteine e RD non è sufficientemente marcata al punto da definire un rischio di sviluppo di retinopatia. L'ipertensione è stata comunque correlata ad un aumento del rischio di RD e, in alcuni casi, i pazienti trovano giovamento nel trattamento con antiipertensivi.

I marcatori microvascolari della RD non proliferante includono emorragie intraretiniche, microaneurismi, anomalie del calibro venoso, formazione di anomalie microvascolari intraretiniche, essudato di lipidi dai vasi danneggiati, alterazioni nella perfusione dei capillari con conseguente infarto neuronale e successiva neovascolarizzazione retinica. Molti processi patologici vascolari retinici nella RD hanno un impatto diretto sulla visione. Nella forma non proliferante, infatti, una graduale mancata perfusione della circolazione retinica caratterizzata da perdita dell'integrità vascolare, porta in definitiva alla occlusione e/o degenerazione dei capillari. La localizzazione dei capillari non perfusi porta alla creazione di aree ischemiche con deficit di ossigeno e danno metabolico retinico. La progressione della mancata perfusione capillare e la risultate ischemia generale portano alla progressione nella forma proliferante che si raggiunge a causa della prolungata condizione di ipossia e conseguente espressione di fattori di crescita proangiogenetici che stimolano la formazione aberrante di nuovi vasi sanguigni che, dalla retina, protrudono negli spazi preretinici. La neovascolarizzazione retinica può portare a serie alterazioni visive quando comporta emorragie a livello del vitreo o trazione retinica con conseguente distacco.

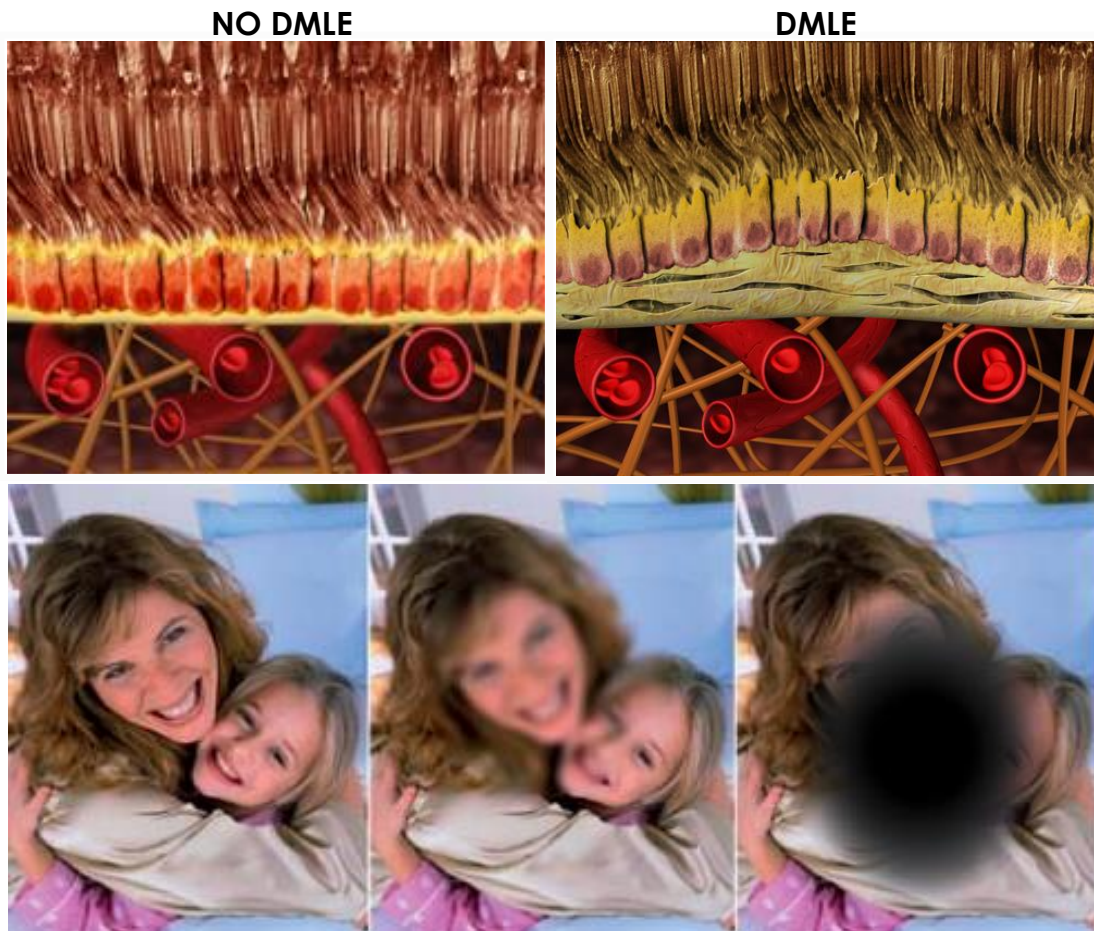
Un mistero nella RD e nelle altre patologie retiniche di natura ischemica è la mancanza improvvisa di rivascularizzazione della retina ischemica nonostante la severa ipossia comporti uno stimolo che aumenta la produzione di fattori di crescita proangiogenetici. Infatti, in corso di diabete, la retina sembra sfavorire processi angiogenetici realmente volti alla rivascularizzazione, mentre favorisce processi di neoangiogenesi anomali, possibilmente a causa di vari fattori patologici. Più recentemente, le evidenze scientifiche portano a pensare che tra le molecole principalmente coinvolte vi siano le semaforine, una classe di proteine originariamente implicata nella crescita assonale. Alcune semaforine regolano l'angiogenesi e molte di esse sono specificatamente implicate nella soppressione della rivascularizzazione della retina ischemica comportando la formazione di neovasi patologici che protrudono verso il vitreo. Dato che la stimolazione dei fattori proangiogenetici nella RD porta di fatto solo allo sviluppo di neovascolarizzazione

patologica preretinica piuttosto che a un benefica rivascularizzazione retinica, molti sforzi sono stati fatti nelle ultime decadi per identificare i principali fattori di crescita coinvolti, come il VEGF e nello sviluppare opportuni trattamenti anti-VEGF che sono emersi come efficaci trattamenti per questo tipo di patologia. Tuttavia anche altri pathway proangiogenetici sono coinvolti e potrebbero gettare le base per il design di ulteriori efficaci strategie terapeutiche (mirate, ad esempio, al fattore di crescita placentare, all'eritropoietina ecc...). Le modalità di trattamento intraoculare per i disordini oculari derivati dal diabete includono la fotocoagulazione laser, l'iniezione intravitreale di fattori anti-VEGF e steroidi e la chirurgia vitreoretinica. Gli attuali paradigmi terapeutici mirano, però, al trattamento solo di patologie in stadio avanzato come la RD proliferante o l'EMD.

Lo stato patologico di una retina in corso di RD è caratterizzato da disfunzione vascolare e perdita dei capillari retinici. Sebbene questi siano senza dubbio fattori critici nello sviluppo della patologie, come risulta evidente dall'impatto che ha sulla vista il trattamento con anti-VEGF, oggi giorno sta emergendo la concezione che si verifichi anche una vera e propria neuropatia a livello retinico forse ancor prima che inizi a venir meno la perfusione. Un ruolo importante nella fisiopatologia della RD è giocato anche dalle cellule immunitarie e dall'infiammazione nella RD. La regolazione delle cellule immunitarie ed il controllo dell'infiammazione sono, infatti, importantissimi per il normale e sano funzionamento retinico. L'infiammazione cronica a breve termine contribuisce all'avvio ed alla progressioni di tipologie patologiche multiple. L'infiammazione ha un ruolo chiave nella progressione della RD. Con il progredire dei diabete, la retina è attiva cronicamente le cellule immunitarie e produce molecole proinfiammatorie. Un fattore cruciale è l'aumentata espressione di citochine proinfiammatorie e fattori di crescita. Per esempio, il peptide proinfiammatorio VEGF di cui si è già discusso. Tuttavia alcuni pazienti con EMD non rispondono bene al trattamento con anti-VEGF e questo suggerisce che nel quadro patologico e infiammatorio cronico esso non sia l'unico attore protagonista (*Duh EJ et al. 2017*).

La degenerazione maculare legata all'età (DMLE) è una patologia della macula caratterizzata da un progressivo deficit visivo legato a neurodegenerazione con esordio tardivo dei fotorecettori e dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) (**Fig. 21**).

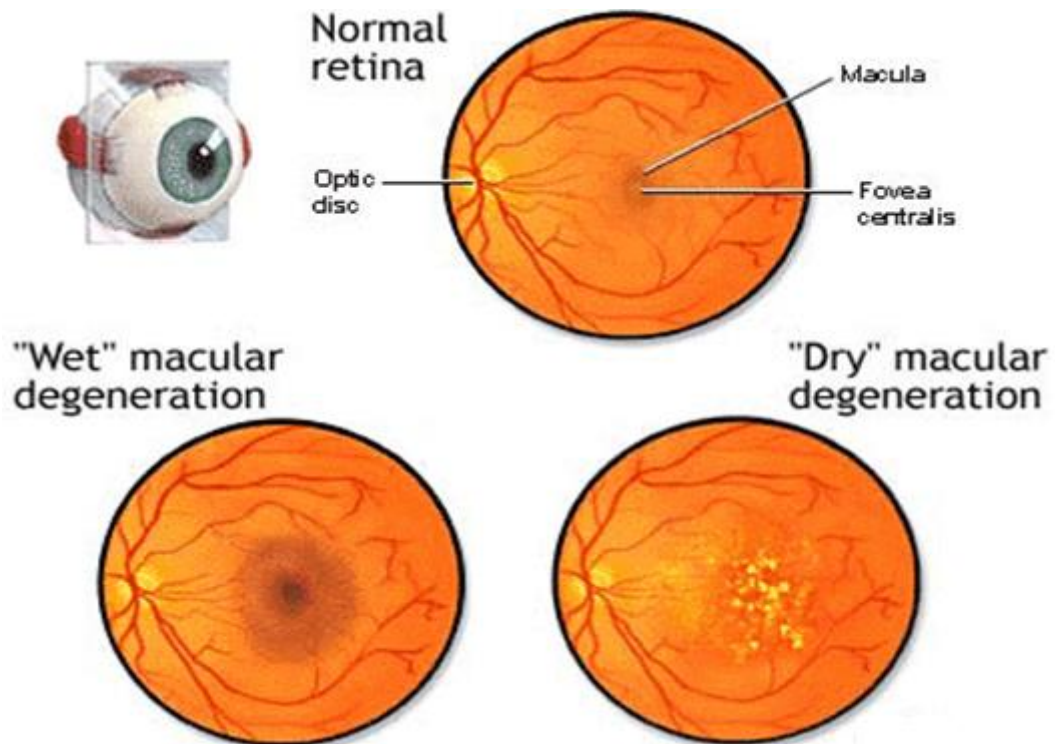




**Figura 21. Alterazioni retiniche in cordo di DMLE e conseguente progressione del deficit visivo nel tempo**

È la principale causa di perdita della vista centrale bilaterale nei paesi industrializzati e colpisce circa il 10% delle persone di età superiore a 65 anni e più del 25% delle persone di età superiore a 75 anni. Solo in US, 2 milioni di persone hanno la DMLE conclamata e più di 8 milioni di persone sono affette da una forma intermedia di tale patologia. Secondo le stime, questi numeri sono destinati ad aumentare almeno del 50% entro il 2020. Le cellule dell'RPE non si dividono e svolgono numerose funzioni essenziali per il mantenimento dell'integrità dei fotorecettori. L'RPE, durante l'invecchiamento, va incontro a differenti modifiche che possono portare alla formazione di accumuli extracellulari gialli chiamati drusen, costituiti da materiale polimorfo e clinicamente visibili, che vengono a trovarsi all'interfaccia tra l'RPE e la fascia di collagene interna della membrana di Brunch. La presenza di drusen a livello maculare è il tipico marker della DMLE. Tuttavia, soggetti con piccoli drusen in assenza di ulteriori anomalie oculari, hanno solo un piccolo rischio di sviluppare la patologia. Esiste un'ampia variabilità di possibilità cliniche in termini di

caratteristiche dei drusen e alterazioni della pigmentazione come iperpigmentazione e ipopigmentazione che possono essere osservate in individui con DMLE. Varie patologie come il distacco focale dell'RPE, l'atrofia dell'esterno della retina e neoangionesi tra la membrana di Brunch e la retina possono progredire nelle cosiddette atrofia geografica o neovascolarizzazione coroideale che sono anche note rispettivamente come DMLE secca e umida (**Fig. 22**).



**Figura 22. Degenerazione maculare legata all'età: forma umida vs forma secca**

La DMLE secca o atrofica è la forma più frequente (80% dei casi) ed è caratterizzata da un progressivo assottigliamento della retina centrale (in particolare RPE e fotorecettori) che, lentamente, si atrofizza. In particolare le cellule dell'RPE eliminano i frammenti apicali dei fotorecettori invecchiati, tuttavia, col passare degli anni si osserva un accumulo di residui non digeriti a livello citoplasmatico con conseguente alterazione vascolare che comporta il passaggio alla forma umida (circa il 10-20% dei casi). La DMLE umida o essudativa o neovascolare è la forma meno frequente (20% dei casi), ma caratterizzata da una progressione più rapida. L'alterata vascolarizzazione comporta uno stimolo vaso-proliferativo che porta a neovascolarizzazione coroideale (CNV). I neovasi formati

stravasano attraverso la membrana di Bruch e si estendono al di sotto della retina, sollevandola. A causa della loro morfologia immatura, i neovasi possono rilasciare essudati che danneggiano le cellule fotorecetrici o possono rompersi con conseguenti emorragie retiniche che comportano rapida distruzione dei fotorecettori, formazione di cicatrici sub-retiniche e distacco di retina.

La classificazione della DMLE si definisce in base alla presenza di caratteristiche peculiari quali drusen, atrofia e neovascolarizzazione. I drusen sono classificati come piccoli (diametro  $<63 \mu\text{m}$ ), medi (diametro  $64-124 \mu\text{m}$ ) e grandi (diametro  $>125 \mu\text{m}$ ). La classificazione è la seguente: assenza di DMLE se ci sono meno di 5 drusen piccoli, DMLE lieve se sono ritrovati tanti drusen piccoli o almeno un drusen medio, DMLE moderata se ci sono molti drusen medi, più di un drusen grande o se c'è atrofia geografica non centrale, DMLE avanzata caratterizzata da atrofia geografica centrale o neovascolarizzazione coroidale con conseguente perdita della vista.

L'esatta fisiopatologia della DMLE non è ancora del tutto nota. È ritenuto che la patogenesi della DMLE sia il risultato di una complessa interazioni multifattoriale tra fattori metabolici, funzionali, genetici ed ambientali. Con l'avanzare dell'età, si formano residui intracellulari costituiti da lipofuscine che si accumulano al livello dell'RPE. L'RPE esprime, quindi, del materiale che normalmente dovrebbe essere eliminato dalla coriocapillare, tuttavia dato che la disfunzione dell'RPE progredisce, questo comporta un'alterazione della permeabilità della membrana di Bruch con conseguente accumulo dei materiali rilasciati (che formano così i drusen) tra i due strati. La comparsa dei drusen può comportare un inspessimento dello strato collagene della membrana di Bruch legato ad una degenerazione dell'elastina e del collagene ivi presenti con successiva calcificazione. Inoltre, è stato osservato che i capillari della coriocapillare nei soggetti affetti da DMLE si assottigliano e questo potrebbe contribuire al declino della metabolizzazione ed eliminazione del materiale extracellulare che porta alla formazione dei drusen.

Un fattore di rischio certo per lo sviluppo di DMLE è la storia familiare. Inoltre, la formazione dei drusen può avere effetti stimolatori sulla cascata dell'infiammazione la quale potrebbe essere cruciale nella progressione della patologia. La formazione dei drusen è indice di una disfunzione dell'RPE che comporta perdita delle cellule dell'RPE stesse con successiva perdita dei fotorecettori. La degenerazione dell'RPE ha come conseguenza la disfunzione della membrana di Bruch. Un progressivo danno alla membrana di Bruch

insieme con un up-regulation del VEGF promuove la crescita di vari coroideali anormali al di sotto l'RPE. Inizialmente questi vari anormali possono andare incontro a stravaso subretinico che può dar vita ad un'emorragia prima che essi regrediscano formando una cicatrice discoidale. Di conseguenza la situazione visiva di una DMLE umida in stadio avanzato è una perdita della vista centrale.

I principali fattori di rischio sono i seguenti:

- ☉ Età. È infrequente lo sviluppo della patologia in soggetti al di sotto dei 50 anni. Il rischio aumenta di più di tre volte in soggetti di età superiore ai 75 anni. La DMLE è, inoltre, riscontrata nel 30% dei soggetti di età superiore agli 85 anni.
- ☉ Etnia.
- ☉ Familiarità e Genetica.
- ☉ Stile di vita, dieta e nutrizione. Il fumo può avere un'influenza variabile come fattore di rischio. Un ampio consumo di alcuni grassi come acidi grassi saturi, acidi grassi trans e acidi grassi omega-6 è stato associato ad un aumento della prevalenza di DMLE mentre i grassi monoinsaturi hanno dimostrato un effetto protettivo.
- ☉ Altri fattori di rischio. Il rischio di sviluppare DMLE in età avanzata, in particolare la forma umida, è aumentato in soggetti che sono stati sottoposti ad interventi di cataratta. Ulteriori fattori di rischio sono l'obesità addominale, specialmente negli uomini, l'iperlipidemia, i disturbi cardiovascolari, la colorazione chiara dell'iride, lo stato ormonale, l'uso di alcool, lo stato delle vitamine B e D, elevati livelli di proteina C reattiva e l'ipermetropia.

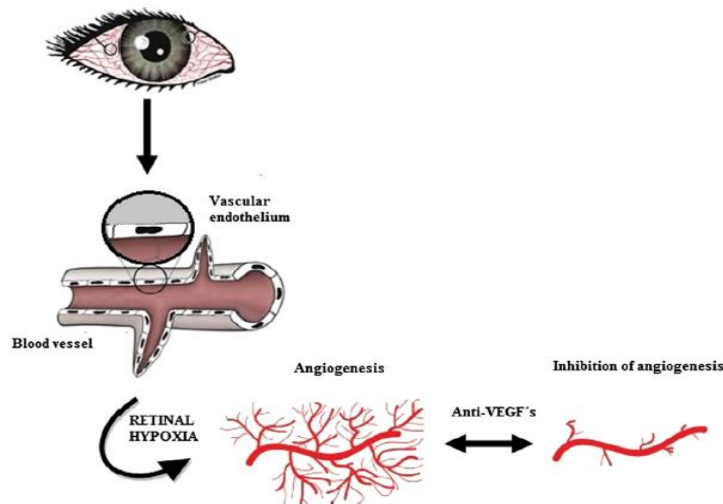
Il trattamento della DMLE umida ha subito differenti avanzamenti durante gli ultimi decenni. Negli anni '70 è emersa l'efficacia della fotocoagulazione laser che, comunque, non è considerata la strategia terapeutica d'elezione per il trattamento delle lesioni subfoveali. Nell'era della terapia anti-VEGF la fotocoagulazione è, quindi, impiegata solo per il trattamento di piccole lesioni a livello non centrale. Nel trattamento della forma secca, invece, talvolta sono somministrati dei supplementi nutrizionali come zinco e antiossidanti (*Al-Zamil et al. 2017*).

### **1.6.1 Farmaci Anti-VEGF**

Per preservare la struttura e la funzionalità retiniche è cruciale prevenire le anomalie primarie della vascolarizzazione.

Solo una decina di anni fa, i trattamenti oculari per le patologie degenerative retiniche erano limitati ed erano, alla meglio, la laser terapia che tratteremo in seguito.

Con l'incremento delle conoscenze circa la fisiopatologia delle malattie retiniche e il conseguente avvento dei farmaci anti-VEGF il trattamento di tali patologie è stato significativamente migliorato in termini di stabilizzazione ed a volte miglioramento dello stato patologico e della visione. (Fig. 23)



**Figura 23. Azione farmacologica degli anti-VEGF**

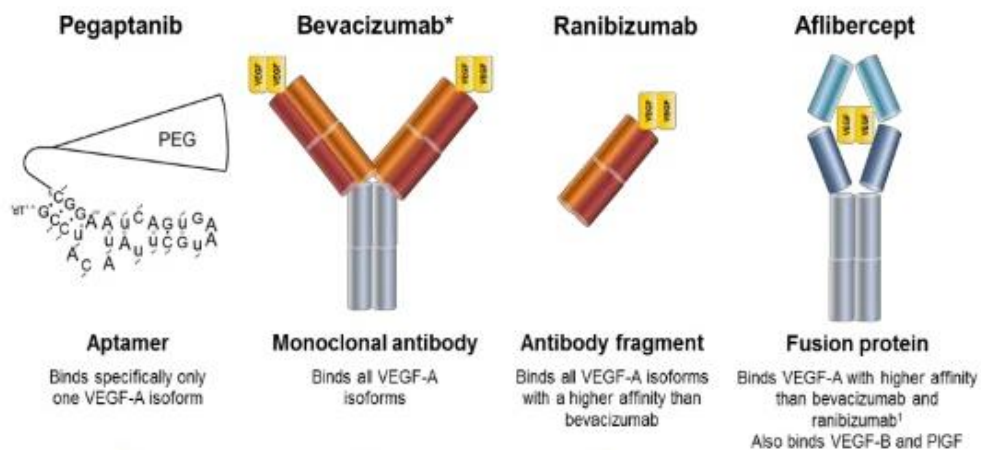
Il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) è una proteina omodimerica di 35-45 kDa ed esiste in diverse isoforme, di queste l'isoforma VEGF-165 sembra la più coinvolta nei processi di neoangiogenesi patologica retinica. Il VEGF è un fattore proangiogenetico specifico per le cellule endoteliali ed anche un fattore di permeabilità vascolare, la cui produzione è incrementata dall'ipossia.

Tra i farmaci anti-VEGF più utilizzati ricordiamo (Fig. 24):

- ☉ Pegaptanib. È un piccolo RNA oligonucleotidico, un aptamero in grado di legarsi selettivamente all'isoforma VEGF-165 inibendola e riducendo, così, l'angiogenesi patologica. È ben tollerato nell'uomo e ha emivita intravitreale di 10 giorni. (Moshfeghi AA et al. 2005)
- ☉ Ranibizumab. È il frammento Fab di un anticorpo monoclonare ricombinante umano con alta affinità sia per le isoforme solubili che per quelle tissutali di VEGF A (Ferrara N et al. 2003; Schmidt-Erfurth UM et al. 2007). A seguito di iniezione intravitale è in grado di penetrare efficacemente a livello retinico riducendo la

neovangiogenesi sia a livello della retina che della coroide (*Gaudreault J et al. 2005; Husain D et al. 2005*). È caratterizzato da tempo di emivita intravitreale breve (2-4 giorni) ed alta clearance sistemica, che gli conferisce una sicurezza sistemica estremamente elevata. Oggigiorno, in monoterapia è lo standard di riferimento (*Zayit-Soudry S et al. 2010*).

- ☉ Bevacizumab. È un anticorpo monoclonare ricombinante che lega tutte le isoforme di VEGF, inizialmente progettato per inibire l'angiogenesi e la crescita tumorale (*Cilley JC et al. 2007*). Tuttavia, somministrato per via sistemica comporta aumento dei rischi di eventi cardiovascolari, ictus e sanguinamento gastrico (*Stefanadis C et al. 2012*). Ha emivita intravitreale di 5-6 giorni (*Schmidt-Erfurth U et al. 2014*);
- ☉ Aflibercept. È una proteina chimerica che lega le isoforme VEGF A e B (*Holash J et al. 2002; Papadopoulos N et al. 2012*).



**Figura 24. I più comuni anti-VEGF utilizzati in campo oftalmico**

Rispetto alla fotocoagulazione gli anti-VEGF sono più efficienti specialmente in individui che hanno già sviluppato EMD inoltre essi hanno meno effetti avversi, ad esempio riducono la perdita di visione periferica, riducono la velocità di progressione della EMD e allontanano la necessità dell'intervento chirurgico. Nonostante questi benefici, la somministrazione di questi farmaci al segmento oculare posteriore è però particolarmente difficoltosa. Infatti l'unica modalità di trattamento, oggigiorno, è costituita dalle iniezioni intravitreali. Inoltre gli anti-VEGF necessitano somministrazioni ripetute con cadenza generalmente mensile con conseguenti effetti collaterali e drammatica riduzione della



clearance dei pazienti, come precedentemente visto. Gli anti-VEGF, quindi, non vanno bene per pazienti che non possono attenersi allo stretto regime di iniezioni mensili necessario per un adeguato ed efficace trattamento. Inoltre, una buona percentuale di pazienti con DME (40-50%) non risponde bene ai trattamenti con anti-VEGF.

In ogni caso, sebbene le attuali terapie siano abbastanza efficaci nel prevenire la perdita di vista o risultino in grado di favorire un aumento della capacità visiva in pazienti, sarebbe necessario lo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche non invasive, non distruttive e a lunga durata d'azione (*Awwad S et al. 2017*).

Un'importante fattore da considerare consiste nel fatto che i principali limiti dei farmaci sopra menzionati, e generalmente impiegati nel trattamento delle patologie retiniche, sono costituiti dal loro costo e dai problemi derivanti dalla loro somministrazione. Entrambi questi grossi limiti sono legati alla natura chimica di questi farmaci. Come visto, si tratta per lo più di farmaci di natura proteica (anticorpi monoclonali o frammenti anticorpali) così come anche di sequenze oligonucleotidiche. La somministrabilità di queste molecole per via oftalmica risulta limitata e praticamente obbligata e vincolata alla via iniettiva intravitreale a causa delle caratteristiche chimico-fisiche di tali farmaci. Sono infatti principi attivi dotati di elevato peso molecolare o di una carica netta e quindi impossibili da somministrare per via topica in quanto assolutamente non in grado di attraversare le membrane biologiche, specialmente membrane complesse come la cornea.

In questo contesto, può risultare un approccio vincente l'impiego di farmaci molecolari dotati comunque di attività biologica anti-VEGF ed è in questo scenario che può essere introdotto l'uso dell'imatinib.

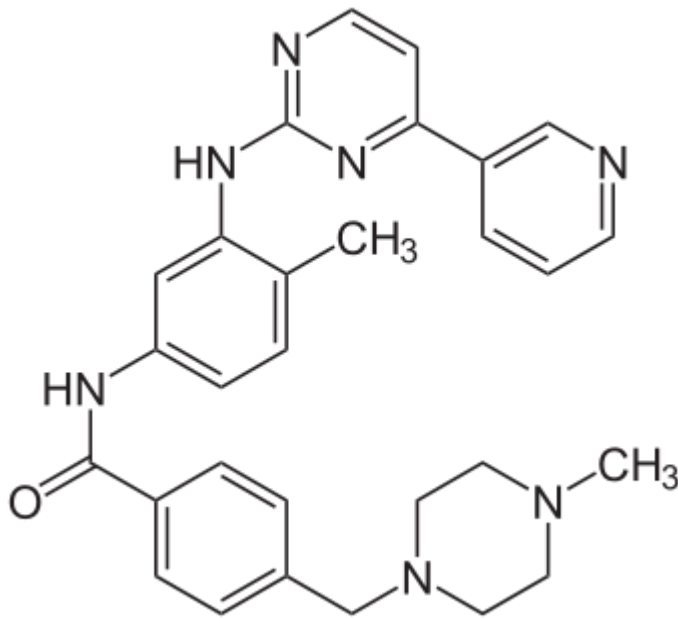
L'imatinib è un derivato della 2-fenilaminopirimidina ad azione bloccante sulle tirosin-chinasi approvato dall'FDA per il trattamento della leucemia mieloide cronica. L'uso off-label di imatinib in campo oftalmico è legato al suo meccanismo d'azione ad ampio spettro che può, indirettamente portare ad attività anti-VEGF.

L'imatinib (**Fig. 25**) agisce, infatti, bloccando il dominio citoplasmatico della tirosin-chinasi Bcr-Abl mediante antagonismo competitivo dell'ATP al livello del sito catalitico. L'imatinib inibisce inoltre il recettore c-Kit, il recettore per il fattore di crescita piastrinico (PDGF) ed il recettore per il fattore delle cellule staminali. Tale cross-reattività è da attribuirsi all'alto grado di omologia fra i domini catalitici di questi diversi recettori (*Annunziato L et al. 2010*).

L'azione anti-VEGF indiretta dell'imatinib coinvolge, in particolare, la neurofilina-1 ed il PDGF.

La neurofilina-1 (NRP-1) è una proteina transmembrana la cui azione al livello delle cellule endoteliali è generalmente attribuita alla sua capacità di agire come recettore per l'isoforma VEGF-165 che, come detto prima, risulta la più implicata nei processi di neoangiogenesi patologica oftalmica. Tuttavia, studi in vivo effettuati su topi hanno consentito di comprendere che l'effetto angiogenetico della NRP-1 è più complesso e coinvolge anche un pathway VEGF-indipendente che non è ancora chiaramente noto. Sembra che la NRP-1 promuova l'angiogenesi indipendentemente dal VEGF e dal suo canonico recettore ad attività tirosin-chinasica (VEGFR2) stimolando la matrice extracellulare mediante induzione di un pathway mediato da actina che comporta il remodeling di Abl-1, un'altra tirosin-chinasi. L'imatinib è in grado di andarsi a inserire proprio nella via di segnalazione NRP1-Abl1 inibendo la chinasi Abl1. La somministrazione in vivo di imatinib nel topo risulta infatti in grado di ridurre l'angiogenesi patologica legata a retinopatia ossigeno-indotta. In questo modello la sequenziale esposizione del topo ad iperossia e successiva normossia comporta eliminazione dei vasi della retina centrale e quindi conseguente formazione di lesioni retiniche neovascolari molto rassomiglianti a quelle osservate nell'uomo nei casi di RD o DMLE secondarie a un'overespressione del VEGF e quindi teoricamente trattabile con anti-VEGF diretti. Tuttavia, dato che la monoterapia con anti-VEGF non è spesso efficace a lungo termine, sono necessarie altre vie di trattamento e l'uso off label dell'imatinib in campo oftalmico potrebbe, quindi, rappresentare un'importante alternativa in grado di ridurre l'angiogenesi mediante un pathway VEGF-indipendente che potrebbe, tra l'altro, risultare sinergico in co-somministrazione con anti-VEGF (*Raimondi C et al. 2015*).





**Figura 25. Struttura molecolare dell'imatinib**

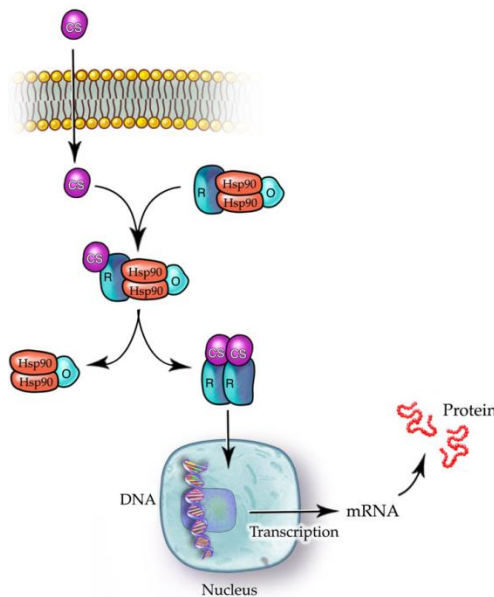
Inoltre, va ricordato che il ruolo del VEGF nei processi di angiogenesi è complementato dall'effetto del PDGF, anch'esso in grado di regolare indirettamente l'angiogenesi. I recettori beta per il PDGF possono, infatti, indurre trascrizione e secrezione di VEGF. L'azione dell'imatinib come inibitore della chinasi PDGFR, risulta quindi cruciale nella sua efficacia terapeutica come anti-VEGF indiretto (*Homsfi J et al. 2007*).

### **1.6.2 Corticosteroidi**

Sebbene il gold standard di riferimento per il trattamento delle patologie degenerative retiniche sia costituito, oggi, dalla somministrazione intravitreale di anti-VEGF, nell'ultima decade, la terapia a base di corticosteroidi è emersa come trattamento altamente promettente.

Tra i farmaci corticosteroidi si conta un ampio range di molecole farmacologicamente attive accomunate da similitudini strutturali con il cortisolo, un ormone steroideo fisiologicamente prodotto dalle ghiandole surrenali. Grazie alla loro natura lipofila i corticosteroidi riescono ad attraversare facilmente il doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari mediante trasporto passivo. Una volta all'interno delle cellule, tali farmaci agiscono mediante legame con i propri recettori citosolici. Questi recettori si trovano generalmente legati a proteine inibitorie, come le heat shock proteins (hsp). A seguito del legame corticosteroide-recettore la subunità hsp90 si stacca liberando il complesso farmaco-proteina il quale è in grado di entrare nel nucleo cellulare ed ivi interagire con gli opportuni siti accettori della cromatina nucleare. L'interazione con il materiale genetico comporta la soppressione nella trascrizione di alcuni fattori, come NF- $\kappa$ B, che, di conseguenza, vengono a mancare. Questo comporta una differente espressione

di specifici geni con conseguente sintesi di proteine responsabili degli effetti biologici dei corticosteroidi mediante meccanismi sia stimolatori che inibitori (**Fig. 26**).

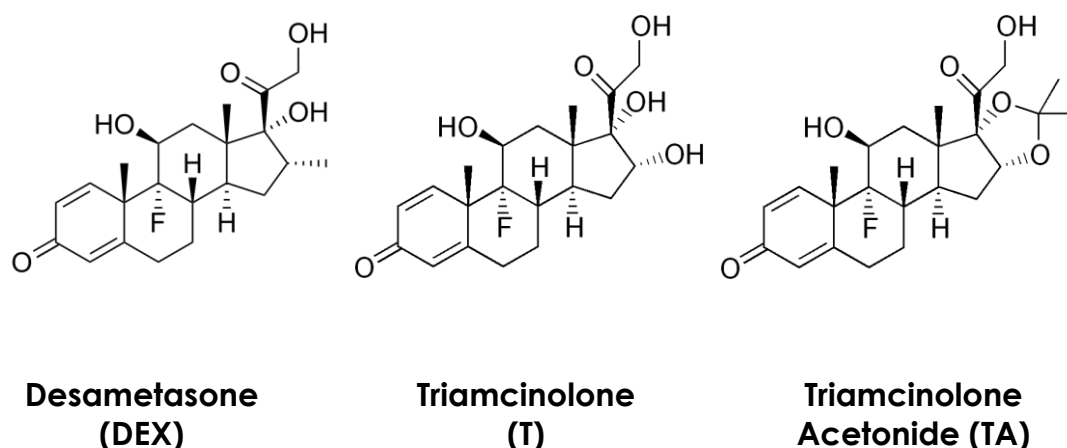


**Figura 26. Meccanismo d'azione dei corticosteroidi**

Lo spettro di azione biologiche esercitato da questa classe di farmaci è vasto e complesso. Innanzitutto essi esercitano un effetto antiinfiammatorio potente e ad ampio spettro secondario all'inibizione della fosfolipasi A2, l'enzima deputato alla produzione di acido arachidonico. Questo comporta inibizione della sintesi di trombossani, leucotrieni e prostaglandine prevenendo, quindi, la vasodilatazione e l'iperpermeabilità capillare. Inoltre i corticosteroidi sono anche in grado di stabilizzare i lisosomi, ridurre la sintesi di citochine infiammatorie, inibire la sintesi di VEGF mediante destabilizzazione del suo mRNA, inibire la proliferazione cellulare, stabilizzare la BRB, aumentare la produzione di proteine delle tight junction endoteliali e migliorare l'ossigenazione retinica. Questi farmaci mostrano un benefico effetto antiedematoso a livello retinico dovuto non solo alla loro azione antiinfiammatoria e vasoconstrictoria, ma anche alla loro capacità di modulare e regolare l'espressione e la distribuzione di canali ionici (es. canali del  $K^+$ ) e acquaporine al livello delle cellule gliali retiniche. In poche parole i corticosteroidi possono migliorare l'acuità visiva riequilibrando la BRB e riducendo la flogosi patologica, il rilascio di essudati e l'edema interstiziale.

Questo complesso meccanismo d'azione si inserisce molto bene nel quadro patologico presente in corso di malattie degenerative retiniche. Infatti, come visto, il processo di degenerazione vascolare è multifattoriale e legato non solo ad un'overespressione di VEGF secondaria a ipossia tissutale, ma anche a overespressione di NF-κB con conseguente infiammazione patologica e a crescente stress ossidativo che concorre ad alimentare l'aspettata upregulation del VEGF. Ne consegue che il controllo dell'infiammazione e dello stress ossidativo possa essere un'importante strategia di prevenzione e trattamento. Questo è dimostrato dalle evidenze in vivo condotte su modelli animali con CNV ove il trattamento con antiinfiammatori e/o antiossidanti, tra cui inibitori dell'NF-κB e delle iNOS, risulta in grado di prevenire lo sviluppo di infiammazione retinica ovvero di sopprimere un fenomeno flogistico già presente con conseguente attività antiangiogenetica. Sembrerebbe, quindi, che l'azione più ad ampio spettro dei corticosteroidi possa apportare effetti benefici superiori a quelli raggiungibili con la sola terapia anti-VEGF in quanto i farmaci anti-VEGF agiscono solo legando il VEGF o inibendolo, ma senza modificare l'assetto patologico generale di una retina in sofferenza.

Tra i corticosteroidi più in vista nel trattamento delle patologie degenerative vascolari retiniche ricordiamo il desametasone, il triamcinolone ed il triamcinolone acetonide (**Fig. 27**).



**Figura 27. Strutture molecolari di alcuni tra i più usati corticosteroidi per la via oftalmica**

La somministrazione sistemica di corticosteroidi dovrebbe, però, essere effettuata con cautela, soprattutto nei pazienti con diabete poiché questi farmaci potrebbero alterare

l'omeostasi glicemica inducendo insulino-resistenza ed una progressiva degenerazione delle cellule beta del pancreas. Inoltre, mediante legame con i recettori vascolari e renali dei mineralcorticoidi, i corticosteroidi potrebbero favorire l'ipertensione aumentando quindi i fattori di rischio metabolico e cardiovascolare soprattutto per i pazienti diabetici. Considerando, tra l'altro, che per patologie degenerative retiniche la risposta infiammatoria sembra essere localizzata e circoscritta solo a livello oftalmico (non sono mai state riscontrate evidenze di infiammazione sistica), attualmente una maggiore attenzione è rivolta verso la somministrazione oculare. In tal senso i corticosteroidi possono essere somministrati per via topica o intravitreale.

La somministrazione intravitreale di corticosteroidi comporta importanti effetti positivi rapidamente. Infatti è stato osservato che dopo appena 1 h dalla somministrazione intravitreale di triamcinolone in pazienti con EMD è possibile osservare una significativa riduzione dello spessore retiniche, al contrario, gli effetti di farmaci quali il bevacizumab sono osservabili solo dopo almeno 24 h dal trattamento. Questo perché gli steroidi possono agire velocemente anche attraverso meccanismi non genomici che coinvolgono, ad esempio, l'interazione con le membrane plasmatiche. Tuttavia i corticosteroidi sono caratterizzati da una bassa emivita intravitreale (es. l'emivita intravitreale del desametasone è di appena 5.5 h) e, di conseguenza, sono necessarie frequenti somministrazioni. Per di più, si tratta di farmaci estremamente insolubili in acqua che quindi, sia per via intravitreale che topica, vengono generalmente somministrati sotto forma di sospensioni. L'impiego di colliri sotto forma di sospensione per via topica comporta, tuttavia, numerosi problemi come disomogeneità, sedimentazione, cake e formazione di aggregati, problematiche di risospesibilità nonché l'irritazione oculare e fastidio legati alla presenza di particelle solide (*Graham RO et al. 1974; Ali Y et al. 2006; Stewart MW et al. 2012; Duh EJ et al. 2013*).

### **1.6.3 Altre Strategie Terapeutiche**

Ulteriori strategie terapeutiche consistono nel ricorso alla chirurgia vitreoretinica mediante fotocoagulazione laser o nella somministrazione di inibitori del GH e antiossidanti.

La chirurgia vitreoretinica è utilizzata nei casi in cui le emorragie vitreali non riescono ad essere compensate o nella forme più avanzate di RD proliferante che possono condurre distacco retinico. Il trattamento chirurgico può essere anche utilizzato per trattare la DME in particolare quando si osserva un importante ispessimento retinico. La tecnica chirurgica laser-focale si basa sull'impiego di un fascio laser, di lunghezza d'onda appropriata, diretto su specifiche zone della retina. L'applicazione focale del laser può arrestare o ridurre l'emorragia dei microaneurismi oculari. Inoltre, parte dell'energia del laser viene assorbita dai tessuti e convertita in calore con conseguente denaturazione proteica e necrosi coagulativa delle zone retiniche lesionate. Sebbene generalmente il trattamento non necessiti di essere ripetuto esso mostra effetti avversi importanti come riduzione del campo visivo, cecità notturna, alterazioni nella visione dei colori e, nei casi più gravi, necrosi maculare. Più frequentemente si ricorre a tecnica laser-scatterizzato o fotocoagulazione pan retinica nei casi in cui le lesioni neovascolari siano situate a livello della retina periferica. Ciò comporta una regressione della neovascolarizzazione non emorragica e della proliferazione fibrovascolare. Tuttavia può essere necessario ripetere il trattamento che può comunque comportare gli stessi effetti avversi della tecnica laser focale.

È stato evidenziato l'effetto dell'ormone della crescita (GH) nella patogenesi di malattie retiniche quali la RD. La somatostatina, o somatotropina, noto come ormone inibente l'ormone della crescita, è un ormone che regola il sistema endocrino. Analoghi sintetici della somatostatina vengono utilizzati come agenti terapeutici per RD. La loro azione, nel trattamento della RD, è strettamente collegata all'inibizione dell'angiogenesi mediante interazione con i recettori della somatostatina, presenti al livello delle cellule endoteliali. Inoltre, si osserva anche inibizione di segnali post-recettoriali di alcuni fattori di crescita peptidici, come il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1) e VEGF. Un analogo della somatostatina, l'octreotide, agisce da inibitore del GH ed è utilizzato per il trattamento della RD. I risultati ottenuti mostrano come questo farmaco sia sicuro ed efficace. Esso agisce bloccando la produzione locale e sistemica di GH e IGF-1, associati all'angiogenesi e alla proliferazione delle cellule endoteliali. L'uso di octreotide, ed altri analoghi alla somatostatina, sembra una promettente strategia per modulazione i livelli retinici di VEGF e dei suoi recettori regolando, quindi, l'eccessiva risposta angiogenica dovuta ad ipossia retinica. (*Grant MB et al. 2005; Chantelau E et al. 2005; Dal Monte M et al. 2009*).

Lo stress ossidativo è considerato un anello importante della catena di eventi che porta all'insorgenza delle malattie che colpiscono il nostro organismo, in particolare a livello oftalmico. Un'upregulation delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e delle specie reattive dell'azoto (RNS) e/o l'incapacità del sistema di difesa antiossidante di sopprimere ROS/RNS crea uno squilibrio tra la produzione e la distruzione di tali specie reattive. Il danno principale causato dalle ROS si osserva a livello del DNA mitocondriale e delle proteine della membrana mitocondriale con conseguenti squilibri nella catena di trasporto degli elettroni. Un eccesso di ROS risulta in rilascio del citocromo C, indice di danno al livello della membrana mitocondriale, che, infine, induce apoptosi cellulare. Per ovviare alla produzione delle ROS si ricorre agli antiossidanti. Si tratta di molecole normalmente presenti nella dieta, come le vitamine A, C ed E, alcuni flavonoidi e carotenoidi, che talvolta, se insufficienti, non riescono a prevenire lo stress ossidativo. Le principali funzioni degli antiossidanti riguardano l'inattivazione dei radicali liberi e l'inibizione della glutatione reduttasi retinica e della superossido dismutasi. Nel il trattamento della RD, ad esempio, è stato osservato che una terapia a breve termine con alte dosi di vitamina E risulta in grado di promuovere lo sviluppo di una circolazione ematica retinica normale e non patologica. Anche il resveratrolo è stato indicato come promettente in quanto protegge l'RPE dallo stress ossidativo (*Anuradha CD et al. 2001; Kowluru RA et al. 2001; Huang HY et al. 2002; Kowluru RA et al. 2007; Sheu SJ et al. 2010; Pinte A et al. 2011*).



## 2. SCOPO DELLA TESI

*“La nostra meta non è mai un luogo, ma piuttosto un nuovo modo di vedere le cose.”*

*- Henry Miller.*

Alla luce di quanto finora detto, i punti focali del presente lavoro di ricerca possono essere, brevemente, schematizzati come segue:

- ☉ La complessa anatomia dell'occhio lo rende un organo altamente isolato e, di conseguenza, un difficile target terapeutico da raggiungere,
- ☉ Nonostante le vie di somministrazione nella terapia oftalmica siano molteplici esse sono tutte caratterizzate da significativi svantaggi che portano ad una ridotta efficacia terapeutica,
- ☉ Con l'aumentare dell'incidenza delle patologie degenerative del segmento oculare posteriore è sempre più pressante l'esigenza di sviluppare nuove strategie terapeutiche che possano risultare efficaci nel trattamento di tali malattie le quali, se non opportunamente curate, conducono alla cecità,
- ☉ Considerando che le strategie terapeutiche attualmente messe in atto per il delivery di farmaci al segmento posteriore dell'occhio risultano altamente invasive è auspicabile il pronto sviluppo di *smart ocular drug delivery systems* che risultino patient-friendly,
- ☉ In tal senso il ricorso a formulazioni a base di opportuni polimeri (inserti oftalmici intelligenti o sistemi carrier nanometrici) da somministrare per via topica potrebbe essere una strategia vincente per promuovere l'ingresso di farmaco nelle regioni interne dell'occhio, potenziandone, quindi, l'efficacia.

Tenendo in mente questo quadro generale, lo scopo del presente lavoro di dottorato di ricerca è stato quello di formulare sistemi *enhancer*, a struttura polimerica, per il delivery di farmaci al segmento posteriore dell'occhio sfruttando la via di somministrazione oculare topica.

Al fine di raggiungere gli obiettivi prefissati, il lavoro di ricerca è stato sostanzialmente suddiviso in due grossi filoni:

- ☉ Progettazione, Sviluppo e Ottimizzazione di sistemi nanostrutturati quali micelle polimeriche, somministrabili sotto forma di collirio,
- ☉ Design, Preparazione e Caratterizzazione di scaffold fibrillari opportunamente decorati, somministrabili quali inserti oftalmici non bioerodibili.

La linea di ricerca inerente la preparazione di micelle polimeriche ha costituito la parte preponderante del lavoro svolto ed ha avuto degli obiettivi consequenziali e specifici.

Come polimero di partenza è stata scelta l'inulina, selezionata in quanto polimero naturale estremamente versatile e dotato di qualità favorevoli ed essenziali per lo sviluppo di *ocular drug delivery systems* efficienti. Grazie alle sue ottime proprietà essa è già stata spesso impiegata nella letteratura recente per lo sviluppo di differenti *drug delivery systems* nanometrici.

Il primo obiettivo è stato, quindi, quello di verificare se l'inulina potesse essere un utile ed efficace polimero di partenza per lo sviluppo di *ocular drug delivery systems*. In tal senso sono stati inizialmente realizzati due derivati polimerici anfifilici, utilizzati per la preparazione di sistemi micellari, e differenti unicamente per la presenza o meno del PEG. In questo modo è stato valutato se l'inserimento superficiale delle catene di PEG potesse conferire al sistema proprietà *enhancer* o aumentare le proprietà *enhancer* intrinseche dello stesso.

Un secondo step ha visto come protagonista un polimero semisintetico altamente idrosolubile: l' $\alpha,\beta$ -poly(N-2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamide (PHEA). Esso è stato scelto come polimero a struttura poliamminoacidica al fine di confrontare la differente efficacia di micelle polimeriche a struttura polisaccaridica (INU) rispetto a strutture micellari costituite da polimeri poliamminoacidici (PHEA).

Infine, il miglior sistema micellare è stato ottimizzato in termini di effetto *enhancer* mediante funzionalizzazione chimica con opportune molecole in grado di agire da promotori dell'assorbimento transcorneale. Nello specifico, ad eccezione del PEG, sono



state selezionate molecole i cui trasportatori sono siti al livello dell'epitelio corneale umano: taurina, carnitina e creatina. La funzionalizzazione chimica con gli *enhancers* è stata effettuata in quanto i dati preliminari ottenuti attraverso PEG-ylzione del sistema hanno permesso di valutare la possibilità di incrementare l'efficacia *enhancer* del sistema micellare finale. Tuttavia, per uno studio più completo, gli *enhancer* sono stati valutati anche liberi in soluzione e non solo legati covalentemente alla superficie micellare.

La seconda linea di ricerca portata avanti ha visto lo sviluppo di inserti oftalmici mucoadesivi e non bioerodibili in grado di consentire un rilascio protratto di farmaci idrofobici.

Per la realizzazione di tali sistemi sono state utilizzate le tecniche innovative dell'elettrospinning e della funzionalizzazione plasma-assistita. Mediante elettrospinning è stato possibile ottenere scaffold fibrillari dotati delle proprietà necessarie per l'inserimento nel fornice congiuntivale in condizioni di comfort. Essi poi sono stati ulteriormente decorati in superficie al fine di conferire al sistema finale proprietà *ad hoc* essenziali per la via di somministrazione scelta quali idrofilia, mucoadesione e citocompatibilità.



## 3. PARTE SPERIMENTALE

*“Rendete visibile quello che, senza di voi, forse non potrebbe mai essere visto..”*

*- Robert Bresson.*

### **3.1 Materiali e Strumenti**

#### **3.1.1 Materiali**

Tutti i solventi ed i reagenti impiegati sono di grado analitico e sono stati usati senza ricorrere a nessuna ulteriore purificazione.

L'inulina (INU), il 4-bis-nitrofenil carbonato (4-BNPC), l'etilendiammina (EDA), l'N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimide cloruro (EDC·HCl), l'N-idrossisuccimide (NHS), l'acido retinoico (RA), la trietilammina (TEA), l' O-[2-(6-Oxocaproilamino)etil]-O'-metilpolietilene glicole 2000 (PEG2000), il Dulbecco phosphate buffer saline (DPBS; composizione: KCl 0.2 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l; NaCl 8.2 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydrous 1.15 g/l), il desametasone (DEX), il triamcinolone (T), il triamcinolone acetoneide (TA), l'acido aspartico, l'etanolammina, l'imatinib (IMA), la carnitina, la creatina, la taurina, la ninidrina, il poly(1,4-butylene succinate) (PBS) le Sephadex G15 e G25, il pirene, la mucina (tipo III, dallo stomaco di maiale), l'acido poliacrilico (PAA) e il bicarbonato di sodio sono stati acquistati presso Sigma Aldrich.

L'acido cloridrico 2 N, l'idrossido di sodio 0.1 N e l'acido ortofosforico (85% p/v) sono stati acquistati presso VWR-International.

L'Alexa Fluor-NHS<sub>488</sub> è stato acquistato presso life Technologies.

L'eparina sodica è stata gentilmente fornita dal Laboratorio Derivati Organici S.p.A. (LDO) – Prodotti Biologici Chimici e Farmaceutici.

Il tampone HEPES a pH 7.4 simulante i fluidi oculari è stato preparato solubilizzando in acqua bidistillata HEPES (5.96 g/l) e NaCl (9 g/l) e portando il pH a 7.4 con NaOH 5 M.

Le cellule dell'epitelio corneale umano (HCEpic) sono state acquistate da Sciencells. Il mezzo di coltura Keratinocyte Serum Free Basal Medium e i suoi supplementi Bovine Pituitary Extract (BPE) e recombinant human Epithelial Growth Factor (EGF) sono stati acquistati da Gibco.

Le cellule dell'epitelio pigmentato retinico umano (HRPE), il mezzo di coltura Rrtinal Pigment Epithelial Cell Basal Medium e i suoi specifici supplementi L-glutammina, siero bovino fetale (FBS), Basal Fibroblast Growth Factor (FGF-B) e gentamicina solfato-amfotericina B (GA-1000) sono stati acquistati da Lonza.

Le cellule murine primarie di epitelio corneale (MCEpiC) e di epitelio pigmentato retinico (MRPE) sono state ottenute per dissezione oculare e trattamento enzimatico, presso i laboratori di ricerca della sezione di Biologia Cellulare del dipartimento STEBICEF, con la collaborazione del Prof. Giulio Gherzi. Le MCEpiC sono state coltivate in DMEM-F12 completato con gli opportuni supplementi (FBS, EGF, L-glutammina, Penicillina-Streptomicina), acquistati presso Sigma Aldrich. Le MRPE sono state coltivate in MEME-alpha modificato completato con gli specifici supplementi (FBS, L-glutammina, Penicillina-Streptomicina, amminoacidi non essenziali, Taurina, Idrocortisone e Triiodotironina), acquistati presso Sigma Aldrich.

I bulbi oculari bovini sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" di Palermo, previa autorizzazione del veterinario competente dell'ASP di Palermo.

### **3.1.2 Strumenti**

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  sono stati registrati impiegando uno strumento Bruker Avance II 300 operante a 300.12 MHz.

Gli spettri UV-VIS sono stati registrati impiegando uno strumento 2401 PC Shimadzu Recording Spectrophotometer UV. Le analisi eseguite sono state ottenute analizzando il range 600-200 nm.

Gli spettri ATR-FTIR sono stati acquisiti impiegando uno strumento Bruker Alpha instrument Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) dotato di unita ATR per

l'analisi superficiale dei campioni solidi. Le analisi eseguite sono state ottenute analizzando il range 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ , accumulando 32 scansioni e riportando il segnale ottenuto all'opportuno segnale di background.

La determinazione dei valori di Concentrazione di Aggregazione Critica è stata effettuata impiegando uno spettrofluorimetro RF-5301 PC Shimadzu.

Per la preparazione delle micelle con il metodo del casting è stato impiegando un Rotavapor R-114 Büchi Rotavapor associato a B-480 Büchi Waterbath.

Le analisi DLS e di potenziale zeta sono state condotte a 25 °C utilizzando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS dotato di laser a 532 nm e con angolo di scattering fisso a 173°. Per la valutazione della stabilità delle micelle a pH 4-10 è stata effettuata una titolazione potenziometrica impiegando l'accessorio MPT-2.

Le analisi HPLC sono state eseguite utilizzando un'HPLC Agilent instrument 1260 Infinity dotato di pompa quaternaria VL G1311C e detector DAD 1260 VL, iniettore da 50  $\mu\text{l}$  e l'opportuno software correlato (OpenLAB CDS ChemStation Workstation).

Le immagini degli studi di uptake qualitativo *in vitro* sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza Axio Cam MRm – Zeiss.

Per la procedura di elettrospinning sono stati impiegati i seguenti componenti: siringa di vetro del volume pari a 10 ml con ago avente diametro interno da 0.8 mm, pompa a siringa programmabile Aitecs PLUS SEP-21S, generatore di voltaggio Spellman CZE 1000 R.

Per la funzionalizzazione plasma-assistita degli scaffold è stato utilizzato un reattore al plasma operante a basse pressione FEMTO, Diener Electronic Plasma-Surface-Technology, GmbH.

Le analisi di microscopia a scansione elettronica sono state condotte impiegando un microscopio ESEM Philips XL30 operante a 5 kV.

Per tutte le procedure condotte in orbital shaker è stato utilizzato uno strumento Benchtop 808 C modello 420.

Le analisi  $^{13}\text{C}$ -NMR in fase solida condotte sugli scaffold sono state eseguite utilizzando uno Spettrometro Bruker AVANCE IIIITM HD 600 MHz presso il laboratorio di risonanza magnetica nucleare di AtenCenter.

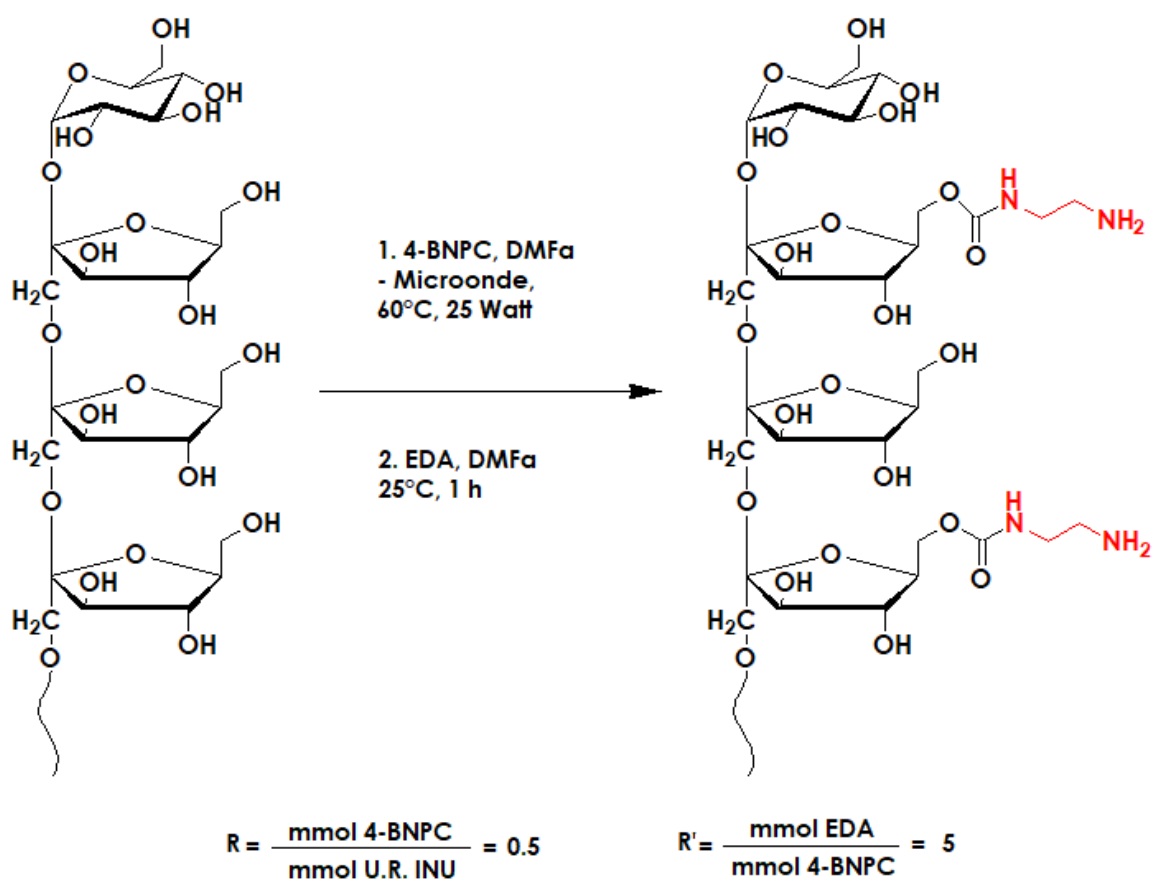
## 3.2 Metodi

### 3.2.1 Micelle Polimeriche A Base Di Inulina Per La Somministrazione Oculare Topica Di Corticosteroidi

#### 3.2.1.1 Sintesi Polimerica e Caratterizzazione Spettroscopica

I copolimeri anfifilici derivati dall'inulina (siglati INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG) sono stati sintetizzati mediante una procedura multistep che ha previsto l'isolamento di differenti intermedi.

Il primo step comporta la sintesi, già nota presso il laboratorio di ricerca ove questo lavoro è stato svolto, del derivato INU-EDA (**Schema 1**) (Licciardi *M et al.* 2014).



Schema 1. Sintesi di INU-EDA

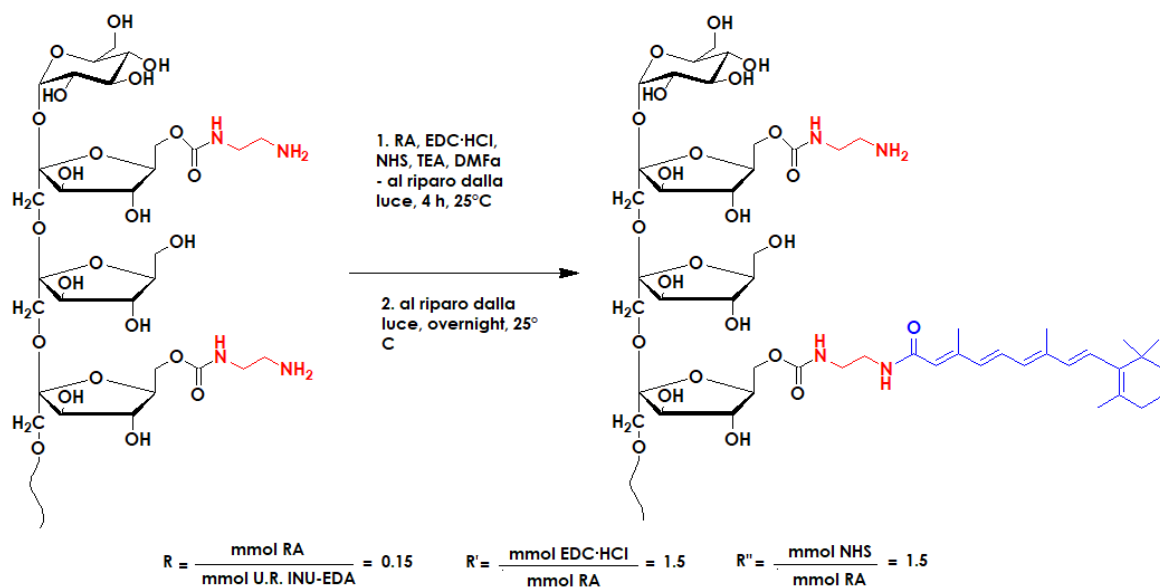
Brevemente, l'inulina (INU) (250 mg; 1.54 mmol) è stata solubilizzata in DMF<sub>a</sub> (4 ml) a 60°C. Successivamente, è stato aggiunto il bis(4-nitrofenil) carbonato (4-BNPC) (236 mg; 0.77 mmol), previamente solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (1 ml), impiegato al fine di attivare i gruppi ossidrilici dell'inulina. Per migliorare la resa e l'efficacia della reazione, essa è condotta via "Enhanced Microwave Synthesis" (EMS) impiegando un reattore a microonde CEM discover, alla temperatura di 60°C e a 25 Watt per 1 h. A seguito dell'attivazione, l'INU attivata viene lentamente addizionata ad una soluzione di etilendiammina (EDA) (250 µl, 3.85 mmol) in DMF<sub>a</sub> (1 ml), e la miscela di reazione è lasciata a 25°C per 1 h sotto costante agitazione. Il work up della reazione consiste nella precipitazione del prodotto ottenuto in una miscela costituita da etere dietilico e diclorometano in rapporto 2:1 (v/v). Seguono un lavaggio del precipitato nella stessa miscela di precipitazione e tre lavaggi in acetone al fine di rimuovere l'eccesso di 4-BNPC e EDA che non hanno reagito. In seguito, il prodotto secco viene solubilizzato in acqua bidistillata e purificato mediante Gel Permeation Chromatography (GPC), impiegando come fase stazionaria una colonna Sephadex G15 e come fase mobile acqua bidistillata. Le frazioni raccolte sono, dunque, congelate e liofilizzate.

Resa percentuale in peso rispetto all'INU di partenza: 100%.

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ 2.725–3.175 (4H<sub>EDA</sub>, -NH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**-NH<sub>2</sub>), 3.611- 3.704 (5H<sub>INU</sub>, -**CH<sub>2</sub>**-OH; -**CH**-CH<sub>2</sub>-OH; -C-**CH<sub>2</sub>**-O-), 3.995-4.127 (2H<sub>INU</sub>, -C-**CH**-OH; -**CH**-OH).

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ 44.870 (2C<sub>EDA</sub> -NH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**-NH<sub>2</sub>), 62.064 (1C<sub>INU</sub> -**CH<sub>2</sub>**-C-), 62.860 (1C<sub>INU</sub> -**CH<sub>2</sub>**-OH), 75.463 (1C<sub>INU</sub> OH-CH-**CH**-OH), 78.772 (1C<sub>INU</sub> OH-**CH**-CH-OH), 82.918 (1C<sub>INU</sub> OH-CH-**CH**-CH<sub>2</sub>-OH), 104.001 (1C<sub>INU</sub> -CH<sub>2</sub>-C-O).

Il derivato INU-EDA ottenuto è stato poi ulteriormente processato impiegando, come agente idrofobizzante, l'acido all-trans retinoico (RA) al fine di ottenere il derivato anfifilico INU-EDA-RA (**Schema 2**).



## Schema 2. Sintesi di INU-EDA-RA

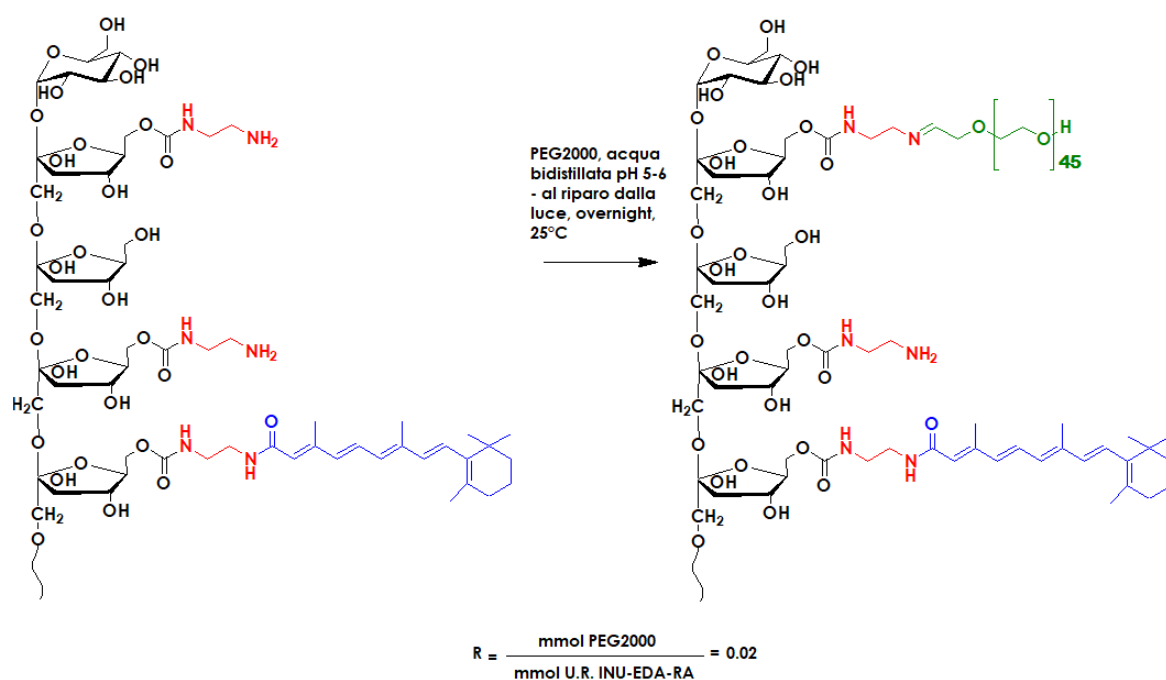
L'RA (78.9 mg; 0.26 mmol) è stato solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (6 ml) e, successivamente, sono stati aggiunti l'1-etil-3-(dimetilamminopropil)carbodiimide cloruro (EDC·HCl) (75 mg; 0.39 mmol) e N-idrossisuccimide (NHS) (45 mg; 0.39 mmol) solidi e la trietilammina (TEA; 35 µl), al fine di attivare il gruppo carbossilico dell'RA. La reazione è condotta a 25°C per 4 h al riparo dalla luce. Al termine della reazione di attivazione, l'RA attivato viene aggiunto all'INU-EDA (300 mg; 1.75 mmol) previamente solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (12 ml), e la miscela di reazione è lasciata a 25°C overnight (~18 h) e al riparo dalla luce. Il work up della reazione consiste nella precipitazione del prodotto ottenuto in una miscela costituita da etere dietilico e diclorometano in rapporto 2:1 (v/v). Seguono 3 lavaggi del precipitato nella stessa miscela di precipitazione al fine di allontanare tutto l'RA che non ha reagito. Il prodotto secco viene, quindi, disperso in acqua bidistillata e purificato dall'eccesso di EDC·HCl ed NHS mediante dialisi (RC; 1 kDa). Al termine della dialisi il prodotto è congelato e liofilizzato.

Resa percentuale in peso rispetto all'INU-EDA di partenza: 85%.

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>, 300 MHz): δ 1.227 (6H<sub>RA</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-), δ 1.670 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.806 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.909 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 2.249 (5H<sub>RA</sub> - CH<sub>2</sub>-C-C-CH<sub>3</sub>), δ 2.573 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 3.425-3.885 (5H<sub>INU</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH; -CH-CH<sub>2</sub>-OH; -C-CH<sub>2</sub>-O-), 4.277-4.448 (2H<sub>INU</sub>, -C-CH-OH; -CH-OH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMF- $d_7$ , 300 MHz):  $\delta$  12.327 ( $1\text{C}_{\text{RA}} -\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 12.974 ( $1\text{C}_{\text{RA}} -\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 19.224 ( $1\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 21.400 ( $1\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 28.728 ( $2\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-$ ), 32.952 ( $1\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 39.697 ( $1\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 44.217 ( $2\text{C}_{\text{EDA}} -\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 61.983 ( $1\text{C}_{\text{INU}} -\text{CH}_2-\text{C}-$ ), 62.455 ( $1\text{C}_{\text{INU}} -\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 75.127 ( $1\text{C}_{\text{INU}} \text{OH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{OH}$ ), 78.338 ( $1\text{C}_{\text{INU}} \text{OH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{OH}$ ), 82.778 ( $1\text{C}_{\text{INU}} \text{OH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 103.876 ( $1\text{C}_{\text{INU}} -\text{CH}_2-\text{C}-\text{O}$ ), 123.014 ( $1\text{C}_{\text{RA}} -\text{C}-\text{CH}-\text{CO}-$ ), 127.755 ( $1\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{C}-\text{CH}-$ ), 129.608 ( $2\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}-$ ), 130.600 ( $1\text{C}_{\text{RA}} \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-$ ), 136.699 ( $1\text{C}_{\text{RA}} \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-$ ), 137.798 ( $1\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-$ ), 138.186 ( $1\text{C}_{\text{RA}} (\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{C}-\text{CH}-$ ), 139.300 ( $1\text{C}_{\text{RA}} -\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 147.345 ( $1\text{C}_{\text{RA}} -\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 168.602 ( $1\text{C}_{\text{RA}} -\text{C}=\text{O}$ ).

Ulteriore step sintetico consiste nella successiva funzionalizzazione dell'INU-EDA-RA ottenuto con PEG<sub>2000</sub> (Schema 3).



**Schema 3. Sintesi di INU-EDA-RA-PEG**

L'INU-EDA-RA (200 mg; 1.09 mmol) è stato disperso in acqua bidistillata (6 ml) e il pH della dispersione è portato a 6.5 con HCl 0.1 N. Successivamente è aggiunto il CHO-PEG<sub>2000</sub> (43.6 mg; 0.0218 mmol) solido al fine di creare una base di Schiff coinvolgendo i gruppi amminici primari dell'EDA e il gruppo aldeidico del CHO-PEG<sub>2000</sub>. Il pH della



miscela di reazione viene, quindi, nuovamente portato a 6.5 con HCl 0.1 N e, una volta stabilizzatosi, la miscela è lasciata reagire overnight (~18 h) a 25°C al riparo dalla luce. Il work up della reazione consiste nell'immediata purificazione del prodotto crudo mediante GPC impiegando come fase stazionaria una colonna Sephadex G25 e come fase mobile acqua bidistillata. Le frazioni raccolte sono, dunque, congelate e liofilizzate.

Resa percentuale in peso rispetto all'INU-EDA-RA di partenza: 97%.

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>, 300 MHz): δ 1.246 (6H<sub>RA</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-), δ 1.678 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.809 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.930 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 2.249 (5H<sub>RA</sub> - CH<sub>2</sub>-C-C-CH<sub>3</sub>), δ 2.594 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 3.506-3.934 (5H<sub>INU</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH; -CH-CH<sub>2</sub>-OH; -C-CH<sub>2</sub>-O-), δ 3.739 (180H<sub>PEG</sub>, [-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-]<sub>45</sub>), δ 4.283-4.471 (2H<sub>INU</sub>, -C-CH-OH; -CH-OH).

<sup>13</sup>C-NMR (DMF-d<sub>7</sub>, 300 MHz): δ 12.319 (1C<sub>RA</sub> -CH-C-CH<sub>3</sub>), 12.976 (1C<sub>RA</sub> -CH-C-CH<sub>3</sub>), 19.222 (1C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 21.403 (1C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 28.730 (2C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-), 32.950 (1C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 39.699 (1C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 44.220 (2C<sub>EDA</sub> -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 61.982 (1C<sub>INU</sub> -CH<sub>2</sub>-C-), 62.454 (1C<sub>INU</sub> -CH<sub>2</sub>-OH), 70.835 (90H<sub>PEG</sub> [-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-]<sub>45</sub>), 75.125 (1C<sub>INU</sub> OH-CH-CH-OH), 78.339 (1C<sub>INU</sub> OH-CH-CH-OH), 82.777 (1C<sub>INU</sub> OH-CH-CH-CH<sub>2</sub>-OH), 103.877 (1C<sub>INU</sub> -CH<sub>2</sub>-C-O), 123.014 (1C<sub>RA</sub> -C-CH-CO-), 127.756 (1C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-C-CH-), 129.608 (2C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-C-CH-), 130.602 (1C<sub>RA</sub> CH<sub>3</sub>-C-CH-CH-CH-), 136.700 (1C<sub>RA</sub> CH<sub>3</sub>-C-CH-CH-CH-), 137.799 (1C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-C-CH-CH-), 138.188 (1C<sub>RA</sub> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-C-CH-), 139.301 (1C<sub>RA</sub> -CH-C-CH<sub>3</sub>), 147.344 (1C<sub>RA</sub> -CH-C-CH<sub>3</sub>), 168.600 (1C<sub>RA</sub> -C=O).

I derivati ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi spettrofotometrica (UV-VIS) e infrarossa (ATRFT-IR).

Le analisi spettrofotometriche sono state condotte nel range 200-600 nm impiegando soluzioni standard alla concentrazione di 0.1 mg/ml, cioè inferiore al valore di CAC (vedi paragrafo 3.3.1.2).

Le analisi infrarosse sono state condotte utilizzando la tecnica in Riflettanza Totale Attenuata (ATR) impiegata per l'analisi superficiale di campioni solidi. Gli spettri ATRFT-IR sono stati registrati nel range 4000-400 cm<sup>-1</sup> (numero di scansioni = 32).

### **3.2.1.2 Valutazione della Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC)**

La valutazione della capacità di self-assembling dei derivati anfifilici dell'inulina è stata eseguita utilizzando il pirene come sonda fluorescente. 10 µl di una soluzione madre di pirene in acetone ( $6.0 \times 10^{-5}$  M) sono stati posti in una serie di vials e lasciati in orbital-shaker a 37°C al fine di consentire la completa evaporazione del solvente. In seguito, in ogni vial è stato aggiunto 1 ml di soluzione di polimero (in acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 o HEPES pH 7.4) a concentrazione crescente (da  $4 \times 10^{-4}$  mg/ml a 2 mg/ml). A seguito dell'aggiunta della soluzione polimerica la concentrazione finale di pirene in ogni vial risulta pari a  $6.0 \times 10^{-7}$  M. Le soluzioni così preparate sono lasciate a 37°C in orbital-shaker per 24 h al fine di consentire la creazione di un equilibrio tra micelle polimeriche e pirene (Scialabba C et al. 2012).

Gli spettri di emissione di fluorescenza del pirene sono registrati impiegando come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 373 nm e 333 nm.

### **3.2.1.3 Preparazione delle Micelle Polimeriche vuote e cariche di Corticosteroidi**

Sia le micelle vuote (INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG) che le micelle cariche di desametasone (INU-EDA-RA/DEX e INU-EDA-RA-PEG/DEX), triamcinolone (INU-EDA-RA/T e INU-EDA-RA-PEG/T) e triamcinolone acetone (INU-EDA-RA/TA e INU-EDA-RA-PEG/TA) sono state preparate con il metodo del casting. Una quantità di INU-EDA-RA o INU-EDA-RA-PEG accuratamente pesata (30 mg) è stata dispersa in DMF<sub>a</sub> (2 ml) e, successivamente, per la preparazione delle micelle cariche, è stata aggiunta un'opportuna quantità di farmaco solido (21 mg). Dopo completa dissoluzione del farmaco, la DMF<sub>a</sub> è stata completamente allontanata, fino ad assistere alla creazione di un film continuo di polimero e farmaco che è stato, quindi, idratato con 3.5 ml di acqua bidistillata. La dispersione ottenuta è stata mantenuta a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione per 3 ore, al riparo dalla luce. La dispersione micellare è stata, quindi, centrifugata al fine di purificare le micelle cariche dal farmaco libero non incapsulato. Questo metodo di purificazione è supportato dalla scarsa solubilità in acqua dei tre farmaci scelti (massima solubilità in ambiente acquoso di DEX e T= 50 µg/ml, massima solubilità in ambiente acquoso di TA < 30 µg/ml). Dopo la purificazione, la dispersione micellare è

stata filtrata attraverso un filtro di acetofalato di cellulosa da 5  $\mu\text{m}$  e, in seguito, liofilizzata.

La resa in peso ottenuta per le micelle vuote e per le micelle cariche di farmaco, calcolata rispetto alla quantità iniziale di polimero impiegata, è risultata rispettivamente pari al 100% e superiore al 100%.

È stata eseguita la stessa procedura variando il tempo di agitazione dopo la reidratazione del film ottenuto. Tuttavia la procedura ivi riportata è quella che ha consentito di ottenere i risultati migliori.

#### ***3.2.1.4 Preparazione delle Micelle Polimeriche Fluorescenti***

Un'opportuna quantità di micelle vuote (INU-EDA-RA o INU-EDA-RA-PEG) (50 mg) precedentemente preparate è stata dispersa in 5 ml di una soluzione tampone di bicarbonato di sodio a pH 8.3 (42 mg di  $\text{NaHCO}_3$  in 5 ml) e il pH è stato portato a 8.3 con HCl 0.1 N. A seguito della stabilizzazione del pH, è stato aggiunto l'AlexaFluor-NHS<sub>488</sub> (1 mg in 100  $\mu\text{l}$  di DMSO) e il pH è stato corretto nuovamente fino a 8.3. La reazione è stata condotta per 1 h a temperatura ambiente sotto continua agitazione e al riparo dalla luce. In seguito, il prodotto grezzo è stato immediatamente purificato mediante GPC, usando come fase stazionaria la Sephadex G25.

Resa percentuale in peso, rispetto alle micelle impiegate in partenza, pari all'89.00% e al 95.30% rispettivamente per le micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>.

#### ***3.2.1.5 Studi di Dynamic Light Scattering (DLS) e Potenziale Zeta***

Le misure di DLS e di potenziale zeta sono state registrate a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Dispersioni acquose di micelle INU-EDA-RA o INU-EDA-RA-PEG (0.5 mg/ml) sia vuote che cariche di farmaco, sono state filtrate su filtri da 5  $\mu\text{m}$  di cellulosa acetofalato e, quindi, immediatamente analizzate.

In seguito, per valutare la stabilità e il comportamento delle micelle polimeriche in un range di pH compreso tra 4 e 10 sono state registrate misure sia di DLS che di potenziale zeta in corso di titolazione potenziometrica della dispersione di micelle, utilizzando l'accessorio MPT-2.

Le micelle vuote precedentemente preparate (INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG) (5 mg) sono state disperse in 10 ml di acqua bidistillata, sottoposte a vigorosa agitazione e portate alla temperatura di  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Alla dispersione così preparata (avente pH di partenza pari a 6.3 in entrambi i casi) è stato addizionato HCl 0.1 N fino ad arrivare a pH 4 (punto di inizio titolazione). Le dispersioni sono state, quindi, titolate con una soluzione standard di NaOH 0.1 N fino al raggiungimento di pH 10. Nel corso della titolazione sono effettuate, a intervalli di pH regolari, misure di particle size e di potenziale zeta.

### ***3.2.1.6 Studi di Mucoadesione***

#### ***Potenziale zeta***

Sono state preparate dispersioni di mucina (di tipo III, proveniente dallo stomaco di maiale), quindi aggiunte alla dispersione di micelle vuote (INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG) (concentrazione finale di mucina 0.4 mg/ml; concentrazione finale di micelle 1 mg/ml) e brevemente vortexate. Le miscele ottenute sono state incubate a  $35^\circ\text{C}$  a differenti time points (0, 3, 10, 15, 30, e 60 minuti) ed è stato, quindi, misurato il potenziale zeta. I risultati ottenuti sono stati comparati con i valori di potenziale zeta misurati per la soluzione di mucina e per la dispersione di micelle singolarmente. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato in acqua bidistillata e DPBS pH 7.4.

#### ***Turbidimetria***

La torbidità delle mucina, delle micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG e di miscele di micelle vuote e mucina è stata valutata mediante analisi spettrofotometrica a 500 nm (*Bhatta RS et al. 2012; Licciardi M et al. 2013*). Le soluzioni di mucina sono state diluite 1:1 con una dispersione di micelle vuote e brevemente vortexate. A seguito della diluizione, la concentrazione finale della mucina è risultata pari a 1 mg/ml mentre, per quanto riguarda le micelle vuote, sono state valutate 3 differenti concentrazioni superiori ai valori di CAC (0.5 mg/ml, 1 mg/ml e 5 mg/ml). In seguito sono state condotte analisi spettrofotometriche a differenti tempi di incubazione (0, 30, 60, 180 e 360 minuti). L'incremento di torbidità della miscela, rispetto alla torbidità costante mostrata da una soluzione di mucina e impiegata come riferimento, è indice della formazione di macroaggregati legata alle proprietà mucoadesive del sistema. I risultati sono stati espressi

in termini di trasmittanza percentuale rispetto ai valori di trasmittanza calcolati per la mucina. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato in DPBS pH 7.4. Inoltre, la stessa procedura è stata eseguita per valutare la mucoadesione dell'INU, dell'INU-EDA e del PAA (acido poliacrilico) impiegato come controllo positivo (*Pitarresi G et al. 2008*).

### **3.2.1.7 Valutazione della Drug Loading %**

Per valutare la quantità di farmaco incorporata all'interno delle micelle sono state condotte analisi HPLC.

Per la quantificazione del DEX una quantità accuratamente pesata di micelle INU-EDA-RA/DEX o INU-EDA-RA-PEG/DEX (5 mg) è stata solubilizzata in DMF<sub>a</sub>. La soluzione limpida è stata filtrata su filtro in nylon da 0.45 µm e trasferita in un matraccio da 5 ml, quindi portata a volume con DMF<sub>a</sub>. La quantità del DEX caricata all'interno delle micelle è stata determinata mediante cromatografia su fase inversa impiegando una colonna Luna Phenomenex C18 come FS (colonna Luna 5U C18 100A size 250\*4.60 mm) e una fase mobile costituita da acqua e acetonitrile (52:48 v/v) in condizioni isocratiche. Il flusso è stato impostato a 0.8 ml/min e la lunghezza d'onda del detector UV è stata settata a 246 nm. In queste condizioni, il tempo di ritenzione per DEX è pari a 8.5 min. La quantificazione del DEX contenuto all'interno delle micelle è stata effettuata utilizzando la relativa curva di taratura costruita impiegando un range di concentrazione compreso tra  $1 \times 10^{-4}$  e 1 mg/ml ( $R^2=0.999$ ).

Per la quantificazione del T e del TA una quantità accuratamente pesata di micelle INU-EDA-RA/T, INU-EDA-RA-PEG/T, INU-EDA-RA/TA o INU-EDA-RA-PEG/TA (5 mg) è stata dispersa in metanolo e mantenuta sotto agitazione costante per 3 ore. Successivamente, la dispersione è stata filtrata attraverso un filtro in nylon da 0.45 nm, trasferita all'interno di un matraccio da 5 ml e quindi portata a volume con metanolo. La quantità di T e TA caricata all'interno delle micelle è stata determinata mediante cromatografia su fase inversa impiegando la colonna Luna Phenomenex C18 precedentemente descritta come FS e una fase mobile costituita da metanolo. Il flusso è stato impostato a 0.5 ml/min e la lunghezza d'onda del detector UV è stata settata a 254 nm. In queste condizioni, il tempo di ritenzione per T e TA è pari a 5.4 min e 5.9 min rispettivamente. La quantificazione del T e del TA contenuti all'interno delle micelle è

stata effettuata utilizzando le relative curve di taratura costruite impiegando un range di concentrazione compreso tra  $1 \times 10^{-4}$  e 1 mg/ml ( $R^2_T=0.999$ ;  $R^2_{TA}=0.999$ ).

In tutti i casi la quantità di farmaco incapsulata all'interno delle micelle è stata espressa come contenuto di farmaco (mg) in 100 mg di micelle cariche di farmaco.

### **3.2.1.8 Studi di Rilascio *in vitro***

Per gli studi di rilascio *in vitro* del farmaco è stato impiegato il metodo delle dialisi. Un'adeguata quantità di micelle cariche di farmaco (concentrazione di DEX, T o TA nel compartimento donatore pari a 500 µg/ml) è stata dispersa in DPBS pH 7.4 (800 µl) e posta all'interno di una membrana da dialisi in RC (SpectraPore; cut off 1 kDa). La dialisi è stata, quindi, immersa in DPBS pH 7.4 (8 ml) e incubata a 37°C sotto continua agitazione (100 rpm) in orbital shaker per 48 ore. A intervalli di tempo stabiliti sono state prelevate delle aliquote dal compartimento ricevente (1 ml), immediatamente rimpiazzate con la stessa quantità di DPBS pH 7.4 fresco per mantenere le condizioni sink del sistema. Identica procedura è stata seguita per determinare il profilo di diffusione del farmaco libero dalla dialisi solubilizzando la massima quantità di farmaco libero in DPBS pH 7.4. Per quanto riguarda lo studio del profilo di diffusione di DEX and T sono state preparate per entrambi i farmaci delle soluzioni standard in DPBS pH 7.4 solubilizzando 5 mg di farmaco in 100 ml di DPBS pH 7.4 (concentrazione di farmaco nel donatore: 50 µg/ml). D'altro canto, il TA (2.5 mg) è stato previamente solubilizzato in metanolo (10 ml – concentrazione TA: 250 µg/ml) e poi diluito 1:10 con DPBS pH 7.4 (concentrazione finale di TA: 25 µg/ml) in modo da impedire la precipitazione del farmaco. Inoltre, sono stati eseguiti test di dissoluzione e diffusione *in vitro* caricando nel compartimento donatore una sospensione di farmaco preparata in modo da ottenere la medesima quantità di farmaco nel donatore impiegata per gli studi di rilascio dalle micelle cariche (500 µg/ml). I dati di rilascio ottenuti sono stati comparati con i profili di diffusione dei farmaci dalla soluzione e di dissoluzione e diffusione dei farmaci dalla sospensione. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e i risultati sono stati espressi in funzione del tempo di incubazione come percentuale di farmaco nel compartimento ricevente ( $\pm$  errore standard) rispetto alla quantità iniziale di farmaco caricato nel compartimento donatore, tenendo conto della procedura di diluizione. Per quantificare il DEX e il T all'interno dei campioni prelevati sono state condotte analisi spettrofotometriche, impiegando delle curve di calibrazione

costruite analizzando soluzioni standard di DEX e T in DPBS pH 7.4 in un range di concentrazione compreso tra 0.25 e 50 µg/ml, alla lunghezza d'onda di 240 nm ( $R^2_{\text{DEX}}$ : 0.999;  $R^2_{\text{T}}$ : 0.999). Per la quantificazione del TA è stato, invece, impiegato il metodo HPLC precedentemente descritto (paragrafo 3.2.1.7).

### **3.2.1.9 Studi di Stabilità**

La stabilità delle micelle cariche di farmaco è stata valutata sia sotto forma di dispersione in DPBS pH 7.4 che sotto forma di polvere liofilizzata.

Per la valutazione della stabilità delle micelle in dispersione, aliquote di micelle sono state disperse in DPBS pH 7.4 e poste a 4°C e a 25°C per 14 giorni. A intervalli di tempo prestabiliti (0, 3, 5, 7 e 14 giorni) le dispersioni sono state analizzate in termini di particle size e potenziale zeta. La quantità di micelle dispersa è stata scelta in base alla drug loading % in modo che la quota di farmaco in esse contenute fosse superiore alla sua massima solubilità in DPBS pH 7.4.

Per quanto riguarda la stabilità del liofilizzato, aliquote di micelle sono state conservate a 4°C e a 25°C. A intervalli di tempo prestabiliti (1, 2 e 3 mesi), il liofilizzato è stato disperso in DPBS pH 7.4 e analizzato in termini di particle size e potenziale zeta.

### **3.2.1.10 Saggio di Vitalità Cellulare *in vitro***

I saggi di vitalità sono stati condotti su cellule dell'epitelio corneale umano (HCEpiC – Human Corneal Epithelial Cells) e su cellule dell'epitelio pigmentato retinico umano (HRPE – Human Retinal Pigment Epithelial Cells) dopo trattamento con i polimeri e le micelle vuote. Le cellule primarie a passaggio 1-2 sono state piastrate in una piastra a 96 pozzetti (5000 cellule per pozzetto) e coltivate nel loro specifico terreno di coltura. Dopo 24 h, il mezzo di coltura è stato allontanato e rimpiazzato con 200 µl di mezzo di coltura fresco contenente una soluzione di polimero (5-100 µg/ml) o una dispersione micellare (150-700 µg/ml). Per la preparazione delle soluzioni/dispersioni da analizzare sono state innanzitutto preparata una soluzione polimerica (1 mg/ml) e una dispersione micellare (10 mg/ml) in DPBS pH 7.4, successivamente sterilizzata mediante filtrazione sterilizzante con filtro sterile di cellulosa acetofalto da 0.22 µm sotto cappa sterile. Il filtrato è stato, quindi, diluito in mezzo di coltura cellulare fino alle concentrazioni desiderate.

La vitalità delle cellule è stata monitorata mediante saggio MTS dopo 1, 4 e 24 h di trattamento per le HCEpiC e 24, 48 e 72 h di trattamento per le HRPE. Ai time points indicati, il mezzo contenente i polimeri o le micelle è stato allontanato dai pozzetti e rimpiazzato con 200 µl di mezzo di coltura fresco contenente il 20% di MTS. Le piastre a 96 pozzetti sono state, quindi, incubate a 37°C per altre 2 h. In seguito è stata valutata l'assorbanza dei vari pozzetti a 490 nm utilizzando un Microplate Reader.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e rapportati a un triplicato di cellule non trattate e usate, quindi, come controllo. I risultati sperimentali sono espressi come vitalità % rapportati al controllo che è stato posto come 100% di vitalità cellulare.

La stessa procedura è stata eseguita per testare il polimero e le micelle INU-EDA-RA sia su cellule dell'epitelio corneale che su cellule dell'epitelio pigmentato retinico murine, in collaborazione con i laboratori di ricerca del Prof. Giulio Gherzi.

### ***3.2.1.11 Studi di Uptake qualitativo in vitro***

Gli studi di *uptake* cellulare sono stati eseguiti su HCEpiC impiegando le micelle marcate con la sonda fluorescente e denominate INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>.

È stata innanzitutto preparata una dispersione madre di micelle marcate in DPBS pH 7.4 (2 mg/ml) successivamente sterilizzata su filtro sterile di cellulosa acetofalto da 0.22 µm sotto cappa sterile. La dispersione ottenuta è stata diluita 1:10 con mezzo per coltura cellulare al fine di ottenere la concentrazione micellare desiderata (200 µg/ml).

Le HCEpiC per lo studio di uptake sono state seminate in una piastra a 8 pozzetti (20000 cellule/pozzetto) con 200 µl di mezzo di coltura cellulare. Dopo 24 h, il mezzo è stato allontanato e rimpiazzato con la dispersione fresca di micelle marcate diluite in mezzo cellulare, precedentemente descritta.

Ai time points predefiniti le cellule sono state lavate con DPBS, fissate e colorate con DAPI al fine di evidenziare i nuclei cellulari. Successivamente mediante microscopia a fluorescenza sono state acquisite le immagini relative all'uptake. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e rapportati a un triplicato di cellule non trattate con micelle fluorescenti ma colorare solo con DAPI e quindi usate come controllo.

Inoltre, per quanto riguarda le micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> è stato valutato l'uptake cellulare anche su cellule dell'epitelio corneale murino e su cellule dell'epitelio



pigmentato retinico sia umano che murino, in collaborazione con i laboratori di ricerca del Prof. Giulio Gherzi. In questo caso le immagini sono state ottenute mediante microscopia confocale.

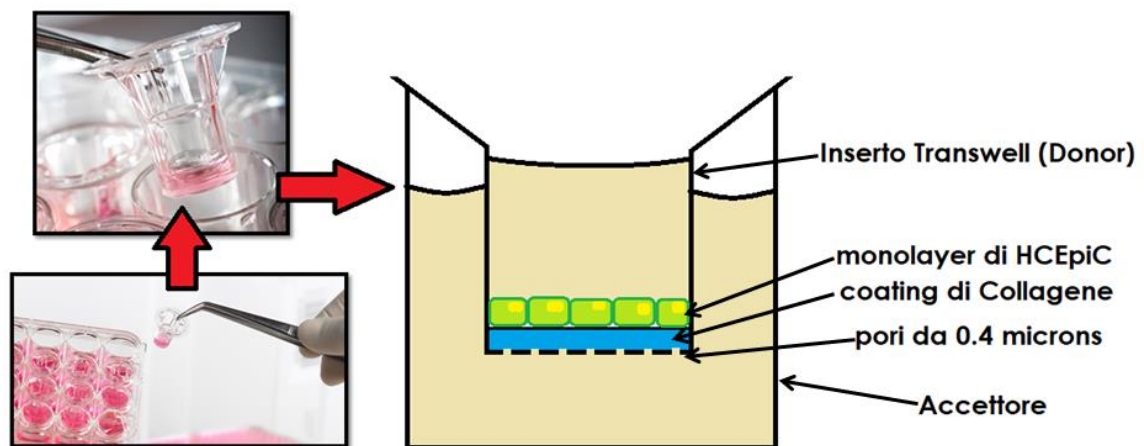
### **3.2.1.12 Studi di Permeazione Transcorneale *in vitro***

Gli studi di permeazione transcorneale *in vitro* sono stati condotti utilizzando un sistema sperimentale in grado di riprodurre parzialmente la barriera corneale: si tratta dei sistemi transwell (6.5 mm Transwell-PTFE membrane insert, Corning).

Il transwell (**Fig. 28**) rappresenta un modello a due compartimenti costituito da:

- ☉ camera apicale o donor (l'inserto transwell propriamente detto) avente come base una membrana microporosa e, nel caso specifico scelto, ricoperta da un coating di collagene;
- ☉ camera basolaterale o accettrice sottostante costituita dal pozzetto della piastra scelta.

Le cellule vengono piastrate sul transwell e sono coltivate fino a confluenza in modo da ottenere un monolayer cellulare continuo.



**Figura 28. Rappresentazione schematica di un sistema transwell**

Le HCEpiC sono state, quindi, seminate sul transwell (100000 cellule per pozzetto; area del pozzetto  $0.33 \text{ cm}^2$ ; dimensione dei micropori  $0.4 \text{ }\mu\text{m}$ ) ponendo nella camera apicale un volume totale di  $150 \text{ }\mu\text{l}$  di mezzo cellulare e, nella camera basolaterale  $650 \text{ }\mu\text{l}$  di mezzo di

coltura fresco. A seguito di attecchimento cellulare e confluenza il mezzo nella camera apicale è stato rimpiazzato con 150  $\mu$ l di dispersione micellare (micelle fluorescenti: 200  $\mu$ g/ml; micelle cariche di farmaco: 100  $\mu$ g/ml in termini di contenuto di farmaco). A intervalli di tempo predefiniti (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min) aliquote da 200  $\mu$ l sono state prelevate dal compartimento accettore e immediatamente rimpiazzate con un identico volume di mezzo cellulare fresco al fine di mantenere le condizioni sink del sistema. Al termine dell'esperimento, è stato prelevato anche il fluido residuo nella camera donatrice. I campioni prelevati dagli studi di permeazione condotti sulle micelle fluorescenti sono stati immediatamente analizzati mediante analisi spettrofluorimetrica ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 485 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 520 nm). Tutti gli altri campioni sono stati, invece, congelati e liofilizzati, quindi trattati con 200  $\mu$ l di solvente organico (DMF<sub>a</sub> per il DEX e metanolo per T e TA) al fine di estrarre il farmaco in essi contenuto e, successivamente, analizzati mediante HPLC come precedentemente descritto. La stessa procedura è stata eseguita per valutare il profilo di permeazione transcorneale *in vitro* dei farmaci liberi in soluzione alla loro massima solubilità (50  $\mu$ g/ml per DEX e TA, 25  $\mu$ g/ml. Per il TA è stata prima preparata una soluzione madre in metanolo e quindi diluito in mezzo di coltura cellulare). I risultati sono riportati come  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> di farmaco permeati in funzione del tempo. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Inoltre, per quanto riguarda le micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e le micelle INU-EDA-RA cariche di farmaco, gli stessi studi sono stati condotti impiegando cellule dell'epitelio corneale murino, in collaborazione con i laboratori del Prof. Giulio Gherzi. In questo caso, però gli esperimenti sono stati condotti per un tempo complessivo pari a 3 h, in quanto è stato osservato solo fino a quel momento lo steady state.

### ***3.2.1.13 Studi di Permeazione Transcorneale ex vivo***

#### ***Estrazione del tessuto corneale***

I campioni corneali sono stati ricavati da bulbi oculari bovini rimossi subito dopo il sacrificio di bovini domestici. Tutti I tessuti animali sono stati ottenuti dall'Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A. Mirri" (Palermo) dietro autorizzazione del Dipartimento locale di Prevenzione Veterinaria (ASP-Palermo). Immediatamente dopo essere stati prelevati, i campioni sono stati trasferiti in contenitori refrigerati per consentirne il

trasporto ai laboratori del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) entro 1 ora. I bulbi oculari bovini freschi e interi sono stati posti per circa 2 h in una soluzione di DPBS pH 7.4 contenente lo 0.2% di penicillina/streptomicina.

I campioni di cornea bovina sono stati, quindi, prelevati mediante asportazione della parte anteriore del bulbo oculare e successivo distacco manuale, mediante l'ausilio di una pinzetta, della cornea integra dal sottostante iride.

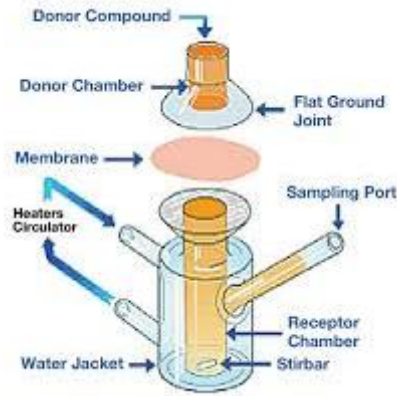
Le cornee così ricavate sono state lavate in HEPES e utilizzate fresche per gli esperimenti di permeazione transcorneale *ex vivo*.

### ***Set up del modello ex vivo***

Per valutare l'attitudine di farmaci liberi o veicolati a permeare la membrana corneale, il modello sperimentale scelto è stato quello delle celle di diffusione verticale di Franz.

La cella di Franz (**Fig. 29**) rappresenta un modello a due compartimenti aperti ed è strutturata come segue:

- ☉ Compartimento donatore, all'interno del quale vengono introdotte le soluzioni di farmaco o le dispersioni di micelle polimeriche cariche di farmaco in HEPES pH 7.4;
- ☉ Compartimento accettore, contenente una soluzione tampone (HEPES pH 7.4) che simula il fluido biologico in cui il farmaco può trasferirsi;
- ☉ Membrana, costituita dalle cornee bovine precedentemente preparate e collocate in modo da separare i compartimenti accettore e donatore;
- ☉ Braccio laterale, comunicante con il compartimento accettore, per il prelievo dei campioni da analizzare;
- ☉ Camicia esterna di termostatazione, per garantire il mantenimento della corretta temperatura per tutta la durata dell'esperimento.



**Figura 29. Rappresentazione schematica di una cella di Franz verticale**

Inoltre, all'interno del compartimento accettore viene posto un agitatore magnetico, al fine di mantenere omogenea la concentrazione della soluzione accettrice.

Al fine di garantire l'efficacia del modello sperimentale scelto sono state inizialmente impiegate due molecole modello: il diclofenac sale sodico (modello di molecola in grado di attraversare la barriera corneale) e la fluoresceina sale sodico (modello di molecola incapace di attraversare la barriera corneale).

La cornea è stato interposta tra il compartimento accettore e il compartimento donatore, entrambi riempiti con HEPES pH 7.4. Dopo 15 minuti di condizionamento alla temperatura di  $35 \pm 0,5$  °C, è stata rimossa la quota di soluzione presente nel compartimento donatore che è stato, quindi, opportunamente caricato con 300 µl di una soluzione 1 mg/ml di diclofenac sale sodico (DICL) o fluoresceina sale sodico (FLUO) in HEPES pH 7.4.

Gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di  $35 \pm 0,5$  °C, al fine di mimare le condizioni in vivo, sotto continua agitazione e, nel caso della FLUO al riparo dalla luce, per un tempo pari a 3 h. Ad intervalli di tempo regolari sono stati prelevati dal compartimento accettore campioni di fluido di volume pari a 300 µl per quanto riguarda il set di esperimenti relativi alla permeazione del DICL e 200 µl per quelli inerenti la FLUO. I volumi prelevati sono stati immediatamente sostituiti con un'identica quantità di fluido accettore fresco per mantenere le condizioni sink del sistema. I campioni prelevati sono stati subito analizzati. Al termine di ogni esperimento è stata effettuata l'estrazione del DICL e della FLUO eventualmente intrappolati nel tessuto corneale.

La cornea, proveniente dal test di permeazione, è stata lavata con HEPES fresco al fine di eliminare eventuali residui di DICL o FLUO presenti sulla superficie. Successivamente il tessuto è stato posto in 2 ml di etanolo (per l'estrazione della FLUO) o dimetilsolfossido (per l'estrazione del DICL) alla temperatura di 25 °C per 3 h.

I campioni relativi alla permeazione del DICL sono stati sottoposti a determinazione spettrofotometrica, utilizzando per la quantificazione del DICL la relativa curva di taratura in HEPES e DMSO costruita impiegando un range di concentrazione compreso tra 0.5 e 3 x 10<sup>-4</sup> mg/ml (R<sup>2</sup> = 0.999).

I campioni relativi alla permeazione della FLUO sono stati sottoposti a determinazione spettrofluorimetrica impiegando un PlateReader AF2200 e come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 520 nm e 485 nm. La quantificazione della FLUO è stata effettuata utilizzando la relativa curva di taratura in HEPES e etanolo costruita impiegando un range di concentrazione compreso tra 1 x 10<sup>-3</sup> e 1 x10<sup>-6</sup> mg/ml (R<sup>2</sup> = 0.996).

I risultati ottenuti sono la media di sei esperimenti.

### ***Permeazione transcorneale***

Gli esperimenti di permeazione transcorneale *ex vivo* di DEX, T e TA in soluzione, sospensione o caricati all'interno delle micelle sono stati condotti, come precedentemente illustrato, impiegando celle di Franz e cornee bovine.

In particolare, dopo aver fatto equilibrare il sistema, il donor è stato caricato con 300 µl di:

- ☉ Soluzione di DEX, T e TA alla loro massima solubilità in HEPES pH 7.4 (50 µg/ml per DEX e T; 25 µg/ml per TA previa preparazione di una soluzione madre in metanolo e successiva diluzione 1:100 in HEPES pH 7.4),
- ☉ Sospensione di DEX, T e TA con caricamento di una quota totale di farmaco pari a 500 µg/ml,
- ☉ Dispersione micellare di INU-EDA-RA/DEX, INU-EDA-RA-PEG/DEX, INU-ERA-RA/T, INU-EDA-RA-PEG/T, INU-EDA-RA/TA e INU-EDA-RA-PEG/TA ad una concentrazione tale da avere nel donor una quantità iniziale di farmaco pari a 500 µg/ml,

- Dispersione micellare di INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>.

Gli esperimenti sono stati condotti a  $35 \pm 0,5$  °C per 6 h, prelevando agli opportuni time points (15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 e 360 min) 200 µl di fluido accettore e rimpiazzandoli immediatamente con HEPES pH 7.4 fresco. I campioni prelevati dagli studi di permeazione *ex vivo* delle micelle fluorescenti sono stati immediatamente analizzati utilizzando un PlateReader AF2200 e come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 520 nm e 485 nm. La quantificazione delle micelle marcate con la sonda fluorescente è stata effettuata utilizzando la relativa curva di taratura in HEPES costruita impiegando un range di concentrazione compreso tra  $5 \times 10^{-7}$  e 1 mg/ml ( $R^2_{\text{INU-EDA-RA}} = 0.996$ ;  $R^2_{\text{INU-EDA-RA-PEG}} = 0.995$ ). I campioni prelevati dagli studi di permeazione *ex vivo* dei farmaci in soluzione, sospensione o dispersione micellare sono stati, invece, immediatamente congelati e liofilizzati. Il liofilizzato è stato, quindi, trattato con solvente organico in modo da estrarre il farmaco (DMF<sub>a</sub> per il DEX e metanolo per T e TA) che è stato successivamente quantificato mediante analisi HPLC, come precedentemente descritto.

### ***Valutazione della quantità di farmaco penetrata a livello corneale***

La cornea, proveniente dal test di permeazione, è stata lavata con HEPES fresco al fine di eliminare eventuali residui di farmaco o micelle presenti sulla superficie. Successivamente il tessuto è stato posto in 2 ml di DMF<sub>a</sub> (per l'estrazione delle micelle fluorescenti e del del DEX) o metanolo (per l'estrazione di T e TA) alla temperatura di 37 °C e sotto continua agitazione overnight.

Per la quantificazione delle micelle fluorescenti sono state effettuate misure spettrofluorimetriche con lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 520 nm e 485 nm, utilizzando le relative curve di taratura in DMF<sub>a</sub> costruite impiegando un range di concentrazione compreso tra  $5 \times 10^{-7}$  e 1 mg/ml ( $R^2_{\text{INU-EDA-RA}} = 0.998$ ;  $R^2_{\text{INU-EDA-RA-PEG}} = 0.999$ ). Per la quantificazione del farmaco estratto dal tessuto corneale sono state eseguite analisi HPLC, come precedentemente descritto.

Inoltre al termine dei test di permeazione è stato anche prelevato il donore dal quale è stato estratto il farmaco residuo al fine di valutare se la somma del farmaco residuo nel

donor + farmaco permeato + farmaco intrappolato nel tessuto corneale fosse effettivamente pari alla quantità di farmaco inizialmente caricata.

#### **3.2.1.14 Modelli matematici**

Il flusso dei farmaci ( $J_s$ ) attraverso il monolayer cellulare (studi *in vitro*) o il tessuto corneale (studi *ex vivo*) è stato calcolato allo steady state per unità di superficie mediante analisi di regressione lineare dei dati di permeazione, secondo la seguente equazione:

$$J_s = Q / (A \cdot t) \text{ (}\mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$$

dove  $Q$  è la quantità di farmaco in grado di attraversare attraverso il layer cellulare o il tessuto corneale ( $\mu\text{g}$ ) e raggiungere il compartimento accettore,  $A$  è la superficie effettivamente coinvolta nel processo di permeazione ( $0.33 \text{ cm}^2$  per i sistemi transwell e  $1.1304 \text{ cm}^2$  per le celle di Franz) e  $t$  è il tempo di esposizione (h). Allo steady state  $J_s$  è uguale al coefficiente angolare della retta che si ottiene diagrammando la quantità di farmaco permeata per unità di superficie ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) in funzione del tempo (h). Il coefficiente di permeabilità ( $K_p$ ) è stato, quindi, calcolato impiegando la seguente equazione:

$$K_p = J_s / C_d \text{ (cm/h)}$$

dove  $C_d$  è l'effettiva concentrazione di farmaco caricata nel compartimento donatore ( $\mu\text{g/cm}^3$ ). Nello specifico, per calcolare i valori di  $K_p$  per gli studi *ex vivo* delle sospensioni o dispersioni micellari di farmaco, sono stati impiegati i valori indicati come  $C_d^*$ .  $C_d^*$  è la reale concentrazione di farmaco nel compartimento donatore ( $\mu\text{g/cm}^3$ ) tenendo conto dell'effettiva quantità di farmaco che attraversa la membrana da dialisi in 6 h, impiegando, quindi, i risultati ottenuti per i test di rilascio *in vitro*, quando l'interno della dialisi è caricato con una sospensione di farmaco o con una dispersione micellare (De Caro V et al. 2015).

In maniera analoga, per gli studi *ex vivo*, la quantità di farmaco intrappolata ( $D_e$ ) all'interno del tessuto corneale per unità di superficie al termine di ogni esperimento di permeazione è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$De = Q / A (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$$

dove Q è la quantità di farmaco che rimane intrappolata nel tessuto corneale ( $\mu\text{g}$ ) e è la superficie effettivamente coinvolta nel processo di permeazione ( $1.1304 \text{ cm}^2$  per le celle di Franz). Il coefficiente di accumulo (Ka) è stato, quindi, calcolato, secondo la seguente equazione:

$$Ka = De / Cd (\text{cm})$$

dove Cd è l'effettiva concentrazione di farmaco caricata nel compartimento donatore ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ). Nello specifico, per calcolare i valori di Ka per gli studi *ex vivo* delle sospensioni o dispersioni micellari di farmaco, sono stati impiegati i valori indicati come Cd\*, come precedentemente descritto.



### ***3.2.2 Micelle polimeriche di natura polisaccaridica Vs Micelle polimeriche di natura poliamminoacidica: variazione dell'effetto enhancer nei confronti dell' $\gamma$ -matinib***

#### ***3.2.2.1 Sintesi Polimerica e Caratterizzazione Spettroscopica***

Questo studio ha previsto l'impiego di quattro derivati polimerici anfifilici derivanti dall'inulina e dalla  $\alpha,\beta$ -poly(N-2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamide (PHEA) denominati INU-EDA-RA, INU-EDA-RA-PEG, PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG. La sintesi e la caratterizzazione dei primi due polimeri è illustrata nel paragrafo 3.2.1.1. Riporteremo adesso l'analoga procedura sintetica messa a punto per la produzione dei due derivati anfifilici del PHEA.

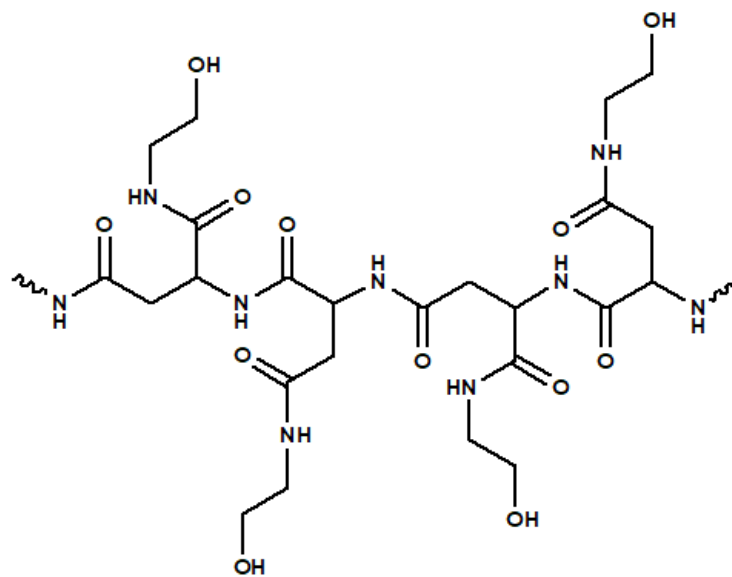
Anche in questo caso si tratta di una procedura multi step che ha previsto l'isolamento di differenti intermedi.

La sintesi della polisuccimide (PSI) a partire dall'acido aspartico, così come la sintesi del PHEA, sono state condotte impiegando metodiche ormai consolidate e riportate in letteratura (*Giammona G et al. 1987*).

Il primo step comporta la sintesi, già nota presso il laboratorio di ricerca ove questo lavoro è stato svolto, del derivato PHEA-EDA (**Schema 4**) (*Licciardi M et al. 2006*). Brevemente, al PHEA (500 mg; 3.16 mmol) solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (6 ml) è stato aggiunto il bis(4-nitrofenil) carbonato (4-BNPC) (481.34 mg; 1.58 mmol), previamente solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (4 ml), impiegato al fine di attivare i gruppi ossidrilici del PHEA. La reazione di attivazione è stata quindi condotta a 40° per 4 h. Successivamente, al PHEA attivato è stata lentamente addizionata l'etilendiammina (EDA) (530  $\mu$ l, 7.91 mmol), e la miscela di reazione è lasciata a 25°C per 4 h sotto costante agitazione. Il work up della reazione consiste nella precipitazione del prodotto ottenuto in acetone. Seguono tre lavaggi nel medesimo solvente al fine di rimuovere l'eccesso di 4-BNPC e EDA che non hanno reagito. In seguito, il prodotto secco viene solubilizzato in acqua bidistillata e purificato mediante dialisi (RC; 12-14 kDa), quindi congelato e liofilizzato.

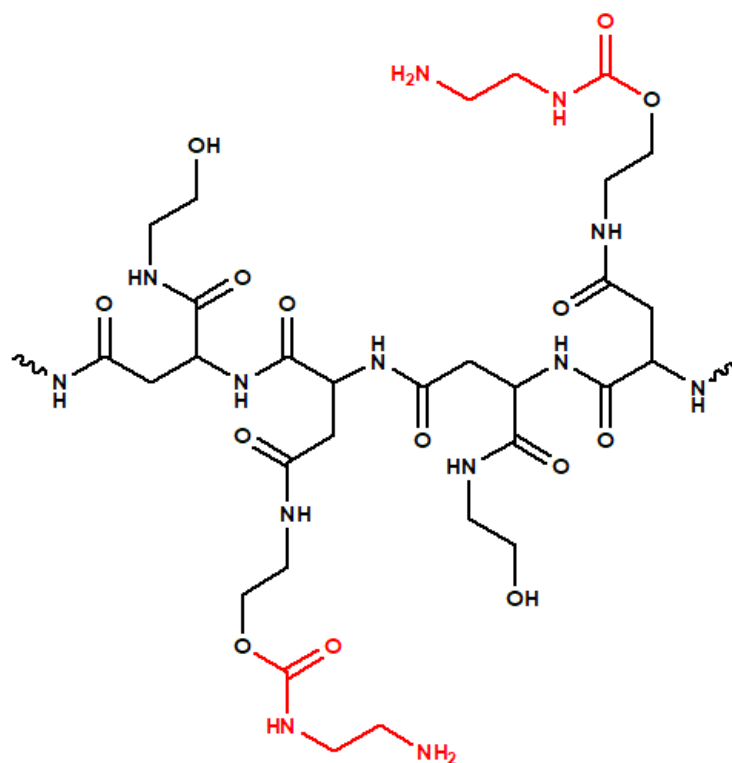
Resa percentuale in peso rispetto al PHEA di partenza: 80%.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz):  $\delta$  3.498 ( $2\text{H}_{\text{PHEA}}$  - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ),  $\delta$  3.967 ( $2\text{H}_{\text{EDA}}$ , - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ).



1. 4-BNPC, DMF<sub>a</sub>  
- 40°C, 4 h

2. EDA, DMF<sub>a</sub>  
- 25°C, 3 h



$$R = \frac{\text{mmol 4-BNPC}}{\text{mmol U.R. PHEA}} = 0.5$$

$$R' = \frac{\text{mmol EDA}}{\text{mmol 4-BNPC}} = 5$$

Schema 4. Sintesi di PHEA-EDA

Il derivato PHEA-EDA ottenuto è stato poi ulteriormente processato impiegando, come agente idrofobizzante, l'acido all-trans retinoico (RA) al fine di ottenere il derivato anfifilico PHEA-EDA-RA (**Schema 5**).

L'RA (15.2 mg; 0.0506 mmol) è stato solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (1 ml) e, successivamente, sono stati aggiunti l'1-etil-3-(dimetilamminopropil)carbodiimide cloruro (EDC·HCl) (14.55 mg; 0.0759 mmol) e N-idrossisuccimide (NHS) (8.74 mg; 0.0759 mmol) solidi e la trietilammina (TEA; 8 µl), al fine di attivare il gruppo carbossilico dell'RA. La reazione è condotta a 25°C per 4 h al riparo dalla luce. Al termine della reazione di attivazione, l'RA attivato viene aggiunto al PHEA-EDA (100 mg; 0.506 mmol) previamente solubilizzato in una miscela DMF<sub>a</sub> (3 ml)/acqua bidistillata (300 µl), e la miscela di reazione è lasciata a 25°C overnight (~18 h) e al riparo dalla luce. Il work up della reazione consiste nella precipitazione del prodotto ottenuto in una miscela costituita da etere dietilico e diclorometano in rapporto 2:1 (v/v). Seguono 3 lavaggi del precipitato nella stessa miscela di precipitazione al fine di allontanare tutto l'RA che non ha reagito. Il prodotto secco viene, quindi, disperso in acqua bidistillata e purificato dall'eccesso di EDC·HCl ed NHS mediante dialisi (RC; 12-14 kDa). Al termine della dialisi il prodotto è congelato e liofilizzato.

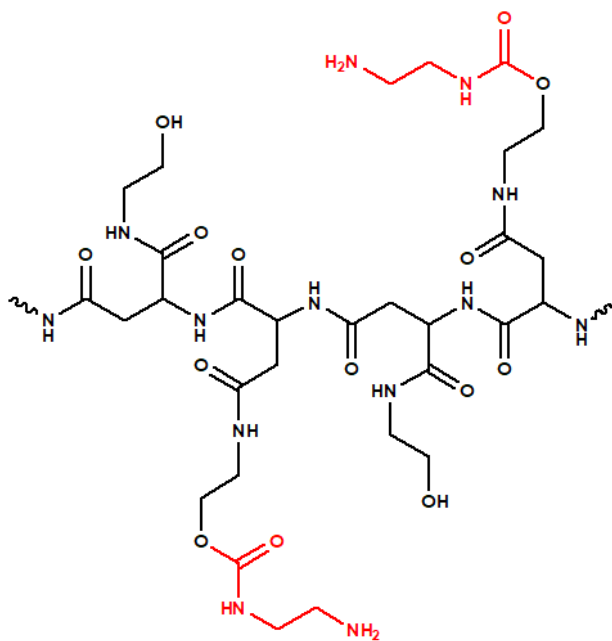
Resa percentuale in peso rispetto all'INU-EDA di partenza: 83%.

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>, 300 MHz): δ 1.268 (6H<sub>RA</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-), δ 1.696 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.816 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.949 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 2.256 (5H<sub>RA</sub> - CH<sub>2</sub>-C-C-CH<sub>3</sub>), δ 2.590 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 3.525-3.805 (4H<sub>PHEA</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

Ulteriore step sintetico consiste nella successiva funzionalizzazione del PHEA-EDA-RA ottenuto con PEG<sub>2000</sub> (**Schema 6**). Il PHEA-EDA-RA (100 mg; 0.455 mmol) è stato disperso in acqua bidistillata (3 ml) e il pH della dispersione è portato a 6.5 con HCl 0.1 N. Successivamente è aggiunto il CHO-PEG<sub>2000</sub> (18.2 mg; 0.0091 mmol) solido al fine di creare una base di Schiff coinvolgendo i gruppi amminici primari dell'EDA e il gruppo aldeidico del CHO-PEG<sub>2000</sub>. Il pH della miscela di reazione viene, quindi, nuovamente portato a 6.5 con HCl 0.1 N e, una volta stabilizzatosi, la miscela è lasciata reagire overnight (~18 h) a 25°C al riparo dalla luce. Il work up della reazione consiste nell'immediata purificazione del prodotto crudo mediante GPC impiegando come fase stazionaria una colonna Sephadex G25 e come fase mobile acqua bidistillata. Le frazioni raccolte sono, dunque, congelate e liofilizzate.

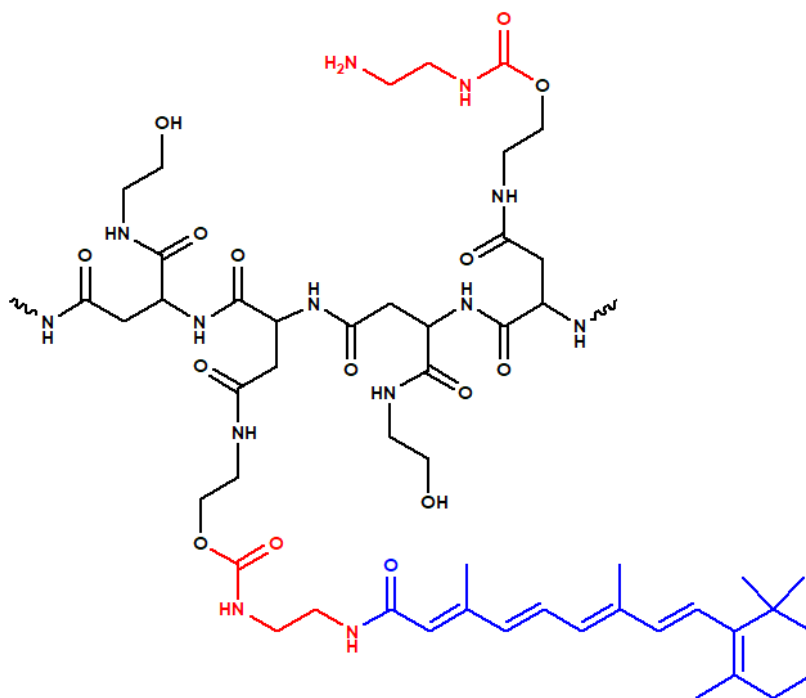
Resa percentuale in peso rispetto all'INU-EDA-RA di partenza: 99%.

$^1\text{H-NMR}$  (DMF- $d_7$ , 300 MHz):  $\delta$  1.254 ( $6\text{H}_{\text{RA}}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-C-}$ ),  $\delta$  1.692 ( $2\text{H}_{\text{RA}}$ ,  $-\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ),  $\delta$  1.818 ( $2\text{H}_{\text{RA}}$ ,  $-\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ),  $\delta$  1.945 ( $3\text{H}_{\text{RA}}$ ,  $-\text{C-CH}_3$ ),  $\delta$  2.255 ( $5\text{H}_{\text{RA}}$  –  $\text{CH}_2\text{-C-C-CH}_3$ ),  $\delta$  2.578 ( $3\text{H}_{\text{RA}}$ ,  $-\text{C-CH}_3$ ),  $\delta$  3.532 ( $2\text{H}_{\text{PHEA}}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ),  $\delta$  3.820 ( $180\text{H}_{\text{PEG}}$ ,  $[-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}]_{45}$ ).



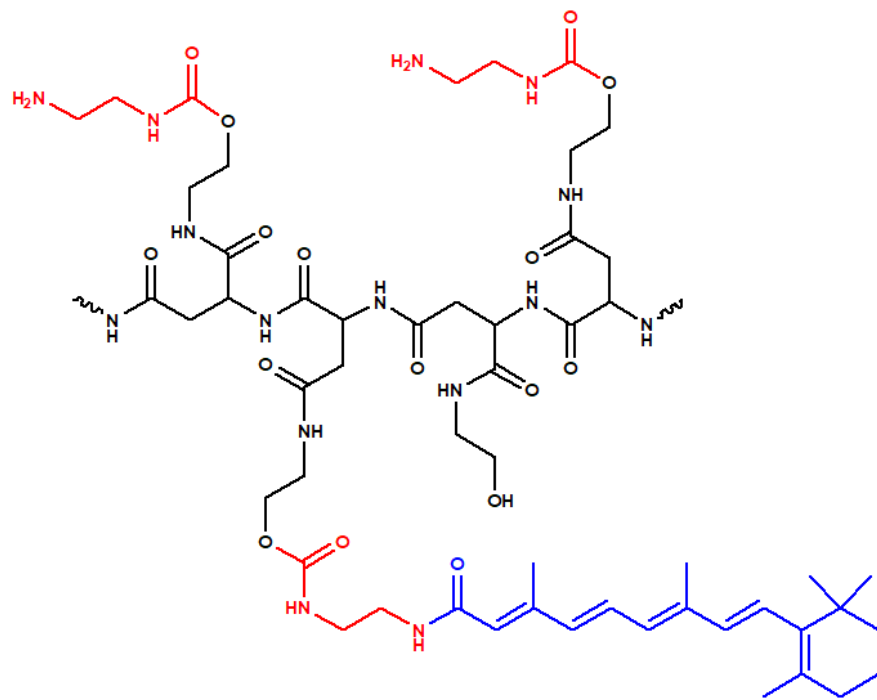
1. RA, EDC·HCl,  
NHS, TEA, DMF  
- al riparo dalla  
luce, 25°C, 4 h

2. al riparo dalla luce,  
overnight, 25°C

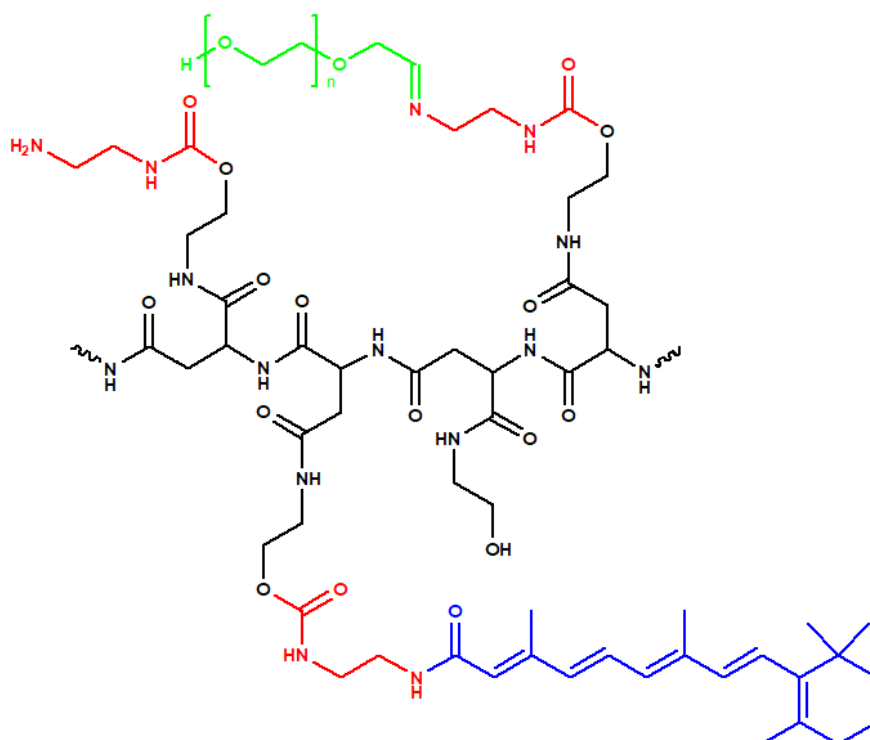


$$R = \frac{\text{mmol RA}}{\text{mmol U.R. PHEA-EDA}} = 0.10 \quad R' = \frac{\text{mmol EDC}\cdot\text{HCl}}{\text{mmol RA}} = 1.5 \quad R'' = \frac{\text{mmol NHS}}{\text{mmol RA}} = 1.5$$

Schema 5. Sintesi di PHEA-EDA-RA



PEG2000, acqua bidistillata pH 5-6  
 - al riparo dalla luce, overnight, 25°C



$$R = \frac{\text{mmol PEG2000}}{\text{mmol U.R. PHEA-EDA-RA}} = 0.02$$

**Schema 6. Sintesi di PHEA-EDA-RA-PEG**

In realtà sono state condotte differenti procedure sintetiche per l'ottenimento del derivato PHEA-EDA-RA variando la quantità di RA posto a reagire, al fine ultimo di ottenere un derivato anfifilico avente valori di CAC paragonabili al suo analogo INU-EDA-RA. Le quantità ivi riportate rappresentano dunque quelle scelte per la sintesi dell'opportuno derivato PHEA-EDA-RA.

I derivati ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi spettrofotometrica (UV-VIS) e infrarossa (ATRFT-IR).

Le analisi spettrofotometriche sono state condotte nel range 200-600 nm impiegando soluzioni standard alla concentrazione di 0.1 mg/ml, cioè inferiore al valore di CAC (vedi paragrafo 3.3.1.2).

Le analisi infrarosse sono state condotte utilizzando la tecnica in Riflettanza Totale Attenuata (ATR) impiegata per l'analisi superficiale di campioni solidi. Gli spettri ATRFT-IR sono stati registrati nel range 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  (numero di scansioni = 32).

### ***3.2.2.2 Valutazione della Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC)***

La valutazione della capacità di self-assembling dei derivati anfifilici del PHEA è stata eseguita mediante saggio al pirene, come illustrato nel paragrafo 3.2.1.2, analizzando concentrazioni crescenti di polimeri (da  $4 \times 10^{-4}$  mg/ml a 2 mg/ml).

Gli spettri di emissione di fluorescenza del pirene sono registrati impiegando come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 373 nm e 333 nm.

### ***3.2.2.3 Preparazione delle Micelle Polimeriche vuote e cariche di Imatinib***

Sia le micelle vuote (PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG) che le micelle cariche di imatinib (PHEA-EDA-RA/IMA e PHEA-EDA-RA-PEG/IMA) sono state preparate con la tecnica di mortaio e pestello. Una quantità di PHEA-EDA-RA o PHEA-EDA-RA-PEG accuratamente pesata (50 mg) è stata posta in un mortaio e dispersa in una miscela acetone/THF, successivamente, per la preparazione delle micelle cariche, è stata aggiunta un'opportuna quantità di farmaco solido (25 mg). Con l'ausilio del pestello è stata dapprima consentita la completa dissoluzione del farmaco e, successivamente, è stata completamente allontanata la miscela di solventi organici impiegati fino ad assistere alla

creazione di un film continuo di polimero e farmaco che è stato, quindi, reidratato con acqua bidistillata. La dispersione ottenuta è stata trasferita in un vial e mantenuta a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione per 24 h, al riparo dalla luce. La dispersione micellare è stata, quindi, centrifugata al fine di purificare le micelle cariche dal farmaco libero non incapsulato. Questo metodo di purificazione è supportato dalla scarsa solubilità in acqua dell'imatinib (massima solubilità in ambiente acquoso < 30 µg/ml). Dopo la purificazione, la dispersione micellare è stata filtrata attraverso un filtro di nylon da 0.8 µm e, in seguito, liofilizzata.

La resa in peso ottenuta per le micelle vuote e per le micelle cariche di farmaco, calcolata rispetto alla quantità iniziale di polimero impiegata, è risultata rispettivamente pari al 100% e superiore al 100%.

#### ***3.2.2.4 Preparazione delle Micelle Polimeriche Fluorescenti***

Le micelle polimeriche vuote sono state marcate con la sonda fluorescente Alexa Fluor<sub>488</sub>, seguendo la procedura illustrata al paragrafo 3.2.1.4.

Resa percentuale in peso, rispetto alle micelle impiegate in partenza, pari all'97.50% e al 98.30% rispettivamente per le micelle PHEA-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e PHEA-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>.

#### ***3.2.2.5 Studi di Dynamic Light Scattering (DLS) e Z-potential***

Le misure di DLS e di potenziale zeta sono state registrate a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  impiegando dispersione acquose di micelle (0.5 mg/ml) sia vuote che cariche di farmaco previamente filtrate su filtri da 5 µm di cellulosa acetofalato, come illustrato al paragrafo 3.2.1.5.

#### ***3.2.2.6 Studi di Mucoadesione***

Gli studi di mucoadesione sono stati condotti con i metodi del potenziale zeta e della turbidimetria. Per il metodo del potenziale zeta sono state impiegate concentrazioni fisse sia di micelle (1 mg/ml) che di mucina (0.4 mg/ml), mentre per il metodo turbidimetrico è stata mantenuta fissa solo la concentrazione della mucina (1 mg/ml) ma sono state



analizzate concentrazioni crescenti di micelle (0.5, 1 e 5 mg/ml), come illustrato al paragrafo 3.1.2.6.

Gli stessi esperimenti sono stati condotti anche per valutare la forza mucoadesiva del PHEA e del PHEA-EDA.

### **3.2.2.7 Valutazione della Drug Loading %**

Per valutare la quantità di farmaco incorporata all'interno delle micelle sono state condotte analisi HPLC.

Una quantità accuratamente pesata di micelle (5 mg) è stata dispersa in metanolo e mantenuta sotto agitazione costante per 3 ore. Successivamente, la dispersione è stata filtrata attraverso un filtro in nylon da 0.22 µm, trasferita all'interno di un matraccio da 5 ml e quindi portata a volume con metanolo. La quantità di IMA caricata all'interno delle micelle è stata determinata mediante cromatografia su fase inversa impiegando la colonna Luna Phenomenex C18 precedentemente descritta come FS e una fase mobile costituita da metanolo. Il flusso è stato impostato a 0.8 ml/min e la lunghezza d'onda del detector UV è stata settata a 261 nm. In queste condizioni, il tempo di ritenzione del farmaco è pari a 4.0 min. La quantificazione dell'IMA contenuto all'interno delle micelle è stata effettuata utilizzando le relative curve di taratura costruite impiegando un range di concentrazione compreso tra  $1 \times 10^{-4}$  e 1 mg/ml ( $R^2=0.999$ ).

La quantità di farmaco incapsulata all'interno delle micelle è stata espressa come contenuto di farmaco (mg) in 100 mg di micelle cariche di farmaco.

### **3.2.2.8 Studi di Rilascio *in vitro***

Per gli studi di rilascio *in vitro* del farmaco è stato impiegato il metodo delle dialisi, come illustrato nel paragrafo 3.2.1.8. Un'appropriata quantità di micelle cariche di farmaco (concentrazione di IMA nel compartimento donatore pari a 500 µg/ml) è stata dispersa in DPBS pH 7.4 (800 µl) e posta all'interno di una membrana da dialisi in RC (SpectraPore; cut off 1 kDa). La dialisi è stata, quindi, immersa in DPBS pH 7.4 (8 ml), incubata a 37°C sotto continua agitazione (100 rpm) in orbital shaker per 48 ore e sottoposta a prelievi di aliquote da 1 ml, immediatamente rimpiazzate con la stessa quantità di DPBS pH 7.4 fresco. Analogamente è stato determinato il profilo di diffusione del

farmaco libero dalla dialisi preparando una soluzione di IMA (2.5 mg in 10 ml di metanolo, concentrazione: 250 µg/ml) poi diluita 1:10 con DPBS pH 7.4 (concentrazione finale: 25 µg/ml) in modo da impedire la precipitazione del farmaco. Inoltre, sono stati eseguiti test di dissoluzione e diffusione *in vitro* caricando nel compartimento donatore una sospensione di farmaco preparata in modo da ottenere la medesima quantità di farmaco nel donor impiegata per gli studi di rilascio dalle micelle cariche (500 µg/ml). Per quantificare il farmaco presente nei campioni prelevati sono state condotte analisi spettrofotometriche impiegando delle curve di calibrazione costruite analizzando soluzioni standard di farmaco in DPBS pH 7.4 in un range di concentrazione compreso tra 0.25 e 25 µg/ml, alla lunghezza d'onda di 257 nm (R: 0.999). I dati di rilascio ottenuti sono stati trattati ed espressi come già illustrato.

### ***3.2.2.9 Saggio di Vitalità Cellulare in vitro***

I saggi di vitalità sono stati condotti su cellule dell'epitelio corneale umano (HCEpiC – Human Corneal Epithelial Cells) e su cellule dell'epitelio pigmentato retinico umano (HRPE – Human Retinal Pigment Epithelial Cells) dopo trattamento con i polimeri e le micelle vuote, seguendo la stessa metodica descritta al paragrafo 3.2.1.10. Sono state testate soluzione di polimero (5-100 µg/ml) una dispersione micellare (150-700 µg/ml) in mezzo di coltura cellulare preparate a partire soluzioni polimeriche e dispersioni micellari in DPBS pH 7.4 più concentrate (rispettivamente 1 mg/ml e 10 mg/ml) e sterilizzate mediante filtrazione sterilizzante con filtro sterile di cellulosa acetofalto da 0.22 µm sotto cappa sterile.

La vitalità delle cellule è stata monitorata mediante saggio MTS dopo 1, 4 e 24 h di trattamento per le HCEpiC e 24, 48 e 72 h di trattamento per le HRPE.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e rapportati a un triplicato di cellule non trattate e usate, quindi, come controllo. I risultati sperimentali sono espressi come vitalità % rapportati al controllo che è stato posto come 100% di vitalità cellulare.

### ***3.2.2.10 Studi di Uptake qualitativo in vitro***

Gli studi di *uptake* cellulare sono stati eseguiti su HCEpiC impiegando le micelle marcate con la sonda fluorescente Alexa Fluor<sub>488</sub>.

Una dispersione madre di micelle marcate in DPBS pH 7.4 (2 mg/ml) è stata sterilizzata su filtro sterile di cellulosa acetofalto da 0.22  $\mu\text{m}$  sotto cappa sterile e diluita 1:10 con mezzo per coltura cellulare al fine di ottenere la concentrazione micellare desiderata (200  $\mu\text{g/ml}$ ).

Le HCEpiC sono state quindi trattate con le diverse dispersioni micellari per tempi predefiniti e, quindi, lavate con DPBS, fissate e colorate con DAPI, come descritto al paragrafo 3.2.1.11. Le immagini sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza e rapportate a campioni di cellule non trattate con micelle fluorescenti ma colorare solo con DAPI e quindi usate come controllo.

### ***3.2.2.11 Studi di Permeazione Transcorneale in vitro***

Gli esperimenti di permeazione transcorneale *in vitro* sono stati condotti utilizzando sistemi transwell come illustrato al paragrafo 3.2.1.12.

In questo caso la camera apicale è stata riempita con 150  $\mu\text{l}$  di dispersione micellare (micelle fluorescenti: 200  $\mu\text{g/ml}$ ; micelle cariche di farmaco: 75  $\mu\text{g/ml}$  in termini di contenuto di farmaco). Ai time points aliquote da 200  $\mu\text{l}$  sono state prelevate dal compartimento accettore e immediatamente rimpiazzate con un identico volume di mezzo cellulare fresco. Al termine dell'esperimento, è stato prelevato anche il fluido residuo nella camera donatrice. I campioni prelevati dagli studi di permeazione condotti sulle micelle fluorescenti sono stati immediatamente analizzati mediante analisi spettrofluorimetrica ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 485 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 520 nm). Tutti gli altri campioni sono stati, invece, congelati e liofilizzati, quindi trattati con 200  $\mu\text{l}$  di metanolo al fine di estrarre il farmaco in essi contenuto e, successivamente, analizzati mediante HPLC come precedentemente descritto. La stessa procedura è stata eseguita per valutare il profilo di permeazione transcorneale *in vitro* del farmaco libero in soluzione alla sua massima solubilità. In questo caso è stato prima necessario preparare una soluzione madre di IMA in metanolo e quindi diluito in mezzo di coltura cellulare. I risultati sono riportati come  $\mu\text{g/cm}^2$  di farmaco permeati in funzione del tempo. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

### **3.2.2.12 Studi di Permeazione Transcorneale *ex vivo***

Gli studi di permeazione transcorneale *ex vivo* sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticali di Franz e cornee bovine come illustrato nel paragrafo 3.2.1.13.

Il compartimento donatore è stato caricato con 300 µl di:

- ☉ Soluzione di IMA in HEPES pH 7.4 alla concentrazione di 25 µg/ml ottenuta previa preparazione di una soluzione madre in metanolo e successiva diluzione 1:100 in HEPES pH 7.4,
- ☉ Sospensione di IMA con caricamento di una quota totale di farmaco pari a 500 µg/ml,
- ☉ Dispersione micellare di INU-EDA-RA/IMA, INU-EDA-RA-PEG/IMA, PHEA-ERA-RA/IMA o PHEA-EDA-RA-PEG/IMA ad una concentrazione tale da avere nel donor una quantità iniziale di farmaco pari a 500 µg/ml,
- ☉ Dispersione micellare di INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub>, INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>, PHEA-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e PHEA-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>.

Gli esperimenti sono stati condotti a  $35 \pm 0,5$  °C per 6 h, prelevando agli opportuni time points aliquote da 200 µl di fluido accettore e rimpiazzandoli immediatamente con HEPES pH 7.4 fresco. I campioni prelevati dagli studi di permeazione *ex vivo* delle micelle fluorescenti sono stati immediatamente analizzati utilizzando un PlateReader AF2200 e come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 520 nm e 485 nm. La quantificazione delle micelle marcate con la sonda fluorescente è stata effettuata utilizzando la relativa curva di taratura in HEPES costruita impiegando un range di concentrazione compreso tra  $5 \times 10^{-7}$  e 1 mg/ml ( $R^2_{\text{PHEA-EDA-RA}} = 0.999$ ;  $R^2_{\text{PHEA-EDA-RA-PEG}} = 0.998$ ). I campioni prelevati dagli studi di permeazione *ex vivo* dei farmaci in soluzione, sospensione o dispersione micellare sono stati, invece, immediatamente congelati e liofilizzati. Il liofilizzato è stato, quindi, trattato con metanolo in modo da estrarre il farmaco che è stato successivamente quantificato mediante analisi HPLC, come precedentemente descritto.

Infine, la cornea proveniente dal test di permeazione, è stata lavata con HEPES fresco e il tessuto è stato posto in 2 ml di DMF<sub>a</sub> (per l'estrazione delle micelle fluorescenti) o metanolo (per l'estrazione dell'IMA) alla temperatura di 37 °C e sotto continua agitazione overnight.

Per la quantificazione delle micelle fluorescenti sono state effettuate misure spettrofluorimetriche con lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 520 nm e 485 nm, utilizzando le relative curve di taratura in DMF<sub>a</sub> costruite impiegando un range di concentrazione compreso tra  $5 \times 10^{-7}$  e 1 mg/ml ( $R^2_{\text{PHEA-EDA-RA}} = 0.997$ ;  $R^2_{\text{PHEA-EDA-RA-PEG}} = 0.999$ ). Per la quantificazione del farmaco estratto dal tessuto corneale sono state eseguite analisi HPLC, come precedentemente descritto.

Inoltre al termine dei test di permeazione è stato anche prelevato il donore dal quale è stato estratto il farmaco residuo al fine di valutare se la somma del farmaco residuo nel donore + farmaco permeato + farmaco intrappolato nel tessuto corneale fosse effettivamente pari alla quantità di farmaco inizialmente caricata.

### **3.2.3 Micelle Polimeriche A Base Di Inulina: Valutazione Dell'Efficacia Di Differenti Penetration/Permeation Enhancers Legati Chimicamente E Non**

#### **3.2.3.1 Sintesi dei derivati Polimerici**

I polimeri anfifilici impiegati nel presente studio sono tutti derivati dell'INU-EDA-RA, la cui sintesi è descritta nel paragrafo 3.2.1.1. Gli step di sintesi polimerica rilevanti ai fini del presente lavoro sono consistiti nel grafting, nel backbone polimerico, di molecole potenzialmente in grado di agire come *permeation/penetration enhancers*. Tali molecole sono il PEG, la taurina (TAU), la creatina (CRE) e la carnitina (CAR). La funzionalizzazione chimica con i suddetti *enhancers* ha portato alla sintesi dei seguenti derivati: INU-EDA-RA-PEG, INU-EDA-TAU-RA, INU-EDA-RA-CRE e INU-EDA-RA-CAR rispettivamente.

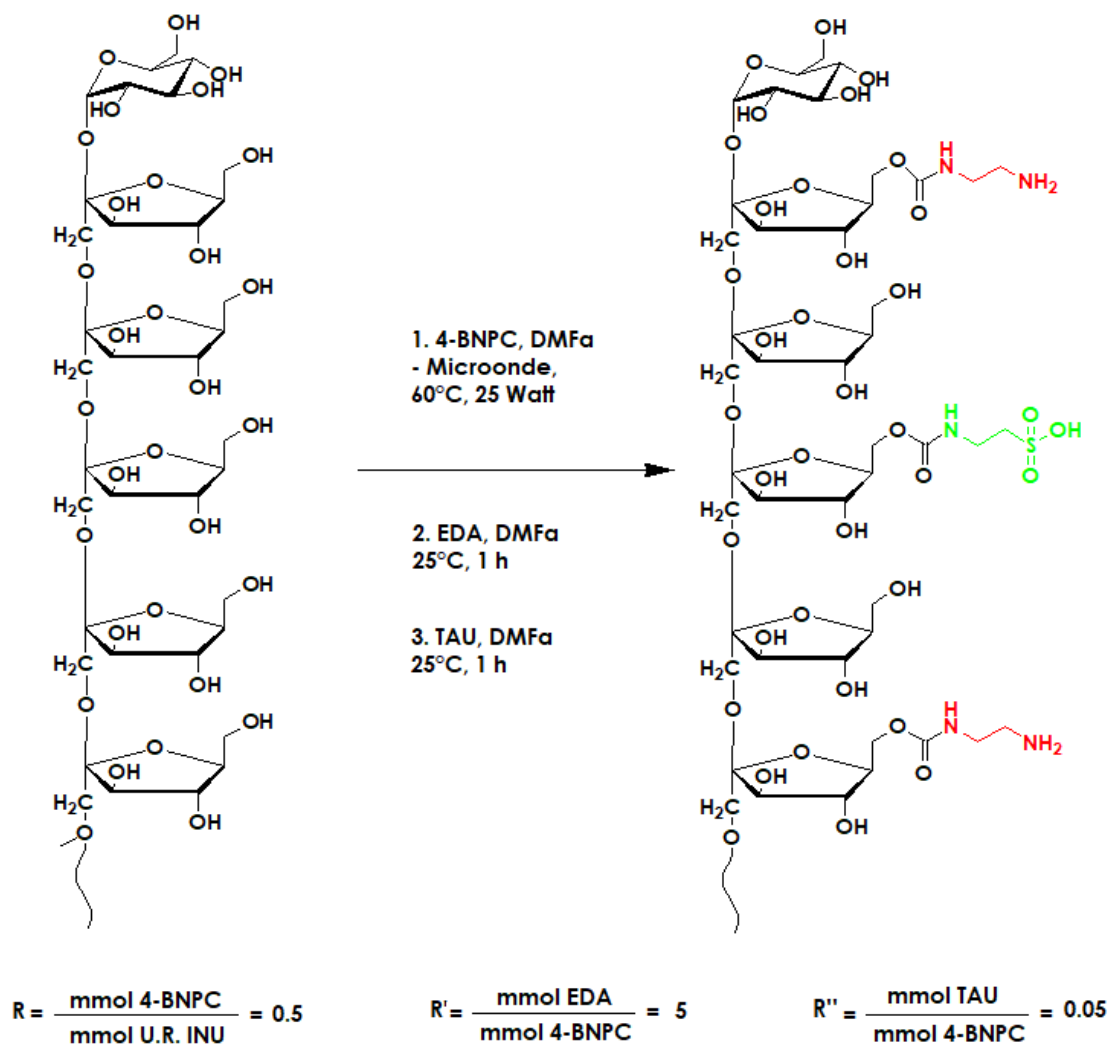
La sintesi del derivato INU-EDA-RA-PEG è già stata descritta nel paragrafo 3.2.1.1.

Per la sintesi del derivato INU-EDA-TAU-RA è stata necessaria una procedura multi step avente come punto di partenza l'inulina.

L'INU (250 mg; 1.54 mmol) è stata solubilizzata in DMF<sub>a</sub> (4 ml) a 60°C. Successivamente è stato aggiunto il BNPC (236 mg; 0.77 mmol) previamente solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (1 ml). La reazione di attivazione dei gruppi ossidrilici dell'INU è stata condotta via "Enhanced Microwave Synthesis" a 60°C e 25 Watt per 1 h, come descritto al paragrafo 3.2.1.1. A seguito dell'attivazione, l'INU attivata viene lentamente addizionata goccia a goccia ad una soluzione di EDA (250 µl; 3.85 mmol) in DMF<sub>a</sub> (1 ml) e la miscela di reazione è mantenuta a 25°C per 1 h sotto costante agitazione. In seguito, la taurina (TAU) (9.6 mg; 0.077 mmol) previamente solubilizzata in acqua bidistillata (100 µl) è aggiunta alla miscela di reazione che è mantenuta a 25°C per un'altra ora sotto costante agitazione (**Schema 7**). Il work up della reazione consiste nella precipitazione del prodotto crudo in acetone. Seguono, quindi, 3 lavaggi nel medesimo solvente. In seguito, il prodotto secco viene solubilizzato in acqua bidistillata e purificato mediante GPC, impiegando come fase stazionaria una colonna Sephadex G15. Le frazioni raccolte sono, dunque, congelate e liofilizzate.

Resa percentuale rispetto all'INU di partenza: 98%

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz):  $\delta$  2.751-3.200 ( $4\text{H}_{\text{EDA}}$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 2.994 ( $4\text{H}_{\text{TAU}}$ ,  $\text{HO}_3\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 3.563- 3.770 ( $5\text{H}_{\text{INU}}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ;  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ;  $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ), 4.000-4.133 ( $2\text{H}_{\text{INU}}$ ,  $-\text{C}-\text{CH}-\text{OH}$ ;  $-\text{CH}-\text{OH}$ ).



**Schema 7. Sintesi di INU-EDA-TAU**

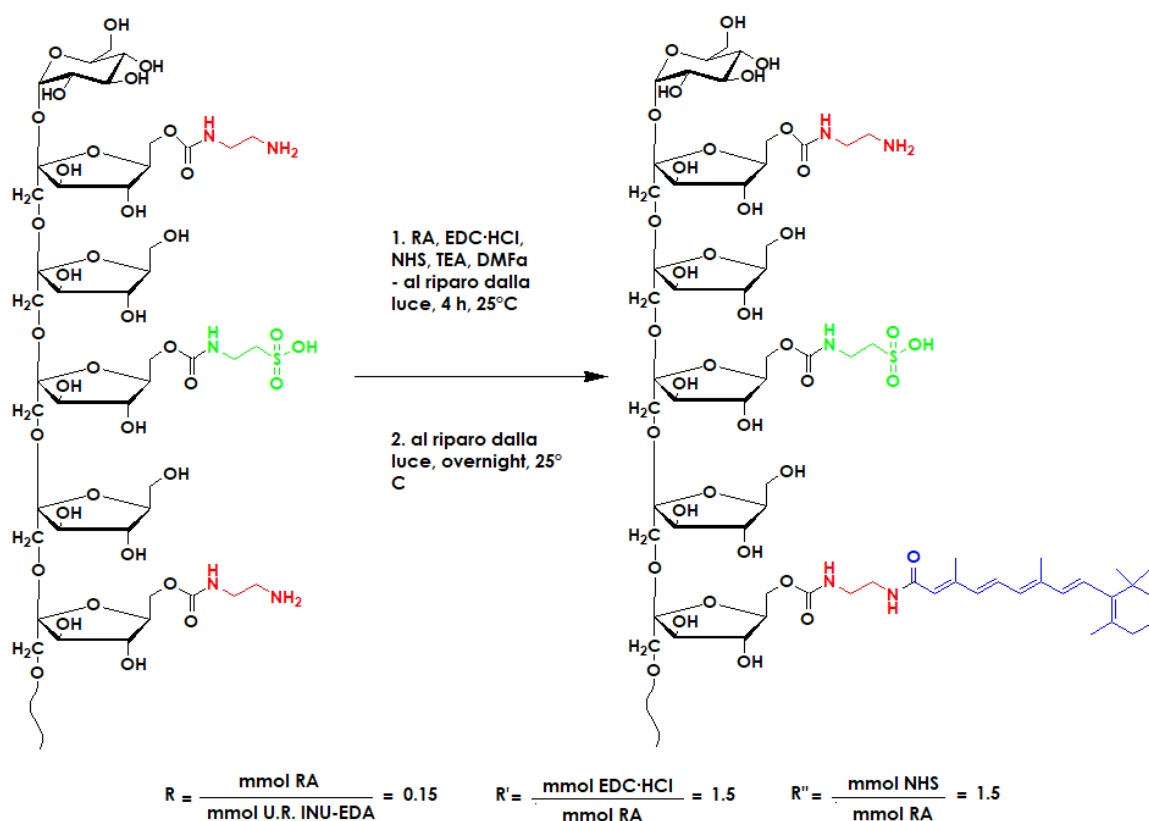
Il derivato INU-EDA-TAU ottenuto è stato poi ulteriormente processato al fine di inserire come agente idrofobizzante l'acido retinoico, in analogia a quanto visto nel paragrafo 3.2.1.1.

Brevemente, l'RA (25.7 mg; 0.0855 mmol) è solubilizzato in DMF<sub>a</sub> (1 ml) e, successivamente, sono aggiunti l'EDC·HCl (24.5 mg; 0.128 mmol) e l'NHS (14.7 mg; 0.128 mmol) solidi, nonché la TEA (14  $\mu\text{l}$ ). La reazione è condotta a 25°C per 4 h al riparo

dalla luce. Successivamente, l'RA attivato è aggiunto ad una soluzione di INU-EDA-TAU (100 mg; 0.57 mmol) in DMF<sub>a</sub> e la reazione è condotta a 25°C overnight (~ 18 h) al riparo dalla luce (**Schema 8**). Il work up della reazione consiste nella precipitazione del prodotto ottenuto in una miscela etere dietilico/diclorometano in rapporto 2:1 (v/v). Seguono 3 lavaggi nella medesima miscela. In seguito il prodotto lavato è seccato e, quindi, solubilizzato in acqua bidistillata e purificato mediante dialisi (RC, 1 kDa). Al termine della dialisi il prodotto è congelato e liofilizzato.

Resa percentuale in peso rispetto all'INU-EDA di partenza: 88%.

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>, 300 MHz): δ 1.224 (6H<sub>RA</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-), δ 1.673 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.818 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.927 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 2.230 (5H<sub>RA</sub> - CH<sub>2</sub>-C-C-CH<sub>3</sub>), δ 2.558 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 3.939 (5H<sub>INU</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH; -CH-CH<sub>2</sub>-OH; -C-CH<sub>2</sub>-O-), 4.291-4.460 (2H<sub>INU</sub>, -C-CH-OH; -CH-OH).



**Schema 8. Sintesi di INU-EDA-TAU-RA**

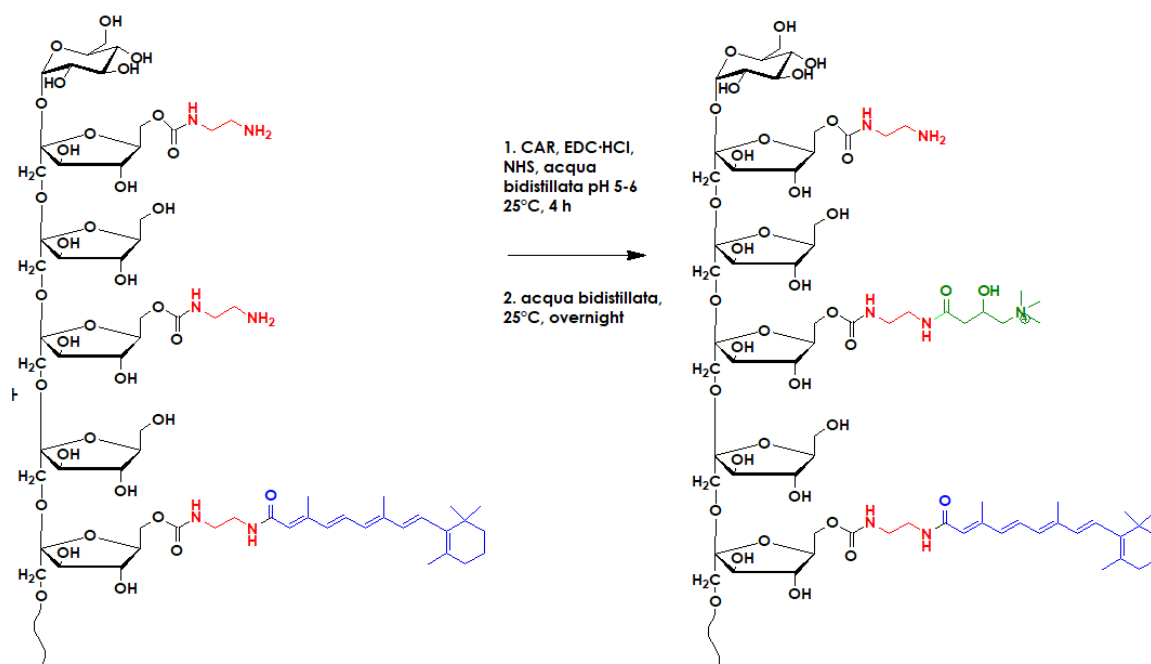


I derivati anfifilici INU-EDA-RA-CRE e INU-EDA-RA-CAR sono stati, invece, prodotti a partire dal copolimero INU-EDA-RA, la cui procedura sintetica è stata già riportata.

Per la sintesi di INU-EDA-RA-CRE, la creatina (CRE) (2.14 mg; 0.01635 mmol) è stata solubilizzata in acqua bidistillata (0.5 ml) aggiungendo la minima quantità di HCl 0.1 N necessaria per la sua solubilizzazione. Sono stati quindi aggiunti l'EDC·HCl (4.8 mg; 0.025 mmol) e l'NHS (2.9 mg; 0.025 mmol) solidi. La miscela limpida è stata immediatamente aggiunta ad una soluzione di INU-EDA-RA (100 mg; 0.545 mmol) in acqua bidistillata (2 ml) ed il pH è stato portato a valori compresi tra 4 e 5 con HCl 0.1 N. La reazione è stata, quindi, condotta a 25°C, overnight (~ 18 h) e al riparo dalla luce (**Schema 9**). Work up e purificazione del prodotto sono stati eseguiti ponendo direttamente la miscela di reazione all'interno di una membrana da dialisi (RC, 100-500 Da) contro acqua bidistillata. Al termine della dialisi il prodotto è congelato e liofilizzato.

Resa percentuale in peso rispetto all'INU-EDA-RA di partenza: 92%.

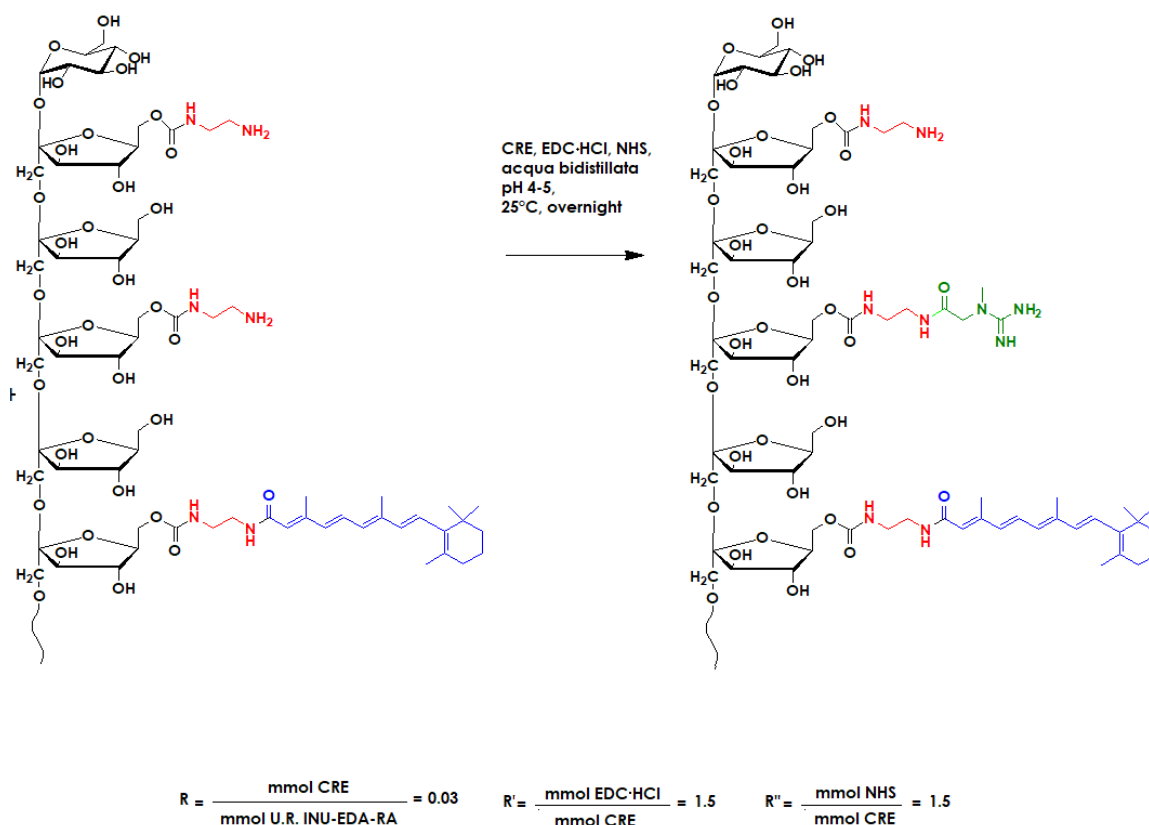
<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>, 300 MHz): δ 1.224 (6H<sub>RA</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C-), δ 1.661 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.794 (2H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), δ 1.903 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 2.230 (5H<sub>RA</sub> - CH<sub>2</sub>-C-C-CH<sub>3</sub>), δ 2.582 (3H<sub>RA</sub>, -C-CH<sub>3</sub>), δ 2.800 (3H<sub>CRE</sub>, -N-CH<sub>3</sub>), δ 3.903 (5H<sub>INU</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH; -CH-CH<sub>2</sub>-OH; -C-CH<sub>2</sub>-O-), 4.291-4.460 (2H<sub>INU</sub>, -C-CH-OH; -CH-OH).



$$R = \frac{\text{mmol CAR}}{\text{mmol U.R. INU-EDA-RA}} = 0.07 \quad R' = \frac{\text{mmol EDC-HCl}}{\text{mmol CAR}} = 1.5 \quad R'' = \frac{\text{mmol NHS}}{\text{mmol CAR}} = 1.5$$

### Schema 9. Sintesi di INU-EDA-RA-CRE

Analogamente, per la sintesi di INU-EDA-RA-CAR, alla carnitina (CAR) (6.1 mg; 0.03815 mmol) previamente solubilizzata in acqua bidistillata (0.5 ml) sono stati quindi aggiunti l'EDC·HCl (11 mg; 0.057 mmol) e l'NHS (6.6 mg; 0.057 mmol) solidi. La miscela limpida è stata, quindi portata a pH 5-6 con HCl 0.1 N e lasciata a reagire a 25°C per 4 h. Dopo l'attivazione, la miscela di reazione è stata aggiunta ad una soluzione di INU-EDA-RA (100 mg; 0.545 mmol) in acqua bidistillata (2 ml) ed il pH è stato portato a valori compresi tra 4 e 5 con HCl 0.1 N. La reazione è stata, quindi, condotta a 25°C, overnight (~ 18 h) e al riparo dalla luce (**Schema 10**). Work up e purificazione del prodotto sono stati eseguiti ponendo direttamente la miscela di reazione all'interno di una membrana da dialisi (RC, 100-500 Da) contro acqua bidistillata. Al termine della dialisi il prodotto è congelato e liofilizzato.



### Schema 10. Sintesi di INU-EDA-RA-CAR

Resa percentuale in peso rispetto all'INU-EDA-RA di partenza: 95%.

$^1\text{H-NMR}$  (DMF- $d_7$ , 300 MHz):  $\delta$  1.239 (6 $H_{\text{RA}}$ , ( $\text{CH}_3$ ) $_2$ -C-),  $\delta$  1.697 (2 $H_{\text{RA}}$ , -C- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -),  $\delta$  1.834 (2 $H_{\text{RA}}$ , -C- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -),  $\delta$  1.936 (3 $H_{\text{RA}}$ , -C- $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  2.027 (2 $H_{\text{CAR}}$ , OH-CH- $\text{CH}_2$ -COOH),  $\delta$  2.244 (5 $H_{\text{RA}}$  - $\text{CH}_2$ -C-C- $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  2.574 (3 $H_{\text{RA}}$ , -C- $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  3.132 (9 $H_{\text{CAR}}$ , -N( $\text{CH}_3$ ) $_3$ ),  $\delta$  3.929 (5 $H_{\text{INU}}$ , - $\text{CH}_2$ -OH; - $\text{CH}$ - $\text{CH}_2$ -OH; -C- $\text{CH}_2$ -O-), 4.282-4.499 (2 $H_{\text{INU}}$ , -C- $\text{CH}$ -OH; - $\text{CH}$ -OH).

#### **3.2.3.2 Valutazione della Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC)**

La valutazione della capacità di self-assembling dei derivati anfifilici neosintetizzati è stata eseguita mediante saggio al pirene, come illustrato nel paragrafo 3.2.1.2, analizzando concentrazioni crescenti di polimeri (da  $4 \times 10^{-4}$  mg/ml a 2 mg/ml).

Gli spettri di emissione di fluorescenza del pirene sono registrati impiegando come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 373 nm e 333 nm.

### ***3.2.3.3 Preparazione delle Micelle Polimeriche vuote e cariche di Desametasone e delle Micelle Polimeriche Fluorescenti***

Sia le micelle vuote che le micelle cariche di desametasone sono state preparate con il metodo del casting, come descritto al paragrafo 3.2.1.3. È stata quindi impiegata la stessa procedura operativa, gli stessi rapporti farmaco/polimero e il medesimo metodo di purificazione del sistema carico.

La resa in peso ottenuta per le micelle vuote e per le micelle cariche di farmaco, calcolata rispetto alla quantità iniziale di polimero impiegata, è risultata rispettivamente pari al 100% e superiore al 100%.

Le micelle polimeriche vuote sono state marcate con la sonda fluorescente Alexa Fluor<sub>488</sub>, seguendo la procedura illustrata al paragrafo 3.2.1.4.

Resa percentuale in peso, rispetto alle micelle impiegate in partenza, < 95.00% in tutti i casi.

### ***3.2.3.4 Studi di Dynamic Light Scattering (DLS) e Z-potential***

Le misure di DLS e di potenziale zeta sono state registrate a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  impiegando dispersione acquose di micelle (0.5 mg/ml) sia vuote che cariche di farmaco previamente filtrate su filtri da 5  $\mu\text{m}$  di cellulosa acetofalato, come illustrato al paragrafo 3.2.1.5.

### ***3.2.3.5 Studi di Mucoadesione***

Gli studi di mucoadesione sono stati condotti esclusivamente col metodo turbidimetrico in quanto il potenziale zeta misurato per alcuni dei nuovi sistemi preparati non giustifica né supporta l'impiego del metodo del potenziale zeta.

Sono state analizzate miscele a concentrazione fissa di mucina (1 mg/ml) e concentrazione crescente di micelle (0.5, 1 e 5 mg/ml), come illustrato al paragrafo 3.1.2.6, poi rapportare al comportamento di una soluzione di mucina posta pari al 100% di trasmittanza.

### **3.2.3.6 Valutazione della Drug Loading %**

Per valutare la quantità di farmaco incorporata all'interno delle micelle sono state condotte analisi HPLC, come illustrato nel paragrafo 3.2.1.7.

Dopo aver solubilizzato una quantità esattamente nota (5 mg) di micelle cariche in DMF<sub>a</sub>, la soluzione limpida è stata filtrata su filtro in nylon da 0.45 µm e trasferita in un matraccio da 5 ml, quindi portata a volume con DMF<sub>a</sub>. La quantità del DEX caricata all'interno delle micelle è stata determinata mediante cromatografia su fase inversa, come precedentemente descritto.

La quantità di farmaco incapsulata all'interno delle micelle è stata espressa come contenuto di farmaco (mg) in 100 mg di micelle cariche di farmaco.

### **3.2.3.7 Studi di Rilascio *in vitro***

Per gli studi di rilascio *in vitro* del farmaco è stato impiegato il metodo delle dialisi, come illustrato nel paragrafo 3.2.1.8. Un'adeguata quantità di micelle cariche di farmaco (concentrazione di DEX nel compartimento donatore pari a 500 µg/ml) è stata dispersa in DPBS pH 7.4 (800 µl) e posta all'interno di una membrana da dialisi in RC (SpectraPore; cut off 1 kDa). La dialisi è stata, quindi, immersa in DPBS pH 7.4 (8 ml), incubata a 37°C sotto continua agitazione (100 rpm) in orbital shaker per 48 ore e sottoposta a prelievi di aliquote da 1 ml, immediatamente rimpiazzate con la stessa quantità di DPBS pH 7.4 fresco. Per quantificare il farmaco presente nei campioni prelevati sono state condotte analisi spettrofotometriche, come precedentemente descritto, tenendo conto della procedura di diluizione. I dati di rilascio ottenuti sono stati trattati ed espressi come già illustrato nonché paragonati ai profili di diffusione e di dissoluzione e diffusione rispettivamente di una soluzione o di una sospensione di desametasone.

### **3.2.3.8 Saggio di Vitalità Cellulare *in vitro***

I saggi di vitalità sono stati condotti su cellule dell'epitelio corneale umano (HCEpiC – Human Corneal Epithelial Cells) dopo trattamento con i polimeri e le micelle vuote, seguendo la stessa metodica descritta al paragrafo 3.2.1.10. Sono state testate soluzioni di polimero (5-100 µg/ml) una dispersione micellare (150-700 µg/ml) in mezzo di coltura

cellulare preparate a partire soluzioni polimeriche e dispersioni micellari in DPBS pH 7.4 più concentrate (rispettivamente 1 mg/ml e 10 mg/ml) e sterilizzate mediante filtrazione sterilizzante con filtro sterile di cellulosa acetofalto da 0.22 µm sotto cappa sterile.

La vitalità delle cellule è stata monitorata mediante saggio MTS dopo 1, 4 e 24 h di trattamento.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e rapportati a un triplicato di cellule non trattate e usate, quindi, come controllo. I risultati sperimentali sono espressi come vitalità % rapportati al controllo che è stato posto come 100% di vitalità cellulare.

### **3.2.3.9 Studi di Permeazione Transcorneale *ex vivo***

Gli studi di permeazione transcorneale *ex vivo* sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticali di Franz e cornee bovine come illustrato nel paragrafo 3.2.1.13.

Il compartimento donatore è stato caricato con 300 µl di:

- ☉ Dispersione di INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> a concentrazione costante (10 mg/ml) in HEPES o in soluzioni di PEG, TAU, CAR o CRE in HEPES al 2% in moli rispetto alla quantità di polimero caricata,
- ☉ Dispersioni di INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>, INU-EDA-RA-TAU-Alexa Fluor<sub>488</sub>, INU-EDA-RA-CAR-Alexa Fluor<sub>488</sub> o INU-EDA-RA-CRE-Alexa Fluor<sub>488</sub> in HEPES a concentrazione costante (10 mg/ml),
- ☉ Dispersioni di INU-EDA-RA/DEX, INU-EDA-RA-PEG/DEX, INU-EDA-RA-TAU/DEX, INU-EDA-RA-CAR/DEX o INU-EDA-RA-CRE/DEX in HEPES ad una concentrazione tale da avere nel donator una quantità iniziale di farmaco pari a 500 µg/ml,
- ☉ Dispersione micellare di INU-EDA-RA/DEX ad una concentrazione tale da avere nel donator una quantità iniziale di farmaco pari a 500 µg/ml in HEPES o in soluzioni di PEG, TAU, CAR o CRE in HEPES al 2% in moli rispetto alla quantità di polimero caricata.

Gli esperimenti sono stati condotti a  $35 \pm 0,5$  °C per 6 h, prelevando agli opportuni time points aliquote da 200 µl di fluido accettore e rimpiazzandoli immediatamente con HEPES pH 7.4 fresco. I campioni prelevati dagli studi di permeazione *ex vivo* delle micelle fluorescenti sono stati immediatamente analizzati utilizzando un PlateReader

AF2200 e come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 520 nm e 485 nm. La quantificazione delle micelle marcate con la sonda fluorescente è stata effettuata utilizzando le relative curve di taratura in HEPES costruita impiegando un range di concentrazione compreso tra  $5 \times 10^{-7}$  e 1 mg/ml ( $R^2 < 0.990$  per tutti i campioni). I campioni prelevati dagli studi di permeazione sono stati, invece, immediatamente congelati e liofilizzati. Il liofilizzato è stato, quindi, trattato con DMF<sub>a</sub> in modo da estrarre il farmaco che è stato successivamente quantificato mediante analisi HPLC, come precedentemente descritto.

Infine, la cornea proveniente dal test di permeazione, è stata lavata con HEPES fresco e il tessuto è stato posto in 2 ml di DMF<sub>a</sub> alla temperatura di 37 °C e sotto continua agitazione overnight.

Per la quantificazione delle micelle fluorescenti sono state effettuate misure spettrofluorimetriche con lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 520 nm e 485 nm, utilizzando le relative curve di taratura in DMF<sub>a</sub> costruite impiegando un range di concentrazione compreso tra  $5 \times 10^{-7}$  e 1 mg/ml ( $R^2 < 0.990$  per tutti i campioni). Per la quantificazione del farmaco estratto dal tessuto corneale sono state eseguite analisi HPLC, come precedentemente descritto.

Inoltre al termine dei test di permeazione è stato anche prelevato il donore dal quale è stato estratto il farmaco residuo al fine di valutare se la somma del farmaco residuo nel donore + farmaco permeato + farmaco intrappolato nel tessuto corneale fosse effettivamente pari alla quantità di farmaco inizialmente caricata.

### ***3.2.4 Funzionalizzazione Superficiale Plasma-Assistita di Scaffold Polimerici Come Inserti Oculari Mucoadesivi Per Il Rilascio Protratto Di Triamcinolone Acetonide***

#### ***3.2.4.1 Preparazione degli Scaffold di PoliButileneSuccinato (PBS) mediante Elettrospinning***

Gli scaffold di PoliButileneSuccina (PBS) sono stati realizzati mediante la tecnica dell'elettrospinning. Al fine di ottenere i migliori risultati in termini di resa e semplicità nella procedura di elettrospinning sono state impiegate 30 ml di soluzione di PBS al 15% (p/v) in diclorometano (serie A) o in miscela diclorometano/cloroformio 7:3 (v/v) (serie B).

Il processo di elettrospinning è stato condotto orizzontalmente ad un voltaggio pari a 15 kV e impiegando un flusso costante di soluzione polimerica pari a 0.6 ml/min, ottenuto mediante una pompa a siringa programmabile. Lo scaffold ottenuto è stato raccolto su un foglio di alluminio avvolto attorno ad un collettore cilindrico rotante posto a circa 15-20 cm di distanza dalla punta dell'ago della siringa.

Lo scaffold fibrillare ottenuto è, innanzitutto, valutato qualitativamente al fine di selezionare la miscela di solventi più adatta per l'ottenimento di scaffold omogenei, morbidi ed opportunamente elastici, scegliendo inoltre un compromesso tra la velocità e la semplicità di solubilizzazione del PBS nella miscela scelta alla concentrazione di esercizio e la qualità dello scaffold finale ottenuto.

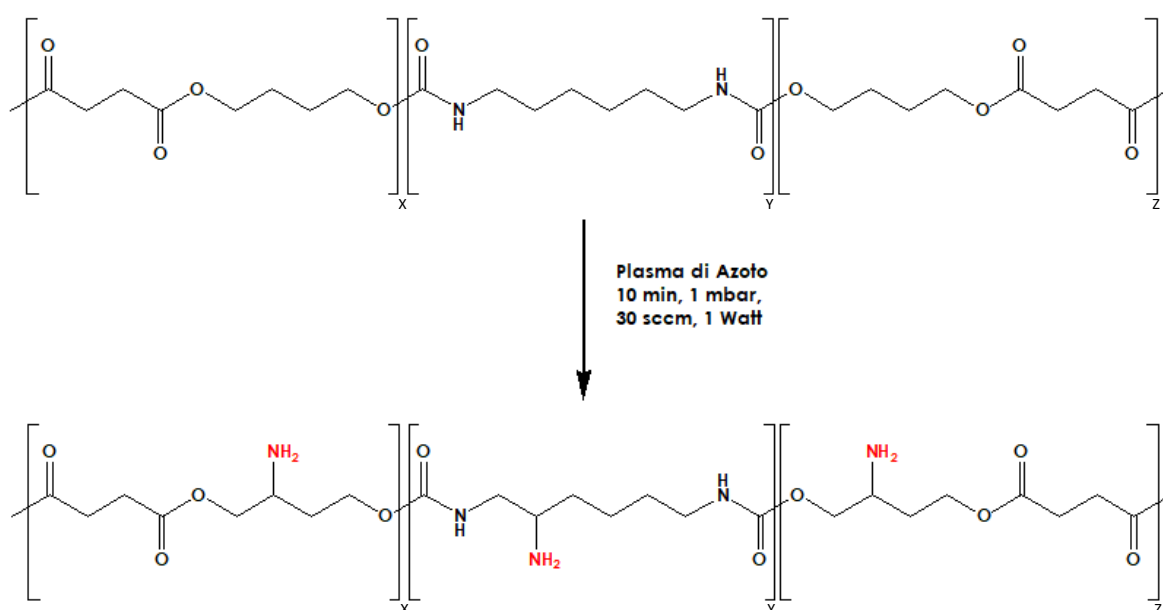
#### ***3.2.4.2 Trattamento al Plasma di N<sub>2</sub>***

Gli scaffold fibrillari ottenuti sono stati ritagliati al fine di ottenere dei quadrati di scaffold del peso di 100 o 125 mg. Le porzioni ottenute sono state quindi trattate con plasma di N<sub>2</sub> (**Schema 11**) impostando le seguenti condizioni operative:

- ☉ Tempo di esposizione: 10 minuti,
- ☉ Flusso del gas in uscita dalla bombola: 1 mbar,
- ☉ Flusso del gas in entrata nella camera del reattore al plasma: 30 sccm,
- ☉ Potenza al valore massimo: 1 Watt.



Dopo l'inserimento dello scaffold all'interno della camera del reattore al plasma viene creato il vuoto. Al raggiungimento di 0.4 mbar si avvia il processo di trattamento con plasma, per un periodo di esposizione pari a 10 minuti. Durante tale periodo è possibile osservare l'emissione di radiazioni UV violette. Allo scadere del tempo di esposizione la pompa da vuoto viene staccata e la camera del reattore al plasma è dapprima ventilata, quindi aperta. La porzione di scaffold così trattata è immediatamente impiegata per il saggio alla Ninidrina ovvero è posta a reagire al fine di essere opportunamente funzionalizzata.



**Schema 11. Attivazione degli scaffold di PBS mediante trattamento al plasma di N<sub>2</sub>**

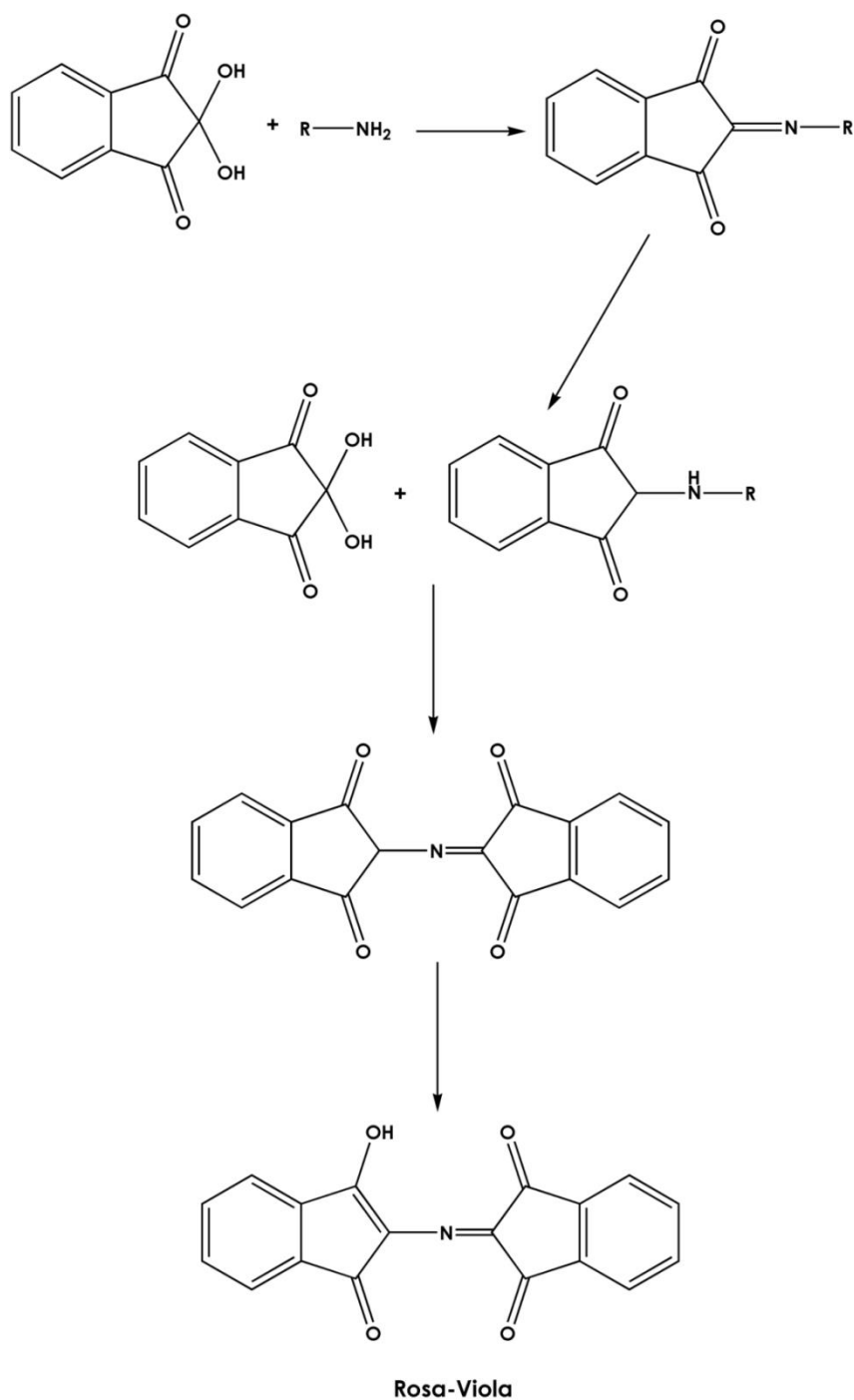
### **3.2.4.3 Saggio alla Ninidrina**

Al fine di verificare l'effettiva introduzione di gruppi amminici reattivi sulla superficie degli scaffold trattati con plasma di N<sub>2</sub>, immediatamente dopo il trattamento è stato eseguito il saggio alla Ninidrina.

La ninidrina è, infatti, una molecola in grado di agire rapidamente con i gruppi amminici, secondo la reazione riportata nello **Schema 12**, che porta alla formazione di un derivato di colore rosa-viola.

Immediatamente al termine del trattamento con plasma di N<sub>2</sub>, lo scaffold è stato parzialmente trattato con una goccia di ninidrina (soluzione etanolica al 5%) e lasciato a incubare e seccare 2-3 minuti in orbital shaker a 37°C. La presenza di una colorazione

viola sulla superficie dello scaffold è indice di gruppi amminici superficiali che, non essendo propri della struttura del PBS, indicano quindi, l'effettiva riuscita del trattamento al reattore al plasma. L'esperimento è stato condotto sia su porzioni di scaffold trattate al plasma che non trattate al fine di evidenziare la differente colorazione.



**Schema 12. Reazione tra Ninidrina e gruppi amminici**

#### **3.2.4.4 Funzionalizzazione Chimica con INU, PHEA ed EPA**

Il trattamento con plasma di N<sub>2</sub> è stato eseguito allo scopo di inserire sulla superficie dello scaffold dei gruppi amminici reattivi in grado di consentire il grafting superficiale con polimeri biocompatibili idrofilici quali l'inulina (INU), il PHEA e l'eparina (EPA).

Per favorire la reazione di grafting superficiale è stato necessario attivare i biopolimeri scelti in modo da renderli più suscettibili all'attacco nucleofilo da parte dei gruppi amminici appena immessi sulla superficie dello scaffold.

L'attivazione dell'INU e del PHEA è avvenuta via 4-BNPC mentre l'attivazione dell'EPA è avvenuta via EDC·HCl/NHS. La quantità di polimero attivato è stata studiata in modo da raggiungere, alla fine, un rapporto in peso tra biopolimero e scaffold di 2 a 1.

Nella fattispecie, 250 mg di INU (1.54 mmol U.R.) sono stati solubilizzati in 2 ml di DMF<sub>a</sub> a 60°C e, quindi, addizionati di 236 mg 4-BNPC (0.77 mmol) previamente solubilizzati in 1 ml di DMF<sub>a</sub>. La reazione è stata condotta via “*Enhancer Microwave Synthesis*” a 60°C e 25 Watt per 1 h.

200 mg di PHEA (1.27 mmol U.R.) sono stati solubilizzati in 1.6 ml di DMF<sub>a</sub> e addizionati di 192.6 mg di 4-BNPC (0.63 mmol) previamente solubilizzati in 0.6 ml di DMF<sub>a</sub>. La reazione è stata condotta a 40°C per 4 h.

200 mg di EPA (0.34 mmol U.R.) sono stati solubilizzati in 2 ml di acqua bidistillata e il pH è stato portato a 5-6 con HCl 0.1 N. Sono stati quindi aggiunti 42.3 mg di NHS e 64.8 mg di EDC·HCl solidi (0.34 mmol) ed il pH è stato nuovamente portato a 5-6 con HCl 0.1 N. La reazione è stata condotta a 37°C per 4 h.

Immediatamente al termine del trattamento con plasma di N<sub>2</sub> lo scaffold è stato immerso nelle soluzioni di INU, PHEA o EPA opportunamente attivati. La reazione in eterofase tra scaffold e polimero è stata condotta a 40°C per 24 h (**Schema 13**).

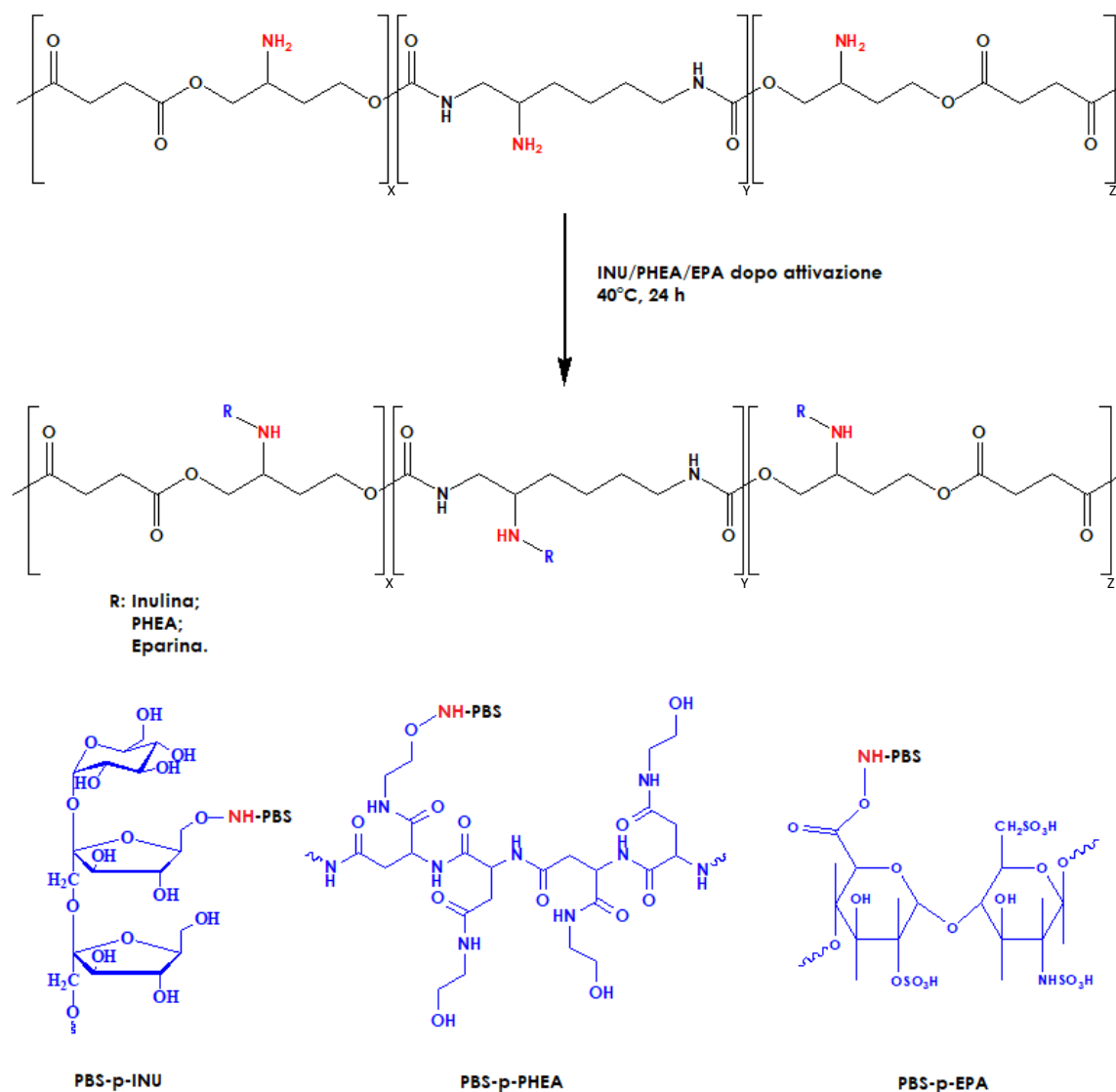
Al termine della reazione gli scaffold sono stati sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua bidistillata al fine di allontanare residui di attivanti o polimeri non legati chimicamente ma depositati sulla superficie del materiale.

Gli scaffold ottenuti saranno identificati come segue:

- ☉ PBS, indica lo scaffold di partenza che ha, però, subito trattamento al plasma,
- ☉ PBS-p-*INU*, indica lo scaffold che ha subito trattamento al plasma e successiva funzionalizzazione con inulina,

- ☉ PBS-p-PHEA, indica lo scaffold che ha subito trattamento al plasma e successiva funzionalizzazione con PHEA,
- ☉ PBS-p-EPA, indica lo scaffold che ha subito trattamento al plasma e successiva funzionalizzazione con eparina.

In seguito gli scaffold funzionalizzati sono stati opportunamente seccati e quindi utilizzati per le successive analisi. In tal senso, con l'ausilio di un apposito cutter, sono stati ricavati dischetti di scaffold del diametro di 0.4 cm.



**Schema 13. Funzionalizzazione plasma -assistita degli scaffold di PBS con INU, PHEA o EPA**

### 3.2.4.5 Caratterizzazione Spettroscopica degli Scaffold

Per valutare l'effettiva funzionalizzazione dello scaffold di partenza sono state condotte analisi ATR-FTIR,  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$ .

Le analisi infrarosse sono state condotte utilizzando la tecnica in Riflettanza Totale Attenuata (ATR) impiegata per l'analisi superficiale di campioni solidi. Gli spettri ATRFT-IR sono stati registrati nel range  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  (numero di scansioni = 32).

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati acquisiti in fase liquida previa solubilizzazione di porzioni di scaffold (circa 20 mg) in miscele  $\text{CDCl}_3/\text{DMF-d}_7$ .

$^1\text{H-NMR}_{\text{PBS}}$  ( $\text{CDCl}_4/\text{DMF-d}_7$ , 300 MHz):  $\delta$  1.412 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ), 2.322 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{O=C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ ), 3.814 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ).

$^1\text{H-NMR}_{\text{PBS-p-INU}}$  ( $\text{CDCl}_4/\text{DMF-d}_7$ , 300 MHz):  $\delta$  1.449 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ), 2.330 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{O=C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ ), 3.438 ( $5\text{H}_{\text{INU}} \text{-CH}_2\text{-OH}$ ;  $\text{-CH-CH}_2\text{-OH}$ ;  $\text{-C-CH}_2\text{-O-}$ ), 3.836 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ).

$^1\text{H-NMR}_{\text{PBS-p-PHEA}}$  ( $\text{CDCl}_4/\text{DMF-d}_7$ , 300 MHz):  $\delta$  1.948 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ), 2.847 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{O=C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ ), 3.052-3.147 ( $4\text{H}_{\text{PHEA}} \text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), 4.319 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ).

$^1\text{H-NMR}_{\text{PBS-p-EPA}}$  ( $\text{CDCl}_4/\text{DMF-d}_7$ , 300 MHz):  $\delta$  1.500 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ), 2.420 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{O=C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ ), 3.539 ( $5\text{H}_{\text{EPA}} \text{-CH-OH}$ ;  $\text{-CH-OH}$ ;  $\text{-O-CH-O-}$ ;  $\text{-CH-CH-O-}$ ;  $\text{-CH-COOH}$ ), 3.921 ( $4\text{H}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ).

Gli spettri  $^{13}\text{C-NMR}$  sono stati, invece, acquisiti in fase solida utilizzando un intero lotto di scaffold funzionalizzato (100-125 mg).

$^{13}\text{C-NMR}_{\text{PBS}}$  (600 MHz):  $\delta$  25.400 ( $1\text{C}_{\text{PBS}} \text{-CO-CH}_3$ ), 28.190 ( $6\text{C}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ;  $\text{-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ), 64.300 ( $2\text{C}_{\text{PBS}} \text{-O-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ), 65.660 ( $2\text{C}_{\text{PBS}} \text{-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ), 107.830 ( $2\text{C}_{\text{PBS}} \text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$ ), 173.530 ( $2\text{C}_{\text{PBS}} \text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$ ), 240.000 ( $2\text{C}_{\text{PBS}} \text{-O-CO-NH-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH-CO-O-}$ ).

### 3.2.4.6 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e Analisi Elementare

Le caratteristiche morfologiche degli scaffold sono stata investigate mediante microscopia elettronica a scansione. Il campione è stato depositato su uno stub di acciaio con rivestimento in carbonio, seccato e, quindi, rivestito con oro (15 nm di spessore) prima

dell'osservazione al microscopio. I campioni sono stati inoltre sottoposti ad analisi elementare.

#### **3.2.4.7 Studi di Degradazione a pH fisiologico**

Per gli studi di degradazione a pH fisiologico dischetti di scaffold del diametro 0.4 cm sono stati accuratamente pesati e, quindi, immersi in 2 ml di DPBS pH 7.4, mimante i fluidi fisiologici, o HEPES pH 7.4, mimante i fluidi oculari.

Ai time points prestabiliti (2, 7, 14 e 30 giorni) i dischetti sono stati prelevati, seccati e nuovamente pesati.

I risultati sono espressi in percentuale rispetto al peso iniziale del dischetto di scaffold al tempo zero.

#### **3.2.4.8 Studi di Swelling**

Per gli studi di swelling dischetti di scaffold del diametro 0.4 cm sono stati accuratamente pesati e, quindi, immersi in 2 ml HEPES pH 7.4, mimante i fluidi oculari.

Ai time points prestabiliti (2 h e 2, 7 e 15 giorni) i dischetti sono stati prelevati, asciugati delicatamente e nuovamente pesati.

I risultati sono espressi in percentuale rispetto al peso iniziale del dischetto di scaffold al tempo zero.

#### **3.2.4.9 Studi di Mucoadesione**

Per gli studi di mucoadesione degli scaffold è stata impiegata una tecnica nota in letteratura opportunamente modificata (Licciardi M et al. 2012).

Sono stati ottenuti dei quadratini di scaffold di circa 1x1 cm, accuratamente pesati e, quindi, immersi in una soluzione di mucina allo 0.1% per 2 h a 37°C e sotto costante agitazione (orbital shaker settato a 100 rpm).

Trascorso tale tempo gli scaffold sono stati prelevati e seccati sotto vuoto, quindi nuovamente pesati. Il primo dato ottenuto in termini di differenza di peso indica l'attitudine degli scaffold a interagire con la mucina,

Gli scaffold imbibiti di mucina sono stati lavati con flusso continuo di DPBS pH 7.4 10 ml/min per 5 minuti. Al termine del trattamento gli scaffold sono stati nuovamente seccati e, quindi, pesati. Al variare delle proprietà mucoadesive del materiale testati gli scaffold sono risultati più o meno in grado di trattenere, a seguito del lavaggio, la mucina con cui erano stati imbibiti.

I risultati sono espressi in termini di variazioni percentuali in peso rispetto al peso originario della porzione di scaffold analizzata.

#### ***3.2.4.10 Preparazione di Scaffold carichi di Triamcinolone Acetonide***

Per la realizzazione di scaffold carichi di triamcinolone acetonide sono stati innanzitutto ritagliati, con l'ausilio di opportuni cutter, dischetti di scaffold del diametro di 0.7 o 0.4 cm, al fine di ottenere scaffold carichi rispettivamente grandi o piccoli da impiegare rispettivamente per gli studi di rilascio del farmaco o per gli studi di permeazione transcorneale *ex vivo*.

È stata preparata una soluzione madre di triamcinolone acetonide in metanolo alla concentrazione di 5 mg/ml impiegata per imbibire gli scaffold.

I dischetti da 0.7 cm di diametro sono stati imbibiti con 25 µl di soluzione e lasciati seccare ripetendo la stessa procedura 8 volte.

I dischetti da 0.4 cm di diametro sono stati, invece, imbibiti con 8 µl di soluzione e lasciati seccare, ripetendo, anche in questo caso, la procedura per 8 volte.

La differente quantità di soluzione di triamcinolone impiegata nei due casi è stata scelta attentamente in modo da ottenere gli stessi risultati in termini di contenuto di farmaco per unità di superficie.

I sistemi carichi sono indicati come PBS/TA, PBS-p-INU/TA, PBS-p-PHEA/TA e PBS-p-EPA/TA.

### **3.2.4.11 Valutazione del Contenuto di Farmaco (mg/cm<sup>2</sup>) e della Drug Loading %**

La valutazione della Drug Loading è stata eseguita in prima battuta mediante calcolo della differenza di peso tra lo scaffold prima e dopo caricamento del farmaco. I risultati così ottenuti sono stati, tuttavia, verificati mediante analisi HPLC.

A tale scopo gli scaffold carichi di farmaco sono stati sottoposti ad estrazione dello stesso in metanolo e successiva analisi HPLC come illustrato al paragrafo 3.2.1.7.

I risultati sono stati espressi sia in termini di quantità di farmaco per unità di superficie (mg/cm<sup>2</sup>) che in termini di drug loading % corrispondente ai mg di farmaco contenuti in 100 mg di sistema carico. È chiaro che i due dati non sempre coincidono. Infatti, sebbene la quantità di farmaco caricata per unità di superficie sia pressoché costante la drug loading % non lo è poiché al variare della funzionalizzazione superficiale dello scaffold dischetti aventi la medesima area non posseggono lo stesso peso.

### **3.2.4.12 Studi di Rilascio *in vitro***

Gli studi di rilascio *in vitro* sono stati condotti immergendo i dischetti di scaffold carichi di TA del diametro da 0.7 cm in 30 ml di HEPES pH 7.4 e mantenendoli in orbital-shaker a 37°C e 100 rpm fino a 30 giorni.

A intervalli di tempo prestabiliti sono state prelevate aliquote di fluido accettore (1 ml) immediatamente rimpiazzare dallo stesso volume di HEPES pH 7.4 fresco al fine di mantenere le condizioni sink del sistema. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e i risultati sono stati espressi in funzione del tempo di incubazione come percentuale di farmaco nel compartimento ricevente ( $\pm$  errore standard) rispetto alla quantità iniziale di farmaco caricato nel compartimento donatore, tenendo conto della procedura di diluizione. Per la quantificazione del TA sono state condotte analisi spettrofotometriche impiegando la relativa curva di taratura costruita nel range  $2.5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-2}$  mg/ml ( $R^2 = 0.999$ ).

Al termine dell'esperimento gli scaffold ancora perfettamente integri sono stati prelevati e sottoposti ad estrazione del TA eventualmente residuo con metanolo. Il TA residuo è stato quindi quantificato mediante analisi HPLC come precedentemente visto.



#### **3.2.4.13 Studi di Permeazione Transcorneale *ex vivo***

Gli studi di permeazione transcorneale *ex vivo* sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticali di Franz e cornee bovine come illustrato nel paragrafo 3.2.1.13.

Il compartimento donatore è stato caricato con dischetti di scaffold carichi di TA dal diametro di 0.4 cm immersi in 300 µl di HEPES pH 7.4.

Gli esperimenti sono stati condotti a  $35 \pm 0,5$  °C per 6 h, prelevando agli opportuni time points aliquote da 200 µl di fluido accettore e rimpiazzandoli immediatamente con HEPES pH 7.4 fresco. I campioni prelevati sono stati immediatamente congelati e liofilizzati. Il liofilizzato è stato, quindi, trattato con metanolo in modo da estrarre il farmaco che è stato successivamente quantificato mediante analisi HPLC, come precedentemente descritto.

La cornea proveniente dal test di permeazione, è stata lavata con HEPES fresco e il tessuto è stato posto in 2 ml di metanolo alla temperatura di 37 °C e sotto continua agitazione overnight, al fine di estrarre il TA eventualmente intrappolato a livello tissutale.

Inoltre al termine dei test di permeazione è stato prelevato il fluido contenuto nel donor che è stato impiegato per la valutazione della reale concentrazione di TA nel compartimento donatore alle 6 h (dato necessario per il calcolo di  $J_s$ ,  $K_p$ ,  $D_e$  e  $K_a$ ).

Infine, lo scaffold perfettamente integro al termine del test di permeazione *ex vivo* è stato prelevato al fine di estrarre il farmaco in esso residuo e valutare che la quantità di farmaco permeato + farmaco intrappolato a livello corneale + farmaco rilasciato nel donor + farmaco residuo nello scaffold fosse pari alla quantità di farmaco inizialmente caricata.

#### **3.2.4.14 Studi di Citocompatibilità e Attecchimento cellulare con HCEpiC**

Dischetti di scaffold del diametro 0.4 cm sono stati opportunamente ottenuti e, quindi, sterilizzati mediante immersione in etanolo e successivo essiccamento sotto cappa sterile a flusso laminare.

Gli scaffold perfettamente asciutti sono stati posti in una piastra a 48 pozzetti e imbibiti con 20 µl di sospensione cellulare contenente 20000 HCEpiC. Dopo 2 h di incubazione, ogni pozzetto è riempito con mezzo di coltura cellulare.

Agli opportuni time points (1, 3, 7 e 15 gg) la vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTS come descritto al paragrafo 3.2.1.10.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

*“Non basta guardare, occorre guardare con occhi che vogliono vedere, che credono in quello che vedono.”*

*-Galileo Galilei*

### ***4.1 Micelle Polimeriche A Base Di Inulina Per La Somministrazione Oculare Topica Di Corticosteroidi***

Sebbene la somministrazione di farmaci che devono agire selettivamente a livello oftalmico rappresenti ancora oggi una sfida aperta per i tecnologi farmaceutici, una delle chiavi di risoluzione di tale problema può essere efficacemente rappresentata dalla nanotecnologia. La progettazione di opportune micelle polimeriche, preparate a partire da derivati polimerici semisintetici, rappresenta, oggi, un approccio potenzialmente vincente per lo sviluppo di sistemi carrier efficaci, sicuri e, soprattutto, confortevoli in quanto somministrabili per via oculare topica.

Al fine di ottenere nuovi *ocular drug delivery systems*, somministrabili sotto forma di collirio, in grado di incorporare efficientemente farmaci lipofili quali i corticosteroidi, nonché dotati delle opportune e desiderate caratteristiche in termini di particle size, mucoadesione ed effetto *enhancer*, una prima parte del lavoro sperimentale svolto durante il periodo di dottorato di ricerca è consistita nella progettazione, sintesi e caratterizzazione di due nuovi derivati anfifilici dell'inulina denominati INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG.

L'inulina (INU) è un polisaccaride naturale biocompatibile, bioeliminabile e biodegradabile costituito da catene lineari di  $\beta$ -(2-1) fruttosio in forma furanosica, e dotato

di un'estremità riducente di glucosio (*van der Zee M et al. 1995*). È idrosolubile, biodegradabile/bioeliminabile, citocompatibile e la presenza di numerosi ossidrilici facilmente processabili la rende facilmente funzionalizzabile. (*Craparo EF et al. 2006; Palumbo FS et al. 2006; Pitarresi G et al. 2012; Licciardi M et al. 2014; Mandracchia D et al. 2014*). Grazie alle sue caratteristiche, quindi, l'INU rappresenta un polimero ottimale da impiegare quale punto di partenza per lo sviluppo tecnologico di derivati anfifilici da impiegare per la preparazione di carrier micellari opportunamente modulabili e processabili.

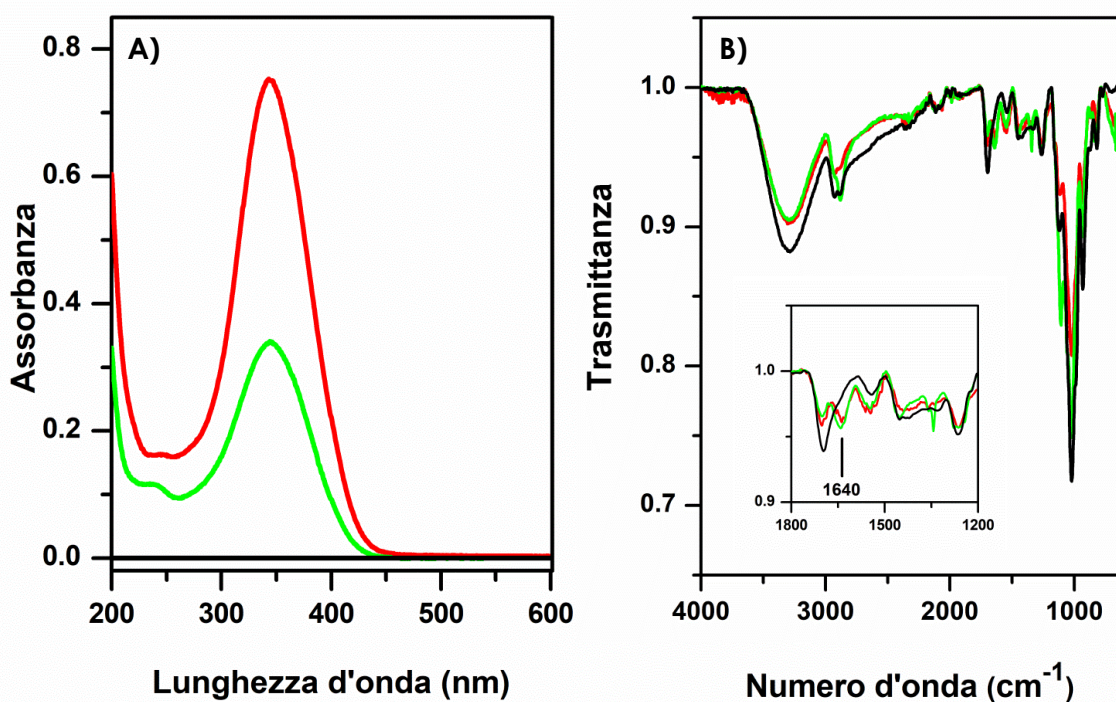
Per la sintesi dei suoi due nuovi derivati anfifilici, l'INU è stata sottoposta a sequenziale funzionalizzazione con etilendiammina, acido retinoico e, per la sintesi del derivato PEGylato, polietilene glicole<sub>2000</sub>.

Al backbone polisaccaridico di inulina è stata inizialmente legata l'etilendiammina (EDA) al fine non solo di produrre un derivato idrofilico avente gruppi amminici primari altamente reattivi da impiegare per le successive reazioni di funzionalizzazione, ma anche di aggiungere al sistema micellare progettato gruppi amminici superficiali protonabili a pH fisiologico e quindi utili per conferire al sistema finale proprietà mucoadesive e di *permeation enhancer*. Come agente idrofobizzante da impiegare per la realizzazione di nuovi copolimeri anfifilici è stato scelto l'acido retinoico. L'acido retinoico (RA), forma attiva della vitamina A, è un componente endogeno dell'occhio che gioca un ruolo chiave nella regolazione del differenziamento delle cellule della cornea, della congiuntiva e del limbo. Possiede, inoltre, proprietà antiossidanti che lo rendono potenzialmente utile nel trattamento delle patologie degenerative retiniche (*Sheu SJ et al. 2010; Samarawickrama et al. 2015*). Infine, il derivato anfifilico ottenuto è stato ulteriormente funzionalizzato mediante l'aggiunta di PEG<sub>2000</sub> al fine di consentire la creazione di uno shell idrofilo stabilizzante attorno alle micelle ottenute, ma anche di sfruttare l'effetto del PEG, potenzialmente in grado di promuovere la stabilità, la mucoadesione e la permeazione transcorneale. In particolare, le catene di PEG risultano in grado di dar vita a saldi legami a idrogeno con le mucine presenti sulla superficie oftalmica. La possibilità, quindi, di garantire un'interazione prolungata con il sito di somministrazione ed assorbimento potrebbe risultare da sola in una maggiore permeazione. Inoltre, studi di letteratura, riportano come il PEG possa agire da promotore dell'assorbimento in vivo. Infatti, le catene di PEG sono in grado di indurre un'apertura reversibile delle tight junction al livello delle cellule

dell'epitelio corneale e, di conseguenza, migliorare il trasporto paracellulare di farmaci attraverso i tessuti oftalmici (*Fresta et al., 2001; Civiale et al. 2009; Shen et al. 2009*).

I due nuovi derivati polimerici sono stati caratterizzati dal punto di vista spettroscopico (UV-VIS, ATRFT-IR e  $^1\text{H-NMR}$ ) nonché in termini di valutazione del valore di Concentrazione di Aggregazione Critica in tre differenti mezzi acquosi: acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 (mimante generalmente i fluidi fisiologici) ed HEPES pH 7.4 (mimante specificatamente i fluidi oculari) (*Pescina S et al. 2015*).

Le analisi UV-VIS condotte impiegando soluzioni acquose di INU-EDA, INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG (**Fig. 30, pannello A**) evidenziano, per i due derivati anfifilici, la presenza del picco relativo all'RA a 343 nm, assente nello spettro UV-VIS dell'INU-EDA. Come è possibile osservare non si apprezzano segni diretti dell'effettiva presenza delle catene di PEG legato al backbone polimerico. Tuttavia, sebbene le analisi siano state registrate alla medesima concentrazione di INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG (0.1 mg/ml) l'assorbanza del derivato INU-EDA-RA-PEG risulta nettamente inferiore a quella osservata per il polimero INU-EDA-RA. Questo è certamente dovuto alla presenza del PEG, in quanto, pesando la medesima quantità di polimero in termini di mg, per l'INU-EDA-RA-PEG una parte di quel peso è relativa alla presenza del PEG e, di conseguenza, la concentrazione effettiva di RA nel campione risulta minore con conseguente riduzione dell'assorbanza a 343 nm.

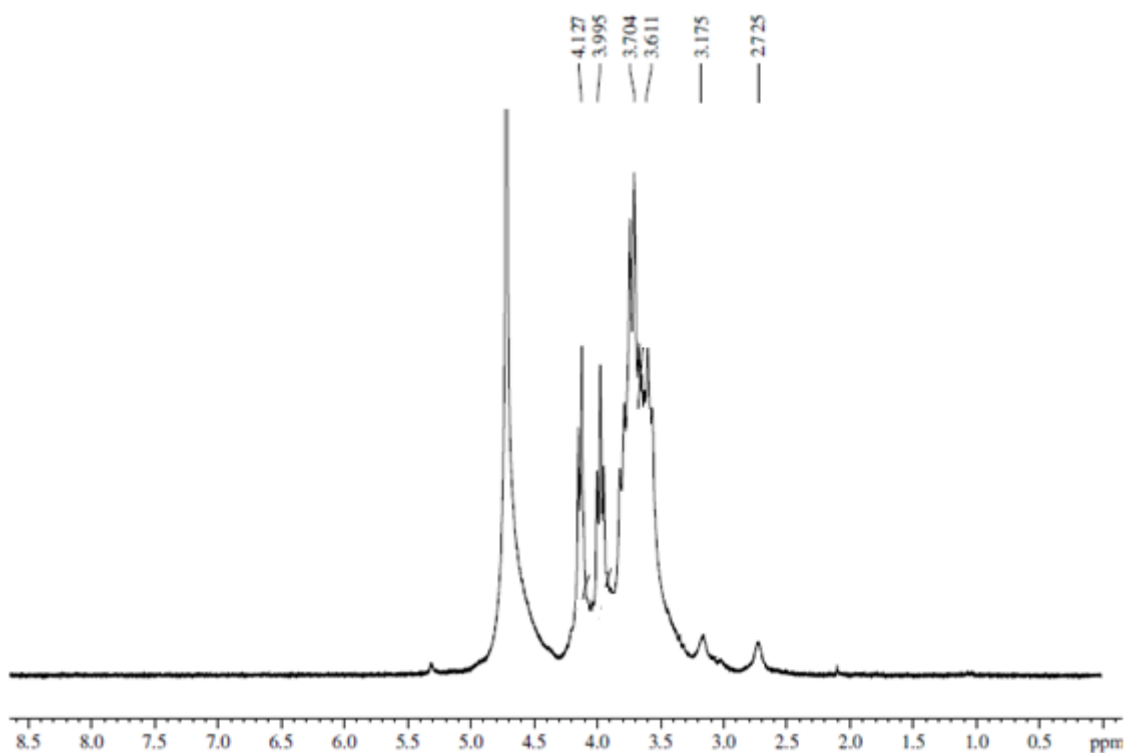


**Figura 30. A) Spettri UV-VIS e B) Spettri ATRFT-IR di INU-EDA (linea nera), INU-EDA-RA (linea rossa) e INU-EDA-RA-PEG (linea verde)**

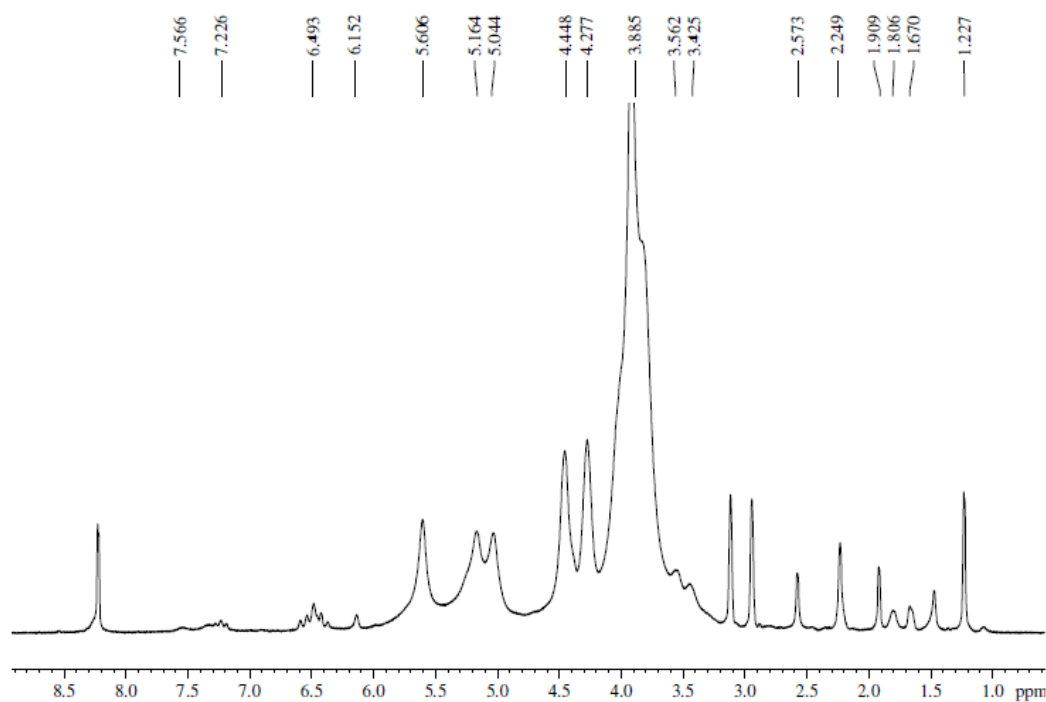
Dagli spettri ATRFT-IR (**Fig. 30, pannello B**) si nota una progressiva variazione nella zona dell'impronta digitale nonché la comparsa di nuovi picchi ascrivibili all'introduzione di nuovi gruppi funzionali. In particolare in entrambi i derivati INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG si osserva la comparsa del picco a  $1640\text{ cm}^{-1}$  attribuibile al carbonile dell'RA legato al backbone polimerico. Anche in questo caso non è possibile osservare direttamente la presenza del PEG legato chimicamente, tuttavia la zona dell'impronta digitale dei due differenti polimeri non risulta perfettamente sovrapponibile e questo indica che la composizione chimica dei due derivati non è la stessa.

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  (**Fig. 31, 32 e 33**) mostrano inequivocabilmente l'effettivo ottenimento dei prodotti di reazione desiderati. Tali spettri sono stati, quindi, impiegati per il calcolo dei relativi gradi di derivatizzazione molare percentuale (DD mol %) in EDA, RA e PEG. I DD mol % sono stati ottenuti paragonando l'area dei picchi ascrivibili ai protoni dell'unità ripetitiva di inulina con le aree dei picchi relativi ai protoni dell'EDA, dell'RA e del PEG. In particolare, per il calcolo del DD mol % in EDA sono stati comparati l'integrale relativo ai protoni metilenici dell'EDA (4H) osservati a 2.725 e 3.175 ppm con l'integrale relativo ai protoni delle unità ripetitiva di INU costituenti il *backbone*

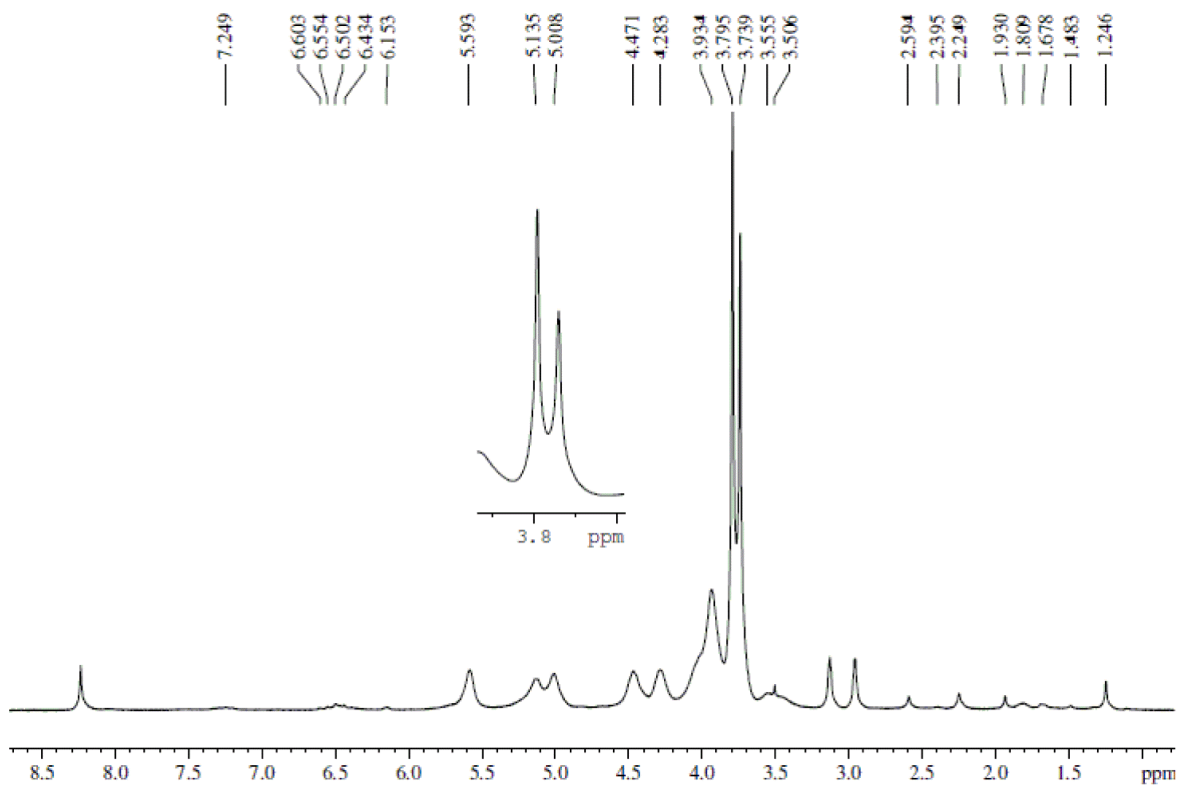
polimerico (7H) osservati tra 3.611 e 4.127 ppm. Per quanto riguarda il DD mol % in RA è stato calcolato comparando l'integrale relativo ai protoni dell'RA (21H) osservati tra 1.227 e 2.573 ppm con l'integrale relativo ai protoni delle unità ripetitiva di INU costituenti il backbone polimerico (7H) osservati tra 3.885 e 4.448 ppm. Infine, per il calcolo del DD mol % in PEG sono stati comparati l'integrale relativo ai protoni metilenici del PEG (176H) osservati a 3.739 ppm con l'integrale relativo ai protoni delle unità ripetitiva di INU costituenti il backbone polimerico (7H) osservati tra 3.506 e 4.471 ppm. I valori di DD mol % calcolati sono risultati pari a  $11.30 \pm 1.50$ ,  $4.30 \pm 0.30$  e  $1.50 \pm 0.25$  rispettivamente per EDA, RA e PEG.



**Figura 31. Spettro <sup>1</sup>H-NMR di INU-EDA**



**Figura 32. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di INU-EDA-RA**



**Figura 33. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di INU-EDA-RA-PEG**

La Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC) è stata valutata al fine di verificare l'effettiva capacità dei polimeri neosintetizzati di organizzarsi in ambiente acquoso con formazione di strutture sopramolecolari di tipo micellare-core/shell da impiegare poi quali sistemi carrier per la veicolazione di farmaci idrofobici. La valutazione della CAC dei due nuovi derivati anfifilici dell'inulina è stata eseguita mediante analisi spettrofluorimetrica utilizzando il pirene come sonda. Lo spettro di fluorescenza del pirene è caratterizzato, infatti, da due bande vibrazionali, chiamate banda I (373 nm) e banda III (384 nm) molto sensibili al microambiente in cui la molecola di pirene si trova. In particolare, l'intensità della banda III è significativamente maggiore quando il pirene si trova in ambiente idrofobico, mentre l'intensità della banda I è maggiore quando il pirene si trova in ambiente idrofilico. Di conseguenza il rapporto tra le intensità di fluorescenza delle bande I/III può essere impiegato per comprendere il microambiente in cui il pirene viene a trovarsi (*Chaudhuri A et al. 2009*). Analizzando i grafici ottenuti ponendo in ascissa il log della concentrazione del polimero e in ordinata il valore del rapporto tra intensità di fluorescenza della banda I e quella della banda III, è possibile individuare il valore di concentrazione di aggregazione critica (CAC) che risulta pari alla proiezione sull'asse delle ascisse del punto di intersezione tra le tangenti alle due porzioni della curva bimodale ottenuta. Come è possibile osservare dai risultati ottenuti in termini di CAC (**Tabella 1**) entrambi i polimeri sono in grado di auto-aggregare in ambiente acquoso ed in particolare in acqua bidistillata, in DPBS pH 7.4 (tampone mimante in generale i fluidi fisiologici) ed in HEPES pH 7.4 (tampone mimante specificatamente i fluidi oculari), tuttavia, mentre per l'INU-EDA-RA non si osservano variazioni significative della CAC al variare del mezzo analizzato, per l'INU-EDA-RA-PEG si osserva una significativa riduzione della CAC in tampone che suggerisce una maggiore dipendenza dell'organizzazione strutturale del polimero sia dal valore di pH che dalla forza ionica del mezzo.



**Tabella 1. Valori di Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC) in mg/ml calcolati per INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG in acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 ed HEPES pH 7.4**

Mezzo disperdente	INU-EDA-RA	INU-EDA-RA-PEG
Acqua bidistillata	0.135 ± 0.003	0.209 ± 0.004
DPBS pH 7.4	0.136 ± 0.002	0.073 ± 0.001
HEPES pH 7.4	0.135 ± 0.003	0.185 ± 0.002

Terminata, così, la caratterizzazione chimico-fisica dei nuovi derivati polimerici sintetizzati ed appurata la capacità di entrambi di auto-assemblare con formazione di strutture micellari, sono state quindi preparate micelle polimeriche sia vuote che cariche di farmaci idrofobici ed in particolare di corticosteroidi (desametasone, triamcinolone e triamcinolone acetone).

Come visto, la formazione delle micelle in ambiente acquoso avviene spontaneamente per dissoluzione dei polimeri nell'opportuno solvente/tampone a concentrazione superiore al valore soglia di CAC, tuttavia questa procedura non consente sempre l'ottenimento di un prodotto omogeneo. A tal fine, per la preparazione di sistemi micellari sono utilizzabili differenti tecniche come la dialisi, il casting, l'evaporazione del cosolvente, il freeze-drying ecc... (Gaucher G et al. 2005).

La scelta del metodo da utilizzare dipende, ovviamente, dalla solubilità di farmaco e polimeri in solventi o miscele di solventi più o meno volatili. Per la preparazione di micelle a base di INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG è stato impiegato il metodo del casting. Esso consiste nel solubilizzare farmaco e polimero nel medesimo solvente organico che è, in seguito, allontanato completamente per evaporazione. Questo processo porta alla formazione di un film uniforme costituito da polimero e farmaco in intimo contatto tra di loro. Quando il film viene reidratato con acqua si assiste alla formazione di micelle polimeriche cariche. Il caricamento del farmaco è favorito dal fatto che, già sotto forma di film, esso si trova strettamente a contatto con il polimero che formerà le micelle.

Quale metodo di purificazione impiegato per l'allontanamento del farmaco in eccesso non incorporato è stato scelto il metodo della centrifugazione, seguito da filtrazione (cellulosa acetofalato, 5 µm). Tale metodo è applicabile nel caso in studio grazie alla

bassissima solubilità in acqua dei tre farmaci scelti (50 µg/ml per DEX e T; < 30 µg/ml per TA) che consente un'efficace purificazione del sistema carico.

Con la medesima tecnica di preparazione sono state preparate sia micelle polimeriche vuote (indicate come INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG) che cariche dei tre farmaci (INU-EDA-RA/DEX, INU-EDA-RA-PEG/DEX, INU-EDA-RA/T, INU-EDA-RA-PEG/T, INU-EDA-RA/TA e INU-EDA-RA-PEG/TA).

Inoltre, le micelle polimeriche vuote sono state ulteriormente funzionalizzate legandovi chimicamente la sonda fluorescenza Alexa Fluor-NHS<sub>488</sub> al fine di ottenere strutture micellari con proprietà fluorescenti da poter facilmente osservare e quantificare per gli studi successivi (es. uptake cellulare qualitativo, studi di permeazione transcorneale *in vitro* ed *ex vivo*).

Tutti i lotti di micelle prodotti sono stati, innanzi tutto, caratterizzati dal punto di vista tecnologico mediante analisi di DLS, potenziale zeta (in acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 ed HEPES pH 7.4) e valutazione della Drug Loading %.

I risultati ottenuti sono illustrati in **Tabella 2**. È possibile osservare che, in tutti i casi, le dimensioni delle micelle ed il loro indice di polidispersità (PDI) non variano al variare del mezzo acquoso impiegato. Al contrario, ovviamente, quello che varia è il valore di potenziale zeta. In acqua, infatti, esso appare positivo. Ciò è presumibilmente dovuto alla presenza di gruppi amminici protonati in superficie, che erano stati inseriti in fase di progettazione e design dei due copolimeri proprio nella speranza di conferire al sistema una carica superficiale positiva che potesse garantire un opportuno contatto con le membrane delle cellule corneali nonché con le mucine presenti sulla superficie corneale, entrambe cariche negativamente.

**Tabella 2. Particle Size (nm), PDI, Potenziale Zeta e Drug Loading % (p/p) di tutte le micelle preparate**

	DL % (p/p)	Particle Size (nm)	PDI	Potenziale zeta (mV)	Mezzo disperdente
INU-EDA-RA	-	207.91 ± 19.04	0.268	14.82 ± 2.28	Acqua
		225.70 ± 14.50	0.244	- 1.08 ± 0.25	DPBS
		233.23 ± 17.09	0.287	- 2.00 ± 0.36	HEPES
INU-EDA-RA-Alexa Fluor <sub>488</sub>	-	205.72 ± 20.76	0.183	12.17 ± 2.20	Acqua
		239.60 ± 18.06	0.203	- 1.86 ± 0.23	DPBS
		245.84 ± 14.71	0.249	- 2.68 ± 0.40	HEPES
INU-EDA-RA-PEG	-	247.51 ± 14.44	0.267	7.08 ± 1.23	Acqua
		250.43 ± 12.93	0.255	- 2.80 ± 0.16	DPBS
		249.10 ± 13.67	0.275	- 4.10 ± 0.24	HEPES
INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor <sub>488</sub>	-	253.26 ± 16.23	0.253	6.57 ± 1.03	Acqua
		260.04 ± 13.60	0.287	-3.24 ± 0.21	DPBS
		257.49 ± 15.54	0.270	-3.99 ± 0.18	HEPES
INU-EDA-RA/DEX	13.00 ± 0.70 %	305.30 ± 21.71	0.224	17.23 ± 2.17	Acqua
		332.62 ± 16.62	0.233	-1.06 ± 0.28	DPBS
		327.92 ± 21.17	0.263	-1.81 ± 0.54	HEPES
INU-EDA-RA/T	8.65 ± 0.13 %	317.24 ± 14.70	0.269	17.11 ± 2.76	Acqua
		330.72 ± 18.52	0.242	-0.96 ± 0.35	DPBS
		325.30 ± 15.11	0.286	-1.82 ± 0.22	HEPES
INU-EDA-RA/TA	3.16 ± 0.42 %	339.78 ± 19.28	0.261	17.96 ± 2.68	Acqua
		349.23 ± 18.45	0.232	-1.38 ± 0.12	DPBS
		347.24 ± 21.45	0.221	-1.68 ± 0.45	HEPES
INU-EDA-RA-PEG/DEX	8.10 ± 0.22 %	305.93 ± 18.12	0.186	15.95 ± 1.23	Acqua
		320.60 ± 14.11	0.260	- 1.41 ± 0.25	DPBS
		322.15 ± 21.01	0.265	- 2.52 ± 0.33	HEPES
INU-EDA-RA-PEG/T	13.07 ± 0.34 %	318.42 ± 15.97	0.205	14.85 ± 1.19	Acqua
		315.21 ± 17.17	0.191	- 1.94 ± 0.27	DPBS
		314.00 ± 15.81	0.224	- 2.23 ± 0.34	HEPES
INU-EDA-RA-PEG/TA	3.85 ± 0.16 %	315.71 ± 12.39	0.235	15.22 ± 1.59	Acqua
		328.84 ± 15.05	0.241	- 1.86 ± 0.31	DPBS
		322.72 ± 14.59	0.218	- 2.68 ± 0.25	HEPES

Quando le medesime analisi sono eseguite su campioni preparati in tamponi quali il DPBS e l'HEPES pH 7.4 gli stessi gruppi amminici protonabili sono probabilmente responsabili dell'interazione con gli anioni presenti nel tampone che, schermato la carica positiva delle micelle, comportano un'importante variazione del valore di potenziale zeta osservato e, quindi, modificano apparentemente le caratteristiche superficiali del sistema.

Inoltre, in generale, è possibile osservare che le micelle cariche risultano sempre di dimensione superiore rispetto alle rispettive micelle vuote. Questo risulta ovvio in quanto, buone quantità di farmaco risultano in esse incorporate. In questi casi, per quanto riguarda il potenziale zeta in acqua esso rimane marcatamente positivo, come desiderato. Il valore di potenziale zeta delle micelle PEG-ylate anzi, risulta maggiore rispetto a quello delle micelle INU-EDA-RA-PEG vuote, probabilmente a causa di un diverso riarrangiamento del polimero che comporta una migliore esposizione delle cariche positive in superficie.

Per quanto riguarda la valutazione della quantità di farmaco incorporata all'interno delle micelle essa è stata espressa in termini di Drug Loading %, corrispondente alla quantità di farmaco (mg) contenuta in 100 mg di sistema carico. Tale valore è stato calcolato a seguito di estrazione del farmaco in solvente organico e successiva analisi HPLC.

Come è possibile osservare dai risultati riportati, entrambi i sistemi micellari sono in grado di incorporare tutti e tre i farmaci corticosteroidi scelti. In particolare i migliori valori in termini di drug loading % si riscontrano incorporando DEX e T (con un trend opposto per i due sistemi micellari) mentre per TA la quantità di farmaco incapsulata risulta nettamente inferiore (e paragonabile per INU-EDA-RA/TA e INU-EDA-RA-PEG/TA). Ciò è probabilmente dovuto alla maggiore lipofilia del TA che, quindi, viene incorporato più difficilmente all'interno di un sistema micellare il cui polimero anfifilico costituente vanta di una limitata porzione idrofobica. Considerando, infatti, che l'INU utilizzata ha un PM di circa 5000 Da e che il PM di un'unità ripetitiva è 162 possiamo quindi dire che in media le unità ripetitive formanti una catena di INU sono 31. Di conseguenza possiamo calcolare che il grado di derivatizzazione molare % in RA (4.30 %) corrisponde a un rapporto molecola INU:molecola RA di 1:1. L'RA ha un PM di 300.44 Da, quindi è chiaro che i monomeri formanti le micelle hanno una parte idrofila più consistente della porzione lipofila.

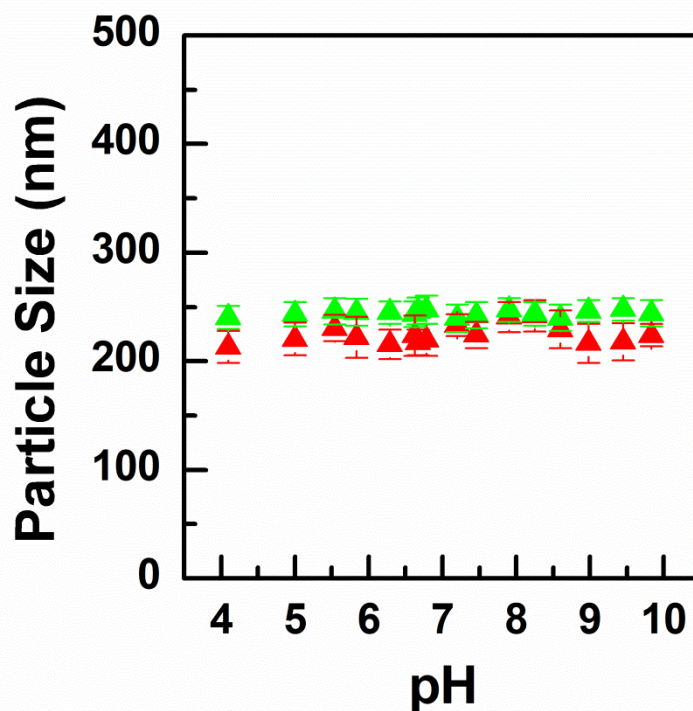
È stato inoltre osservato che la quantità di farmaco incorporata all'interno delle micelle è funzione del tempo di agitazione dopo la reidratazione del film durante il casting. Sono state infatti, condotte diverse prove incubando per 1, 2, 3 o 24 h. I risultati osservati in

termini di drug loading aumentano notevolmente fino alle 24, a discapito, però, della stabilità del prodotto finito. Quanto la quantità di farmaco incorporata è troppo alta, infatti, il liofilizzato non risulta più disperdibile in acqua o tampone acquoso dopo appena una settimana/10 giorni dalla sua preparazione. Di conseguenza è stato scelto un compromesso che ha portato alla selezione delle micelle ivi riportate come migliori sistemi prodotti considerando, appunto, non solo la quantità di farmaco che esse sono in grado di incorporare ma anche la loro stabilità (come riportato in seguito).

Successivamente, la caratterizzazione tecnologica delle micelle polimeriche vuote o cariche di farmaco ha preso strade differenti.

Le micelle polimeriche vuote sono state impiegate per la valutazione della loro stabilità in un ampio range di pH (4-10) corrispondente ai limiti di pH tollerati per una somministrazione oftalmica. Inoltre è stata valutata la loro capacità di mucoadesione e citocompatibilità e le micelle polimeriche vuote marcate con la sonda fluorescente sono state impiegate per la valutazione della permeazione transcorneale sia *in vitro* che *ex vivo* dei sistemi carrier di per sé nonché per gli studi di uptake qualitativo impiegando cellule dell'epitelio corneale umano.

Il rationale della valutazione della stabilità delle micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG a pH compreso tra 4 e 10 risiede nel fatto che è opportuno valutare se la stabilità strutturale dei sistemi micellari ed in particolare le loro dimensioni, siano dipendenti da variazioni del pH. Questo studio rientra nell'ottica della preparazione di un collirio contenente tali micelle polimeriche. I risultati sono riportati in **Fig. 34** e mostrano chiaramente come la dimensione delle micelle non vari al variare del pH nel range considerato. Quanto osservato rende le micelle in studio dei sistemi estremamente versatili dal punto di vista formulativo per la progettazione di un opportuno collirio.

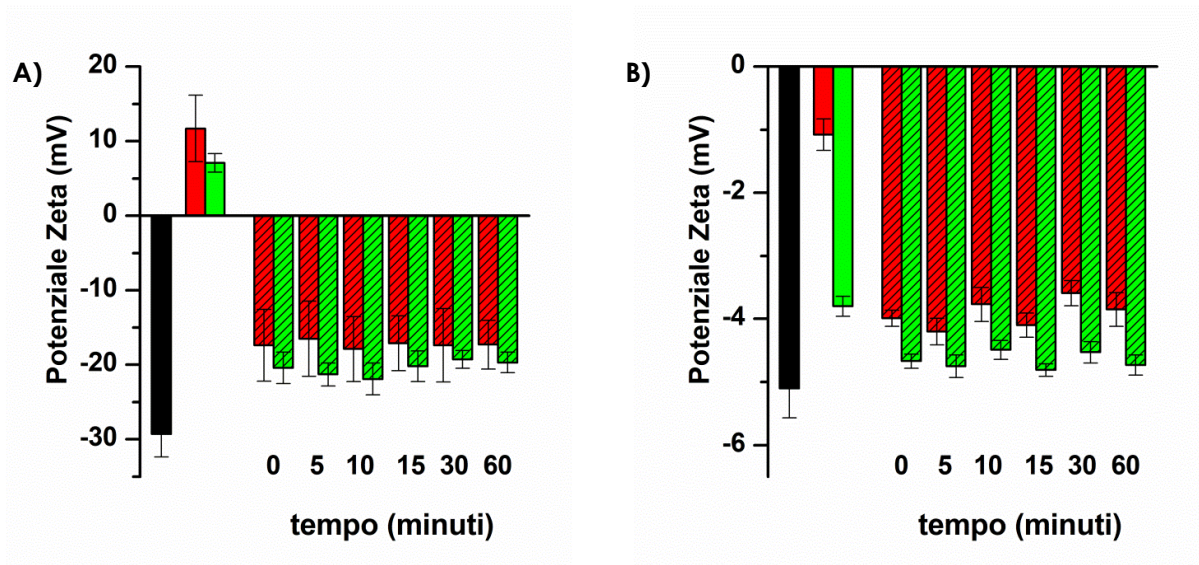


**Figura 34. Studi di stabilità in funzione del pH per le micelle INU-EDA-RA (rosso) e INU-EDA-RA-PEG (verde): particle size (nm) in funzione del pH (range 4-10)**

Nella progettazione di *ocular drug delivery systems* da somministrare sulla superficie oculare, è importantissimo la valutazione delle eventuali proprietà mucoadesive del sistema. La mucoadesione gioca infatti un ruolo cruciale nel campo della somministrazione oculare topica in quanto è una proprietà indispensabile per garantire un adeguato tempo di residenza e di contatto col sito di somministrazione e di assorbimento e può, quindi, conferire una maggiore biodisponibilità intraoculare. La superficie oculare è, infatti, continuamente dilavata dal fluido lacrimale con conseguente tempo di contatto col sito di assorbimento spesso inadeguato. Per superare questo ostacolo è auspicabile la realizzazione di *mucoadhesive drug delivery systems*, progettati a partire da polimeri con potenziali caratteristiche mucoadesive, ed è per questo che, in fase di design polimerico è stata scelta l'inulina come polimero di partenza.

Per lo studio delle proprietà mucoadesive delle micelle polimeriche prodotte sono stati impiegati due differenti metodi riportati in letteratura letteratura: il metodo del potenziale zeta ed il metodo della turbidimetria.

Il metodo del potenziale zeta è stato scelto in quanto è probabile che, in parte, l'eventuale interazione mucoadesiva tra le mucine e le micelle polimeriche sia di natura elettrostatica. La mucoadesione è, infatti, un processo complesso che può risultare da differenti interazioni tra cui attrazione elettrostatica, creazione di legami a idrogeno e di ponti disolfuro. Per meglio osservare e comprendere la possibile interazione elettrostatica tra mucina e micelle, le misure di potenziale zeta sono state condotte anche in acqua bidistillata. I risultati sono mostrati in **Fig. 35**.



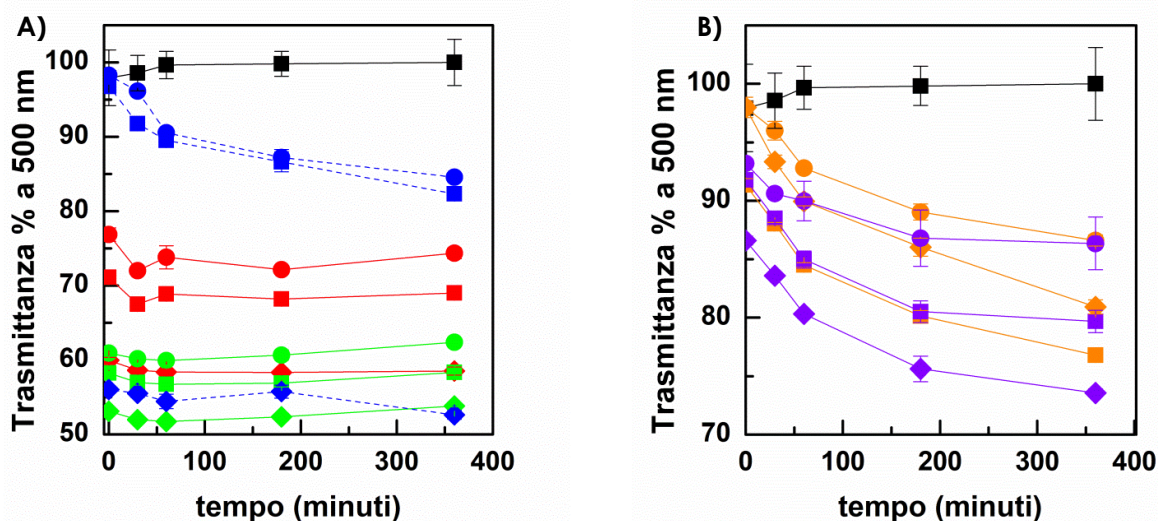
**Figura 35. Test di mucoadesione condotti con metodo del Potenziale Zeta: valori di Potenziale Zeta calcolati in A) acqua bidistillata e B) DPBS pH 7.4 per mucina (nero), micelle INU-EDA-RA (rosso), micelle INU-EDA-RA-PEG (verde) e miscele INU-EDA-RA+Mucina (rosso a linee nere) e INU-EDA-RA-PEG+Mucina (verde a linee nere) a differenti tempi di incubazione**

Com'è possibile osservare, la mucina mostra valori potenziale zeta marcatamente negativi a causa della presenza di residui di acido sialico. Al contrario, come precedentemente visto, entrambi i sistemi micellari hanno potenziale zeta positivo in acqua e debolmente negativo in DPBS pH 7.4. Le analisi sono state condotte a concentrazione fissa di mucina (0.4 mg/ml) e micelle (1 mg/ml) e a differenti tempi di incubazione (da 0 a 60 minuti) per valutare se la mucoadesione fosse tempo-dipendente. Miscelando mucina e micelle si osserva un'unica popolazione con potenziale zeta negativo e intermedio tra i valori ottenuti per la mucina e le micelle analizzati singolarmente, come conseguenza dell'avvenuta mucoadesione del sistema grazie alla presenza di interazioni elettrostatiche,

dimostrabile con la riduzione della negatività del potenziale zeta della miscela rispetto alla soluzione di mucina. È possibile inoltre osservare che a tempi di incubazione differenti corrispondono risultati, in termini di potenziale zeta, paragonabili. Questo risultato suggerisce che l'interazione mucoadesiva si instauri immediatamente al momento della miscelazione e che si mantenga stabile mostrando un comportamento tempo indipendente. I risultati ottenuti si dimostrano molto più palesi quando il mezzo disperdente è acqua bidistillata in quanto è addirittura possibile osservare un'inversione di potenziale zeta considerando le micelle da sole in dispersione (valori positivi) e le miscele mucina+micelle (valori negativi).

Successivamente, come ulteriore conferma, sono stati condotti studi di turbidimetria, valutando la trasmittanza a 500 nm di miscele di mucina (a concentrazione fissa) e micelle (a concentrazione crescente) in DPBS pH 7.4 per un tempo complessivo pari a 6 ore. I risultati sono stati riportati come trasmittanza percentuale calcolata in funzione ai valori di trasmittanza osservati per una dispersione di mucina usata come bianco. Il rationale di questo esperimento risiede nell'evidenza che, all'instaurarsi di un'interazione mucoadesiva, si ha la formazione di macroaggregati mucina+micelle caratterizzati da capacità di trasmittanza della luce inferiori. Infatti, un'importante riduzione nei valori di trasmittanza % osservati corrisponde a una forte interazione mucoadesiva. Con questa metodica sono state valutate sia le micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG che i due polimeri di partenza (INU e INU-EDA) a differenti tempo di incubazione (0, 30, 60, 180 e 360 minuti), è stato, inoltre impiegato l'acido poliacrilico (PAA) come controllo positivo di mucoadesione. I valori di trasmittanza delle micelle e dei polimeri senza mucina in DPBS pH 7.4 non sono stati riportati in quanto alla lunghezza d'onda d'esercizio sia i polimeri che le micelle mostrano valori di assorbanza pari a 0.





**Figura 36.** Trasmittanza % a 500 nm di Mucina (nero), A) micelle INU-EDA-RA (rosso), micelle INU-EDA-RA-PEG (verde), acido poliacrilico (blu), B) inulina (arancione) e INU-EDA (viola) alle concentrazioni di 0.5 mg/ml (cerchio), 1 mg/ml (quadrato) e 5 mg/ml (rombo)

Dal grafico in **Fig. 36 – pannello A**, si evince chiaramente come la natura mucoadesiva delle micelle sia confermata. I risultati ottenuti mostrano inequivocabilmente l’instaurarsi di una forte interazione mucoadesiva tra la mucina ed entrambi i sistemi micellari. Si conferma inoltre un’interazione di tipo tempo-indipendente che avviene immediatamente nel momento in cui mucina e micelle sono miscelate e che si mantiene costante, salda e stabile per tutta la durata dell’esperimento. I valori di trasmittanza % osservati sono infatti pressoché costanti a tutti i differenti tempi di incubazione considerati. Dai risultati ottenuti possiamo, inoltre, asserire che la mucoadesione è concentrazione-dipendente. Infatti all’aumentare della concentrazione di micelle INU-EDA-RA la trasmittanza % a 6 ore risulta rispettivamente abbattuta del 25%, 32% e 42%, rispetto a quella della sola mucina posta pari al 100%, all’aumentare della concentrazione micellare. Risultati analoghi si osservano per le micelle INU-EDA-RA-PEG che, in 6 h comportano una riduzione della trasmittanza % del 38%, 42% e 47% alle concentrazioni di 0.5, 1 e 5 mg/ml rispettivamente. A parità di concentrazione, inoltre, è possibile osservare che le micelle PEG-ylate mostrano un comportamento mucoadesivo più marcato. Questo è, appunto, legato alla capacità delle catene di PEG di dar vita a saldi legami a idrogeno addizionali

con le mucine, rendendo quindi ancora più salda l'interazione del sistema micellare con le stesse.

Il controllo positivo impiegato, alle due concentrazioni più basse testate, mostra un profilo di mucoadesione completamente differente da quello osservato per le micelle. Infatti per il PAA a 0.5 e 1 mg/ml si osserva una mucoadesione tempo-dipendente che comporta in entrambi i casi un analogo decremento di trasmittanza % limitato a circa il 15%. Solo alla più alta concentrazione testata (5 mg/ml) il PAA mostra un comportamento sovrapponibile a quello osservato per le micelle, dando luogo a una forte interazione mucoadesiva tempo-indipendente che comporta un abbattimento della trasmittanza % di entità paragonabile a quello osservato per le micelle INU-EDA-RA-PEG alla medesima concentrazione. Quanto osservato conferma, quindi, la bontà del metodo turbidimetrico per la valutazione delle proprietà mucoadesive nonché l'effettiva mucoadesione dei due sistemi micellari.

Tuttavia, sarebbe riduttivo limitarsi a osservare che l'interazione che si crea tra le micelle e la mucina sia meramente di natura elettrostatica. Infatti, considerando che, come precedentemente detto, la mucoadesione è un fenomeno complesso che può risultare da differenti tipologie di interazioni, non va dimenticato che l'inulina, come altri polisaccaridi quali l'acido ialuronico, possiede una notevole quantità di gruppi ossidrilici disponibili per la creazione di ponti a idrogeno. Per chiarire meglio come l'interazione tra micelle e mucina risulti multifattoriale il test turbidimetrico di mucoadesione è stato condotto anche impiegando soluzioni di inulina (INU) e di INU-EDA al fine di valutare le proprietà mucoadesive dello zucchero scelto quale polimero naturale di partenza e la variazione del suo comportamento dopo introduzione di gruppi ionizzabili carichi positivamente.

Com'è possibile osservare dal grafico in **Fig. 36 – pannello B**, sia l'INU che l'INU-EDA mostrano un profilo di mucoadesione completamente differente da quello osservato per le micelle polimeriche. Entrambi, infatti, hanno un comportamento tempo dipendente ma risultano in un fenomeno mucoadesivo meno pronunciato rispetto a quello osservato per le micelle (la riduzione della trasmittanza % è meno marcata). In particolare, l'INU sembra per di più mostrare un comportamento concentrazione indipendente. Infatti se è vero che passando da 0.5 a 1 mg/ml l'interazione mucoadesiva si fa più marcata, d'altro canto è anche possibile osservare che la concentrazione più alta testata (5 mg/ml) appare meno mucoadesiva della concentrazione intermedia (1 mg/ml). Questo è probabilmente dovuto al fatto che in ambiente acquoso l'inulina non forma sempre una soluzione perfetta.

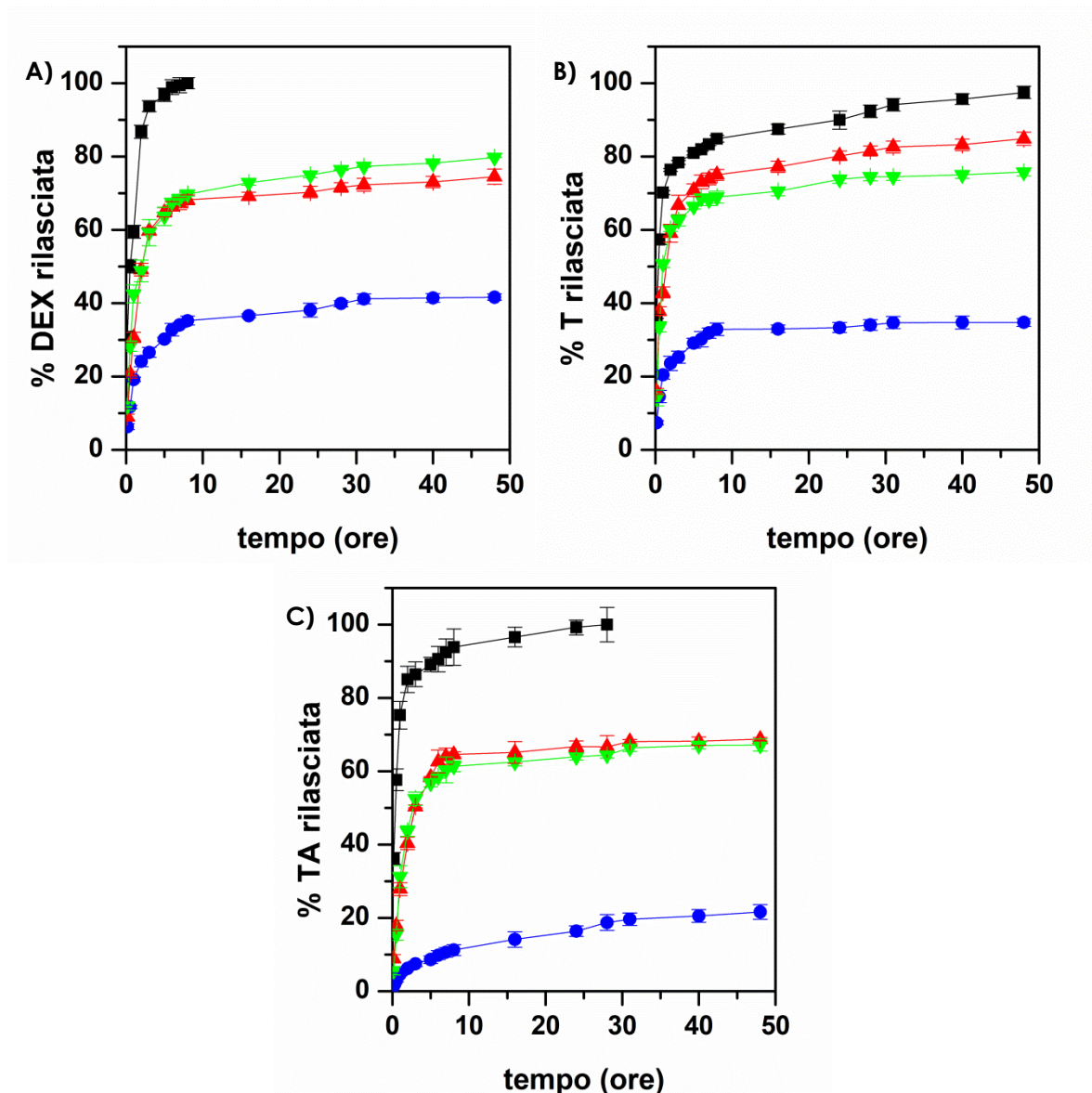
In realtà, infatti, essa partecola dando luogo a una dispersione. È possibile dunque ipotizzare che, quando le catene di INU si strutturano formando degli aggregati, non espongono più in maniera ottimale i gruppi idrossilici probabilmente responsabili dell'interazione mucoadesiva e questo può comportare quindi una minore mucoadesione nel complesso. Nonostante tutto, le proprietà mucoadesive del polisaccaride di partenza sono confermate. Al contrario, per l'INU-EDA è possibile osservare un comportamento concentrazione dipendente. In questo caso, infatti, la presenza di cariche positive potrebbe dar luogo a fenomeni repulsivi tra le catene polimeriche che comportano una mancata strutturazione e, quindi, una costante e inalterata esposizione dei gruppi responsabili della mucoadesione (che in questo caso sarebbero sia i gruppi ossidrilici dell'INU che i gruppi amminici protonabili dell'EDA).

Se è vero che i principali attori nella mucoadesione sia dell'INU-EDA che delle micelle INU-EDA-RA sono i gruppi ossidrilici dell'INU e i gruppi amminici protonabili dell'EDA, l'importante differenza nell'entità dell'interazione mucoadesiva che si instaura tra mucina+INU-EDA piuttosto che tra mucina+micelle INU-EDA-RA, è presumibilmente legata alla disposizione spaziale che questi gruppi assumono a seguito della formazione delle micelle. In questo caso, infatti le interazioni idrofobiche esistenti tra le porzioni lipofile del polimero anfifilico comportano la chiusura della struttura micellare e una probabile migliore esposizione dei gruppi idrofili responsabili non solo dell'interazione col solvente acquoso (e quindi della "disperdibilità" in acqua delle micelle) ma anche del legame con le mucine. Quanto detto è vero anche per quanto riguarda le micelle INU-EDA-RA-PEG. È ovvio, però, che in quest'ultimo caso la presenza del PEG, come già detto, contribuisce ulteriormente a rendere il sistema finale ancora più mucoadesivo.

La caratterizzazione tecnologica delle micelle polimeriche cariche di farmaco è consistita nella valutazione del rilascio di farmaco *in vitro* e negli studi di stabilità delle micelle sia sotto forma di liofilizzato che di dispersione in DPBS pH 7.4. Sono stati, poi, condotti i test di permeazione transcorneale sia *in vitro* che *ex vivo* per valutare l'effetto *enhancer* delle micelle polimeriche nei confronti dei farmaci impiegati.

Una volta che il farmaco scelto è stato adeguatamente incorporato all'interno del sistema carrier, opportunamente progettato in modo da possedere tutte le appropriate proprietà in termini di dimensioni, potenziale zeta, stabilità e carattere mucoadesivo, è, però, molto importante che il sistema carico sia in grado di rilasciare il farmaco che, solo così, potrà esplicare la sua azione farmacologica. A tal fine, la capacità di rilascio dei tre

farmaci è stata valutata impiegando il metodo della dialisi. Gli esperimenti sono stati condotti ponendo nel compartimento donatore un'appropriata quantità di micelle in DPBS pH 7.4 (concentrazione di farmaco nel donator pari a 500 µg/ml) e confrontando il profilo di rilascio dei farmaci dalle micelle con i profili di diffusione dei farmaci liberi da una soluzione alla loro massima solubilità in DPBS pH 7.4 (pari a 50 µg/ml per DEX e T e pari a 25 µg/ml per TA, raggiungibile solo previa solubilizzazione in metanolo e successiva diluizione con DPBS) e di dissoluzione da una sospensione (concentrazione di farmaco nel donator pari a 500 µg/ml, identica a quella impiegata per la valutazione del rilascio dalle micelle). I profili di rilascio e di diffusione dei tre farmaci sono stati riportati in percentuale rispetto alla quantità di farmaco inizialmente caricata nel donator in funzione del tempo e sono illustrati in **Fig. 37**



**Figura 37. Profilo di rilascio percentuale di A) DEX, B) T e C) TA dalle micelle INU-EDA-RA (rosso) e INU-EDA-RA-PEG (verde) confrontati con il profilo di diffusione del farmaco dalla soluzione (nero) e di dissoluzione e diffusione del farmaco dalla sospensione (blu)**

In tutti e tre i casi è possibile osservare che i farmaci liberi somministrati come soluzione sono in grado di fuoriuscire completamente dalla dialisi in breve tempo, al contrario, quando somministrati incorporati all'interno delle micelle vengono, seppure lievemente, trattenuti. Questo dato indica, ancora una volta, l'effettiva instaurazione di una salda interazione farmaco-micella. Tuttavia, sebbene percentualmente sembra che la soluzione sia in grado di portare nel compartimento accettore una quantità di farmaco superiore va ricordato che, a causa della bassa solubilità in ambiente acquoso dei 3

farmaci, gli esperimenti di rilascio dalle micelle e di diffusione dalle soluzioni sono condotti a concentrazione di farmaco nel compartimento donatore differente di almeno un ordine di grandezza. Infatti, nel caso di DEX e T il 100% di farmaco rilasciato corrisponde a 40 µg totali e nel caso di TA a 20 µg. D'altro canto, per quanto riguarda le micelle la quantità di farmaco posta in partenza nel donor è di 400 µg. Ne consegue che, anche per il rilascio percentuale più basso osservato (pari al 60% osservato per il TA a 48 h) la quantità complessiva rilasciata sarà pari a 240 µg totali e, quindi, nettamente superiore a quella fornita dalla soluzione. È questo il motivo per cui i 3 farmaci presi in considerazione non possono essere somministrati come soluzione, poiché, a causa della loro scarsa solubilità in ambiente acquoso, non sarebbe possibile il raggiungimento in situ della concentrazione terapeuticamente efficace di farmaco terapeuticamente. In genere, infatti, i corticosteroidi sono somministrati per via oculare topica sotto forma di sospensione. Ed è proprio paragonando i profili di rilascio dei farmaci dalle micelle con i profili di dissoluzione e diffusione degli stessi dalla sospensione che si osservano i risultati più interessanti. Infatti in questo caso la quantità di farmaco totale caricata nel donor è la medesima (400 µg) e, tuttavia, i due profili di rilascio e dissoluzione/diffusione sono molto differenti. Infatti, mentre tutte le micelle risultano in grado di rilasciare grandi quantità di farmaco velocemente, il farmaco solido in grado di passare in soluzione e diffondere attraverso la membrana da dialisi risulta nettamente inferiore. Prendendo in considerazione il profilo di dissoluzione/diffusione percentuale più alto osservato (40% osservato per il DEX a 48 h) la quantità complessiva di farmaco diffuso risulterà pari a 160 µg totali, certamente superiore a quella apportata dalla somministrazione della soluzione, ma chiaramente inferiore a quella apportata dalla somministrazione delle micelle. Ciò è probabilmente legato a una cinetica di dissoluzione dei tre farmaci in DPBS pH 7.4 estremamente lenta. Da'altra parte, quando il farmaco è somministrato incorporato all'interno delle micelle è già "in soluzione" (le micelle aumentano la solubilità in acqua dei tre farmaci) e, quindi, disponibile per l'assorbimento. Al contrario, la quota di farmaco in grado di passare in soluzione e quindi pronta per l'assorbimento e l'azione farmacologica dopo somministrazione di una sospensione è molto più scarsa. Un'altra possibile considerazione riguarda i profili di rilascio dei farmaci dai due differenti sistemi micellari INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG che si dimostrano analoghi, soprattutto nell'arco delle prime 8 h. I profili di rilascio risultano, inoltre, in accordo con i valori di log P dei 3 farmaci: il T (logP = 1.16) sembra mostrare il profilo di rilascio più alto e

comunque non troppo dissimile da quello del DEX ( $\log P = 1.83$ ), d'altra parte il TA ( $\log P = 2.53$ ) in quanto più lipofilo tra i 3 corticosteroidi scelto è quello che presenta un profilo di rilascio più basso. Alla luce di quanto detto, quindi, i risultati ottenuti sono estremamente positivi per entrambi i sistemi micellari.

Un altro parametro di estrema importanza nella realizzazione di un sistema farmaceutico è la sua stabilità. In particolare, per le micelle preparate, si ipotizza una somministrazione oculare topica sotto forma di eye drop. In tal senso è possibile immaginare una formulazione costituita da una polvere da disperdere al bisogno nell'opportuno fluido disperdente. In tal senso può essere, quindi, importante valutare la stabilità delle micelle prodotte sotto forma di polvere liofilizzata nonché come dispersione micellare. Pertanto sono stati condotti studi di stabilità, in termini di particle size e potenziale zeta, delle micelle sia come liofilizzato che come dispersione in DPBS conservate a 4°C e a 25°C.

I risultati ottenuti per quanto riguarda la stabilità delle micelle sotto forma di polvere liofilizzata sono mostrati in **Fig. 38**.

Com'è possibile osservare tutte le micelle cariche risultano stabili nel tempo a entrambe le temperature testate quando conservate sotto forma di liofilizzato fino a 3 mesi. Per tutti i sistemi micellari è, quindi, ipotizzabile una preparazione estemporanea. Inoltre, qualitativamente è stato osservato che il liofilizzato, in tutti i casi, risulta sempre immediatamente e facilmente disperdibile in DPBS pH 7.4.

In **Fig. 39**, sono, invece, mostrati i risultati ottenuti per gli studi di stabilità in dispersione. Com'è possibile osservare, le uniche micelle cariche che risultano completamente instabili sono le micelle INU-EDA-RA/TA, ad entrambe le temperature testate, mentre le micelle INU-EDA-RA-PEG/TA rimangono stabili in dispersione sia a 4°C che a 25°C solo fino a 7 giorni. Tutte le altre dispersioni micellari risultano, invece, stabili per tutto l'arco di tempo considerato (14 giorni). Un'importante informazione qualitativa ottenuta è l'assenza di precipitato in tutti i casi studiati per tutta la durata dell'esperimento. Ciò indica che il farmaco rimane incorporato all'interno del sistema micellare. È quindi, proponibile la preparazione estemporanea multidose delle dispersioni micellari che possono essere utilizzate fino a 2 settimane dopo la data di dispersione, ad eccezione delle micelle INU-EDA-RA-PEG/TA che potrebbero essere utilizzate fino a 7 giorni. Per le micelle INU-EA-RA/TA è, invece, pensabile la preparazione estemporanea monodose.



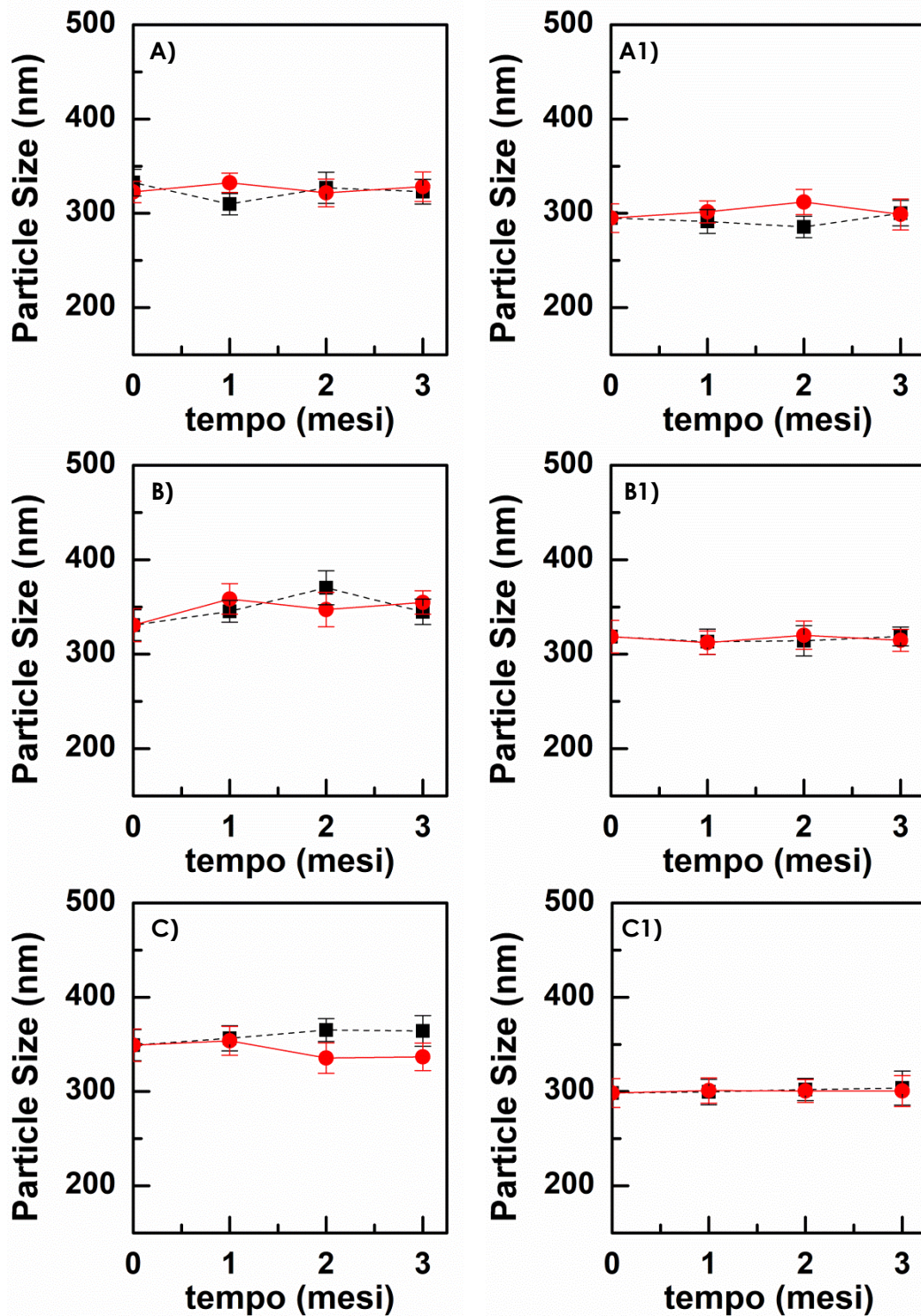


Figura 38. Stabilità delle micelle A) INU-EDA-RA/DEX, A1) INU-EDA-RA-PEG/DEX, B) INU-EDA-RA/T, B1) INU-EDA-RA-PEG/T, C) INU-EDA-RA/TA e C1) INU-EDA-RA-PEG/TA conservate come polvere liofilizzata a 4°C (rosso) e 25°C (nero) fino a 3 mesi



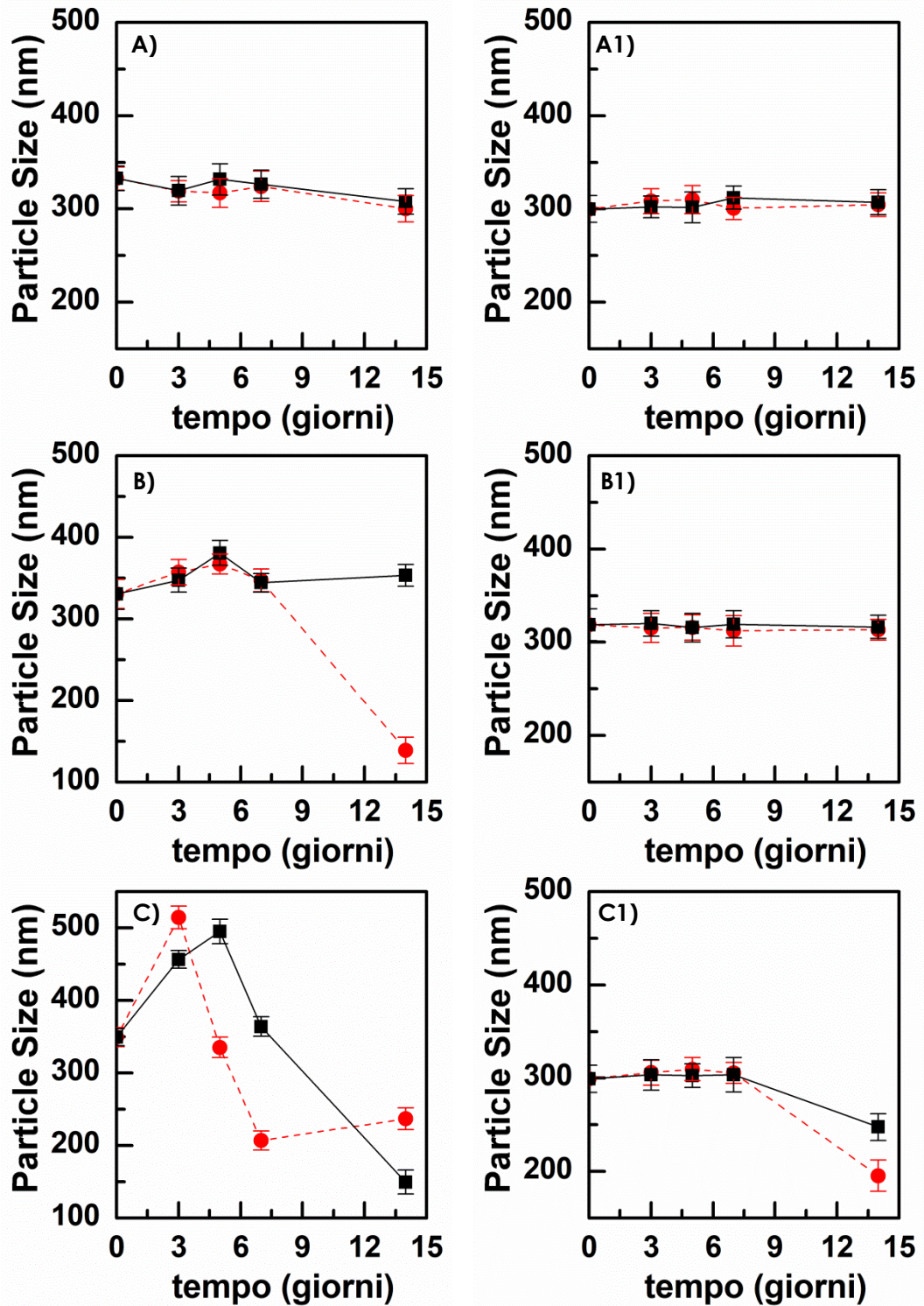
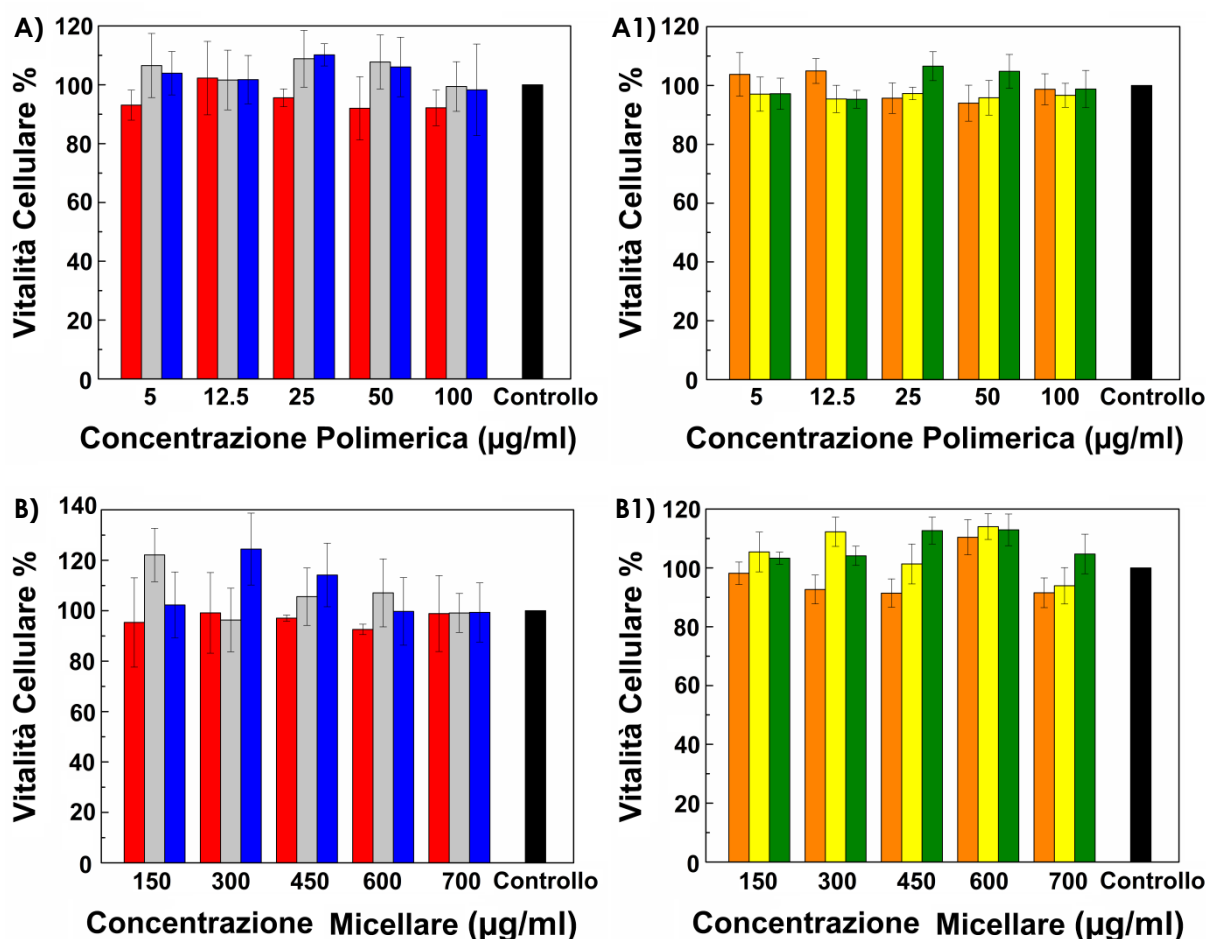


Figura 39. Stabilità delle micelle A) INU-EDA-RA/DEX, A1) INU-EDA-RA-PEG/DEX, B) INU-EDA-RA/T, B1) INU-EDA-RA-PEG/T, C) INU-EDA-RA/TA e C1) INU-EDA-RA-PEG/TA disperse in DPBS pH 7.4 e mantenute a 4°C (rosso) e 25°C (nero) fino a 14 giorni

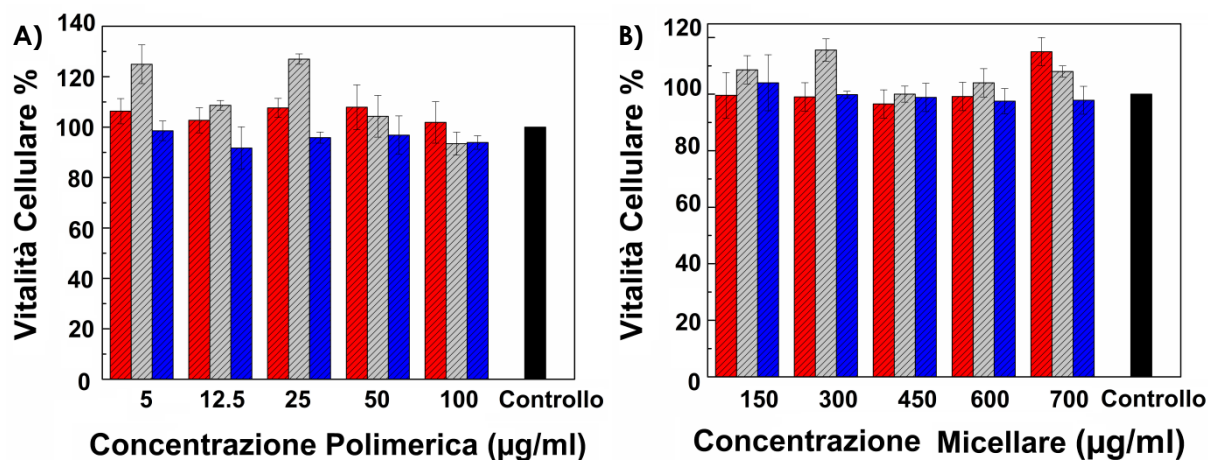
Nella valutazione dell'effettiva somministrabilità delle micelle polimeriche sulla superficie oculare è importante determinare se i polimeri e i sistemi micellari preparati risultano citocompatibili nei confronti delle cellule umane di interesse. In tal senso sono stati condotti studi di vitalità cellulare *in vitro* impiegando cellule dell'epitelio corneale umano (HCEpiC). Gli esperimenti sono stati condotti incubando per tempi differenti (1, 4 e 24 h) le cellule con soluzioni dei due polimeri o dispersioni delle micelle polimeriche vuote a concentrazione crescente, valutando la vitalità cellulare mediante saggio MTS e rapportandola ad un controllo di cellule non trattate

Come illustrato in **Fig. 40**, sia i polimeri che le micelle sono risultati perfettamente citocompatibili a tutte le concentrazioni impiegate e per tutti i tempi testati, in accordo con l'International Standard (ISO 10993-5).



**Figura 40. Vitalità Cellulare %, riferita a cellule controllo non trattate (nero) dopo il trattamento di cellule dell'epitelio corneale umano (HCEpiC) con A) concentrazioni crescenti di polimero e B) micelle INU-EDA-RA, A1) concentrazioni crescenti di polimero e B1) micelle INU-EDA-RA-PEG per 1 h (rosso – arancione), 4 h (grigio – giallo) e 24 h (blu – verde)**

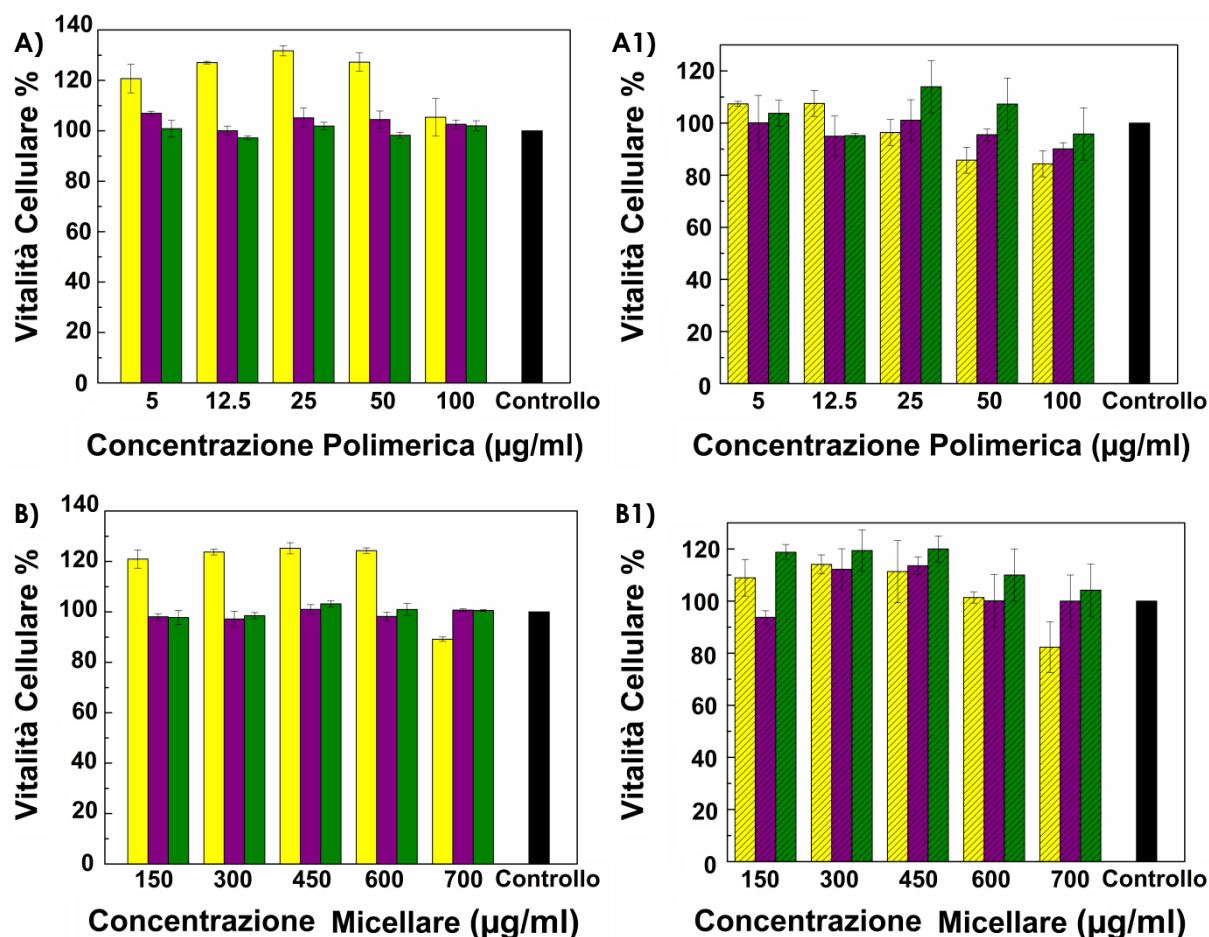
Inoltre, per il polimero e le micelle INU-EDA-RA è stata saggiata anche la citocompatibilità nei confronti di cellule dell'epitelio corneale murino (MCEpiC), ottenendo risultati analoghi a quanto osservato per le HCEpiC (**Fig. 41**).



**Figura 41. Vitalità Cellulare %, riferita a cellule controllo non trattate (nero) dopo il trattamento di cellule dell'epitelio corneale murino (MCEpiC) con A) concentrazioni crescenti di polimero e B) micelle INU-EDA-RA per 1 h (rosso con linee nere), 4 h (grigio con linee nere) e 24 h (blu con linee nere)**

Alla luce del fatto che nella terapia delle principali patologie della retina il target cellulare è spesso costituito dalle cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE), le micelle ed il polimero INU-EDA-RA sono state saggiate anche su questa linea cellulare, sia umana (HRPE) che murina (MRPE). In questo caso la vitalità cellulare è stata valutata a 24, 48 e 72 h di incubazione. Anche in questo caso sia il polimero che le micelle risultano citocompatibili a tutte le concentrazioni e a tutti i tempi studiati (**Fig. 42**).

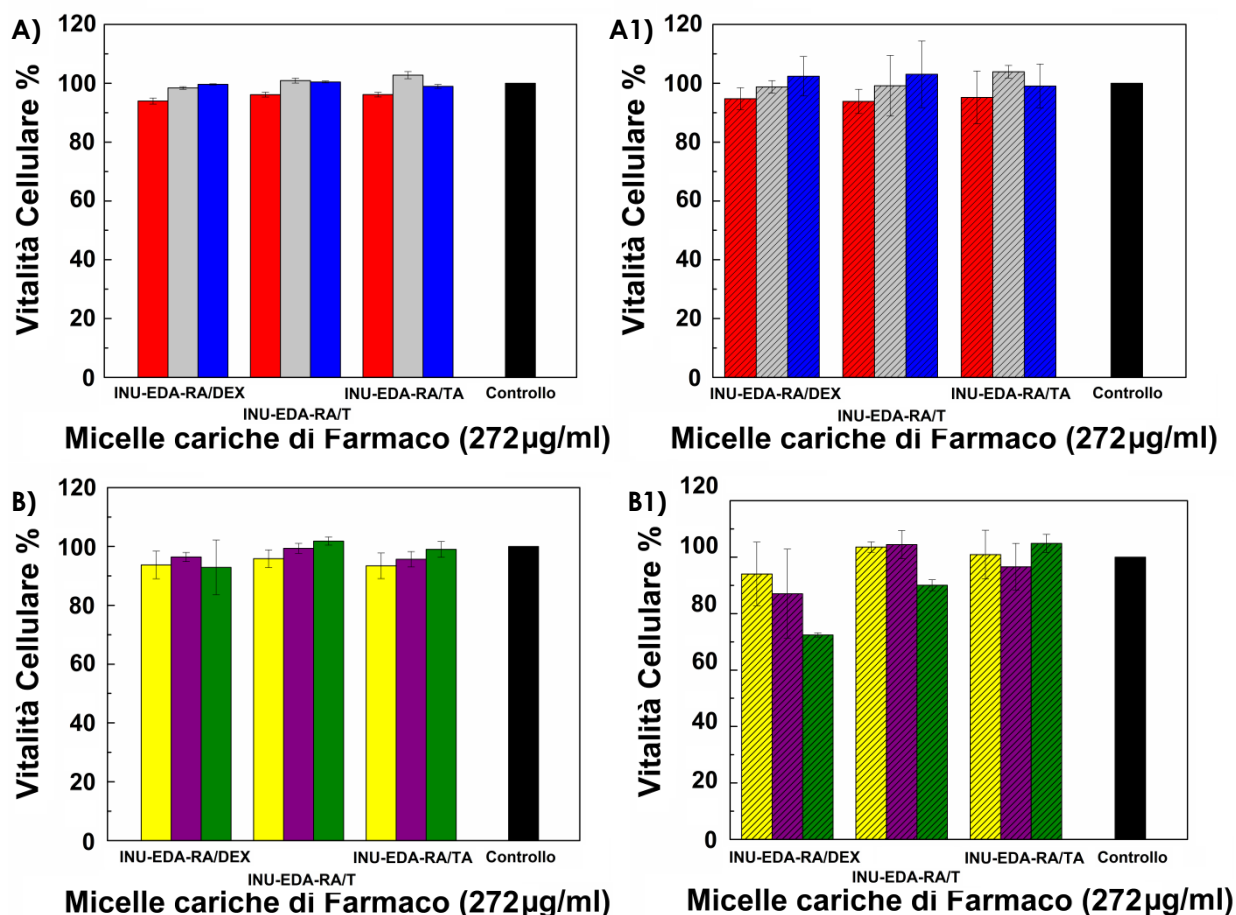
Infine, su tutte e quattro le linee cellulari (HCEpic, MCEpiC, HRPE e MRPE) sono stati condotti studi di citocompatibilità incubando le cellule con concentrazioni fisse di micelle INU-EDA-RA cariche di farmaco. Anche i sistemi carichi sono risultati citocompatibili (**Fig. 43**).



**Figura 42. Vitalità Cellulare %, riferita a cellule controllo non trattate (nero) dopo il trattamento di cellule dell'epitelio pigmentato retinico A) e B) umano (HRPE) e A1) e B1) murino (MRPE) con A) e A1) concentrazioni crescenti di polimero e B) e B1) micelle INU-EDA-RA per 24 h (giallo e giallo con linee nere), 48 h (viola e viola con linee nere) e 72 h (verde e verde con linee nere)**

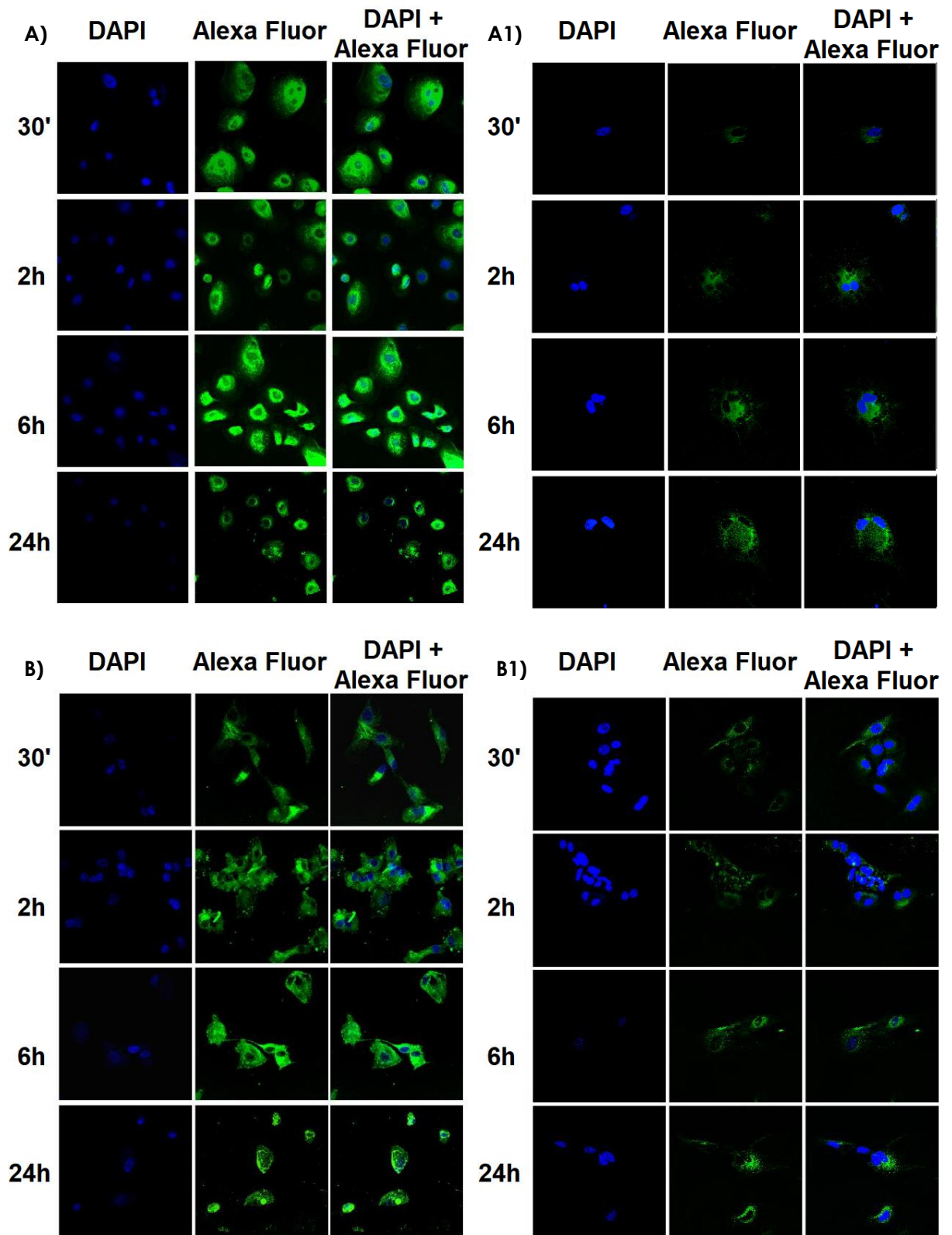
In generale è possibile osservare che tutti i polimeri e le micelle analizzate sono citocompatibili su tutte le linee cellulari testate (vitalità cellulare > 70%). Inoltre, sebbene i risultati per il medesimo polimero e per le stesse micelle sulle linee cellulari umane e murine siano paragonabili, si osserva una maggiore citocompatibilità sulle linee cellulari umani che, comunque, rappresentano il reale target della formulazione sia in termini di somministrazione (HCEpiC) che di azione terapeutica (HRPE).



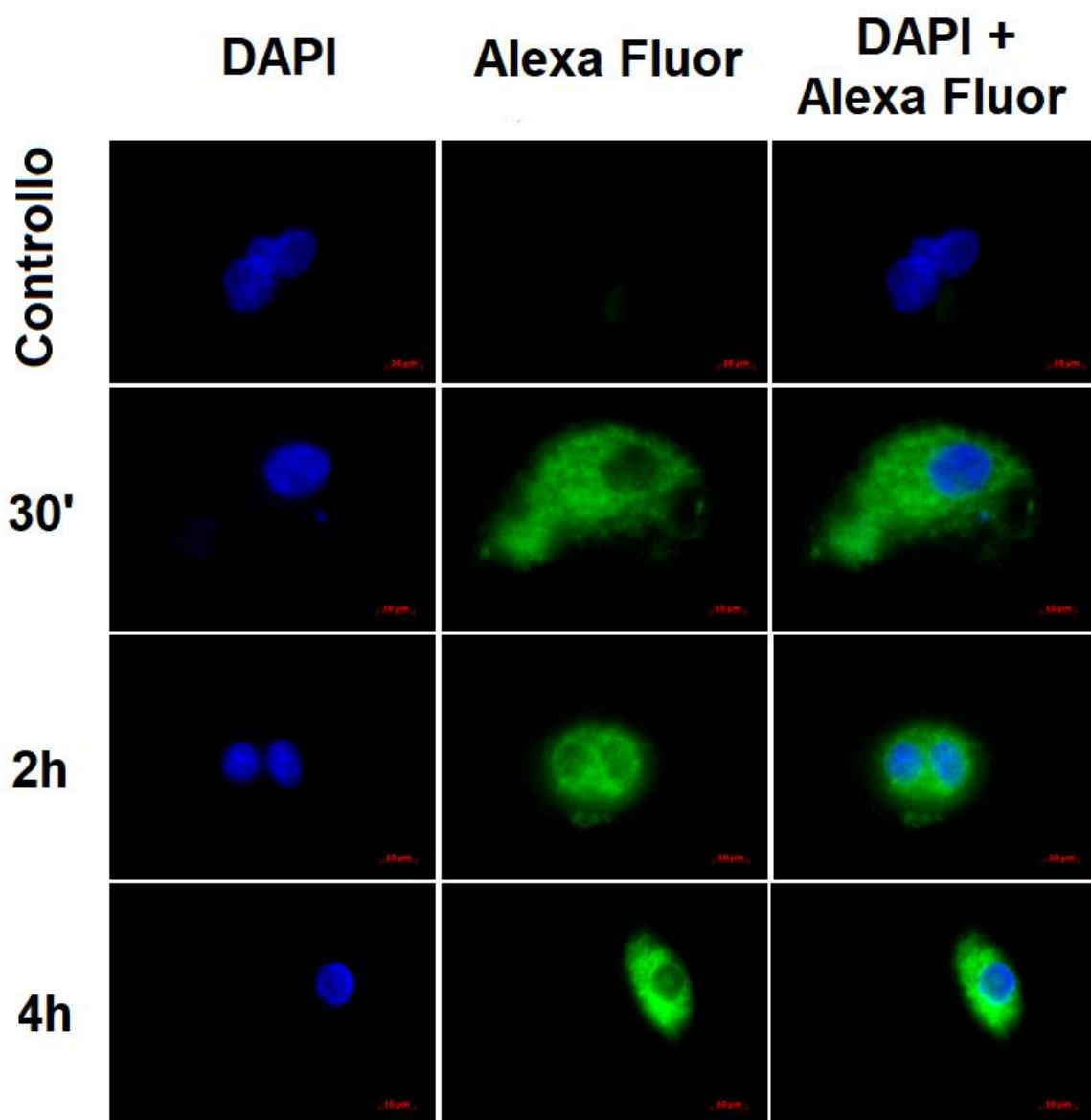


**Figura 43. Vitalità Cellulare %, riferita a cellule controllo non trattate (nero) dopo il trattamento di A) HCEpic, A1) MCEpic, B) HRPE e B1) MRPE con concentrazioni fisse di micelle INU-EDA-RA cariche di farmaco per 1 h (rosso e rosso con linee nere), 4 h (grigio e grigio con linee nere) e 24 h (blu e blu con linee nere) sulle cellule corneali oppure 24 h (giallo e giallo con linee nere), 48 h (viola e viola con linee nere) e 72 h (verde e verde con linee nere) sulle cellule retiniche**

Mediante studi di uptake *in vitro* è stato, inoltre, possibile valutare la capacità delle micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG, marcate opportunamente con una sonda fluorescente, di interagire con le cellule e di essere internalizzate. Gli studi sono stati condotti impiegando HCEpic, HRPE, MCEpic e MRPE per quanto riguarda le micelle INU-EDA-RA e con le sole HCEpic per le micelle INU-EDA-RA-PEG. Per riuscire a visualizzare qualitativamente le micelle esse sono state previamente marcate chimicamente con la sonda fluorescente Alexa Fluor<sub>488</sub>. I nuclei cellulari sono stati, invece, colorati con DAPI e le cellule sono state incubate con una concentrazione fissa di micelle (200 µg/ml) per differenti tempi. Le immagini ottenute mostrano in tutti i casi fenomeni di uptake. In



**Figura 44. Studi di uptake qualitativo *in vitro* di micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> su A) HCEpiC, A1) MCEpiC, B) HRPE e B1) MRPE. Le immagini sono acquisite mediante microscopia confocale laser (60 X)**



**Figura 45.** Studi di uptake qualitativo *in vitro* di micelle INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> su HCEpiC. Le immagini sono acquisite mediante microscopia a fluorescenza (100 X)

**Fig. 44** sono riportate le immagini ottenute per le micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e in **Fig. 45** per le micelle INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>.

Com'è possibile osservare, entrambi i sistemi micellari mostrano una buona internalizzazione all'interno di tutte le linee cellulari testate, come indicato dall'intensa fluorescenza visibile all'interno delle cellule già dopo soli 30 minuti di incubazione con le micelle. Per di più l'uptake è mantenuto nel tempo e sembra rimanere costante fino alla fine di tutti gli esperimenti. L'unica differenza riscontrata è in termini di intensità del fenomeno di uptake tra le cellule umane e quelle murine in quanto, su entrambe le linee cellulari

umane, il fenomeno sembra nettamente maggiore. Questo ovviamente risulta positivo in quanto il target effettivo dello studio è costituito dalle cellule umane.

Come ultimo step di caratterizzazione, grande attenzione è stata dedicata alla valutazione delle proprietà di *permeation/penetration enhancer* delle micelle prodotte mediante studi di permeazione transcorneale sia *in vitro* che *ex vivo*. A tale scopo sono state impiegati sistemi transwell per gli studi *in vitro* e celle di diffusione verticale di Franz per gli studi *ex vivo*.

I sistemi transwell sono stati scelti quale modello a due compartimenti per valutare il profilo di permeazione delle micelle e dei farmaci scelti attraverso il primo strato della complessa struttura corneale corneale: l'epitelio. A tal fine sono state impiegate le HCEpiC. I risultati (**Fig. 46**) ottenuti sono illustrati in termini di  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti/farmaco permeati in funzione del tempo. Inoltre in **Fig. 47** sono riportate le quantità % di micelle fluorescenti/farmaco ritrovata nei tre compartimenti (donor, cellule e accettore) al termine dell'esperimento di permeazione.

Gli studi effettuati hanno permesso di osservare che le micelle vuote sono in grado di permeare attraverso il monolayer di cellule corneali umane senza rimanervi intrappolate. Dallo studio di uptake, infatti, si evince che le micelle sono in grado di essere internalizzate dalle cellule corneali ma è importante che non vi rimangano bloccate poiché il target da raggiungere non è l'epitelio corneale umano. Inoltre, per quanto riguarda le micelle cariche è possibile vedere che tutti i sistemi sono in grado di incrementare la quantità di farmaco permeata. Se da una parte questo potrebbe dipendere solo dal fatto che la concentrazione di farmaco somministrata con le micelle è maggiore, d'altro canto possiamo osservare che l'incremento di farmaco permeato si osserva anche in percentuale. Inoltre, in particolare nel caso di DEX e T si osserva ritenzione del farmaco a livello cellulare quando viene studiato il profilo di permeazione del farmaco in soluzione. Questa quota di farmaco ritenuta non è presente a seguito della somministrazione delle micelle. Ciò potrebbe suggerire un differente meccanismo di permeazione del farmaco mediato dalla presenza delle micelle. Un comportamento differente si osserva nello studio del profilo di permeazione del TA. Va però ricordato che il TA, avendo una lipofilia superiore a DEX e T, deve necessariamente essere dissolto in metanolo e poi diluito in mezzo cellulare per ottenere una soluzione da poter utilizzare per lo studio. È chiaro che, nonostante la diluizione, il metanolo potrebbe causare un'interferenza tale da scompaginare l'integrità del monolayer cellulare causando un'eccessiva permeazione del



farmaco. Infatti, come riportato in letteratura, il metanolo, in analogia agli altri alcoli a corta catena, può agire da *penetration/permeation enhancer* (Aulton ME et al. 2015). Probabilmente è questo il motivo per cui i risultati ottenuti per il TA non sono analoghi a quelli ottenuti per gli altri due farmaci. Non va comunque dimenticato che il TA di per sé non potrebbe essere somministrato come soluzione in quanto per preparare tale soluzione è necessario ricorrere ad un artificio che richiede l'impiego di un solvente organico.

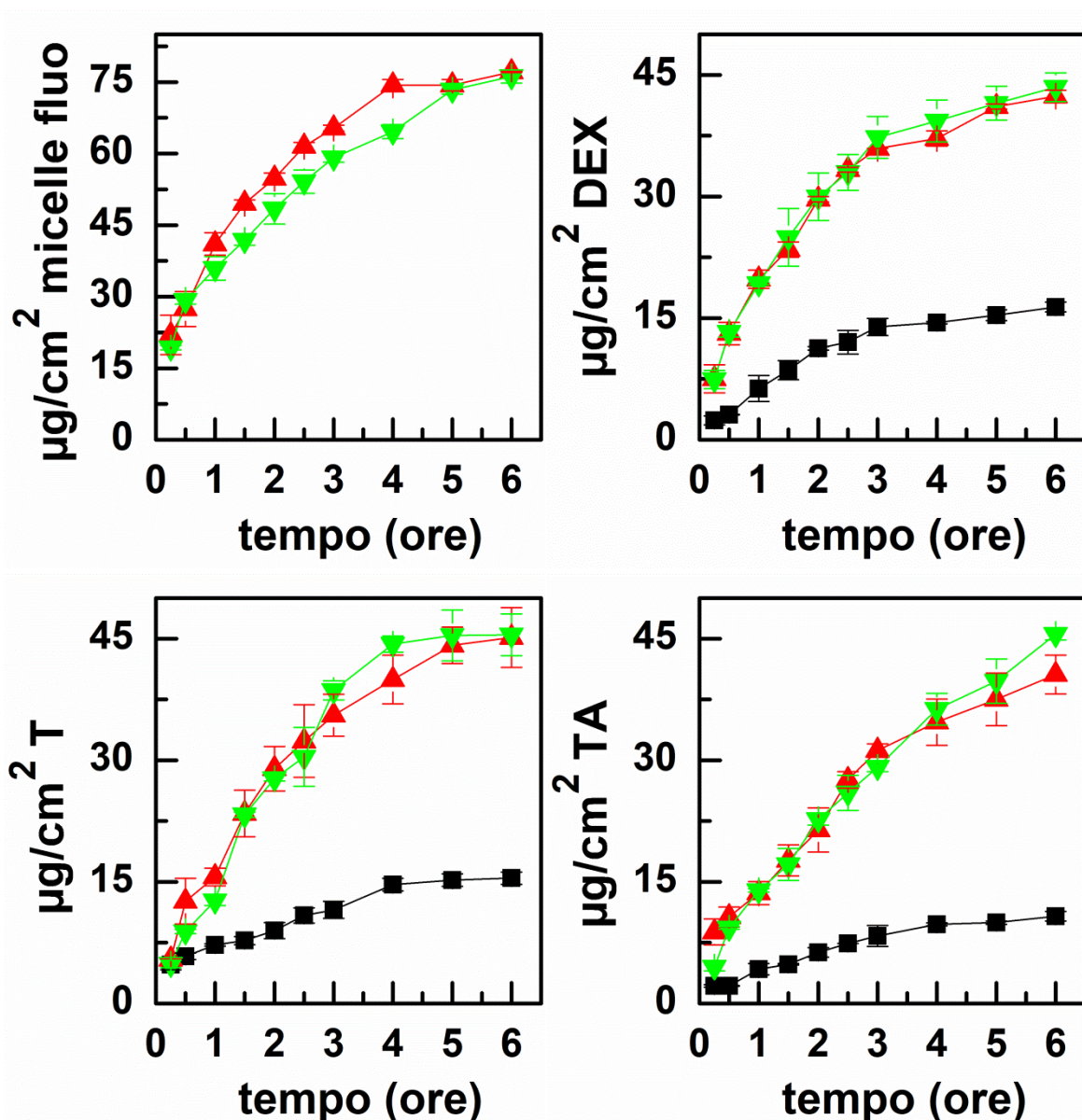
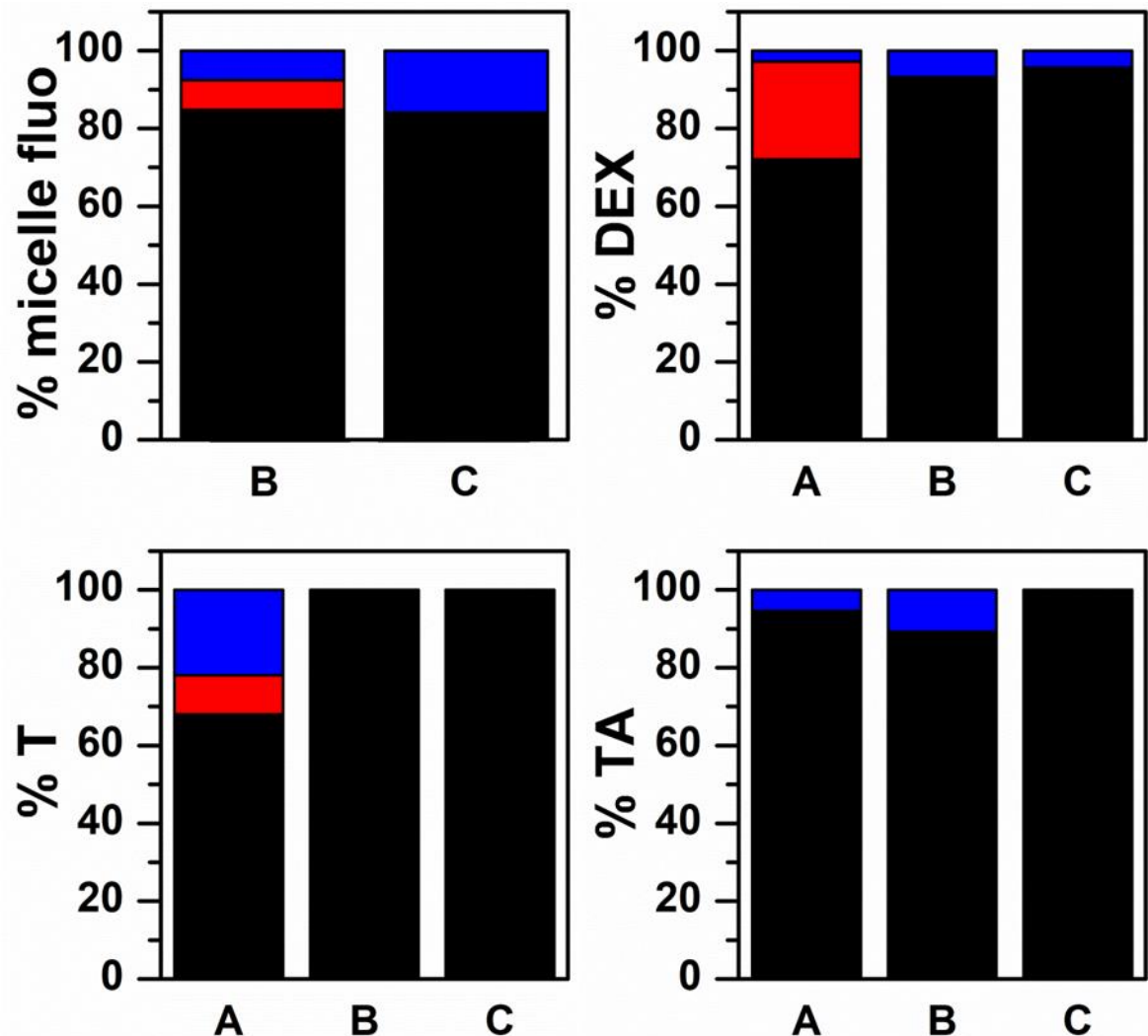


Figura 46. Studi di permeazione transcorneale *in vitro* con HCEpiC:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti, DEX, T e TA permeati in funzione del tempo (fino a 6 h) dopo somministrazione di soluzioni di farmaco (nero) e dispersioni di micelle INU-EDA-RA (rosso) o INU-EDA-RA-PEG (verde)

Sebbene la forma farmaceutica generalmente impiegata per la somministrazione oculare topica di questi farmaci sia una sospensione, non è stato possibile condurre questo set di esperimenti *in vitro* impiegando delle sospensioni di farmaco in quanto questo avrebbe portato a precipitazione delle particelle di farmaco solido sulla superficie delle cellule corneali, occludendole e danneggiandole.

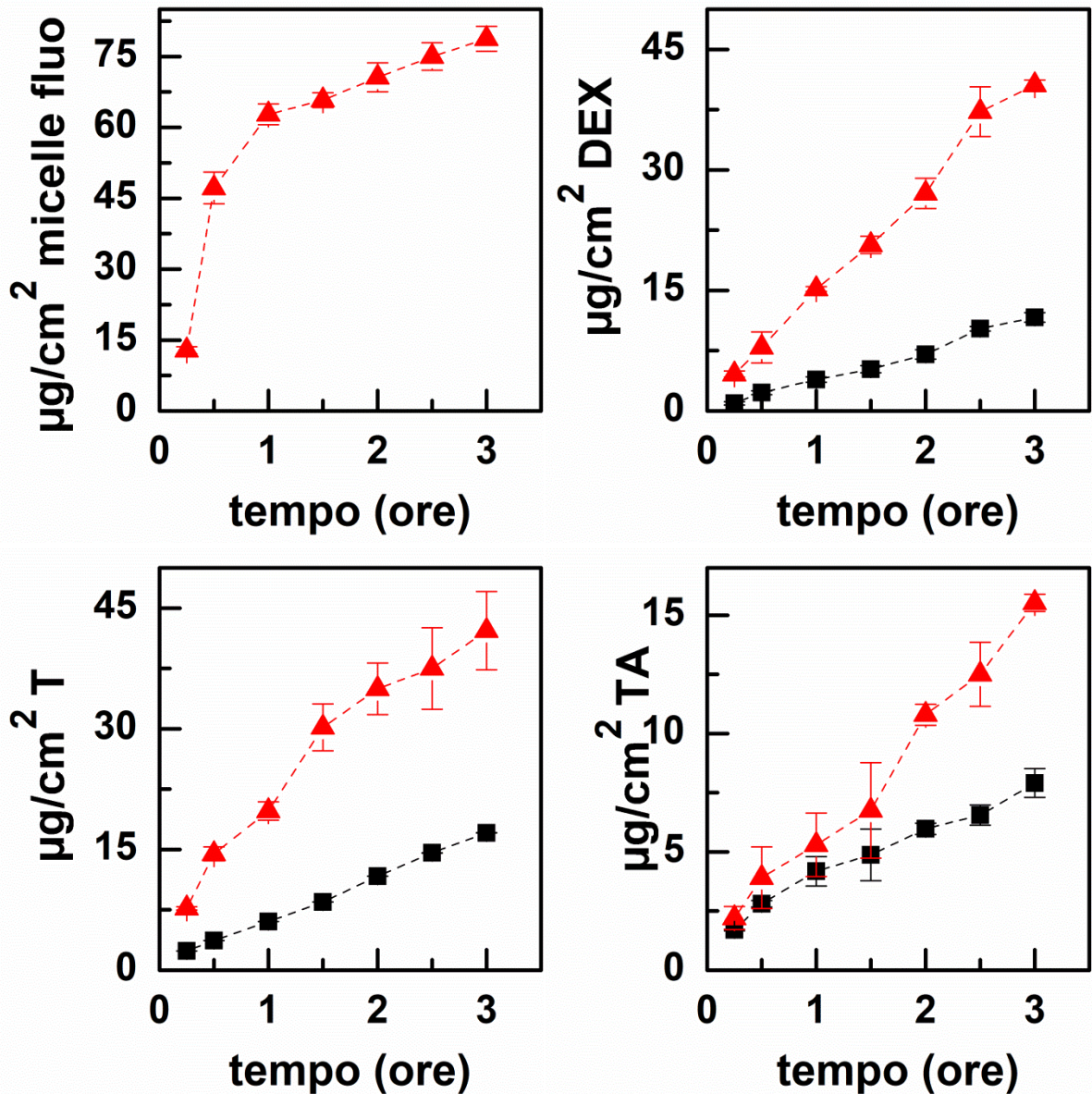
Dagli esperimenti *in vitro* condotti si osserva un comportamento completamente sovrapponibile delle micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG in tutti i casi. In generale si ha un comportamento di pseudo steady-state nelle prime tre ore con un successivo raggiungimento del plateau.



**Figura 47. Studi di permeazione transcorneale *in vitro* con HCEpiC: % di micelle fluorescenti, DEX, T e TA nel compartimento accettore (nero), all'interno delle cellule (rosso) e nel donator (blu) al termine dell'esperimento (6 h) dopo somministrazione di soluzioni di farmaco (A), micelle INU-EDA-RA (B) o micelle INU-EDA-RA-PEG (C)**

I medesimi esperimenti sono stati condotti, per quanto riguarda le micelle INU-EDA-RA si vuole che cariche di farmaco, anche utilizzando MCEpiC. Gli studi condotti in questo caso hanno avuto durata complessiva pari a 3 h in quanto, come già osservato, corrisponde ad uno stato di pseudo steady state cui segue il plateau.

I risultati ottenuti sono illustrati in **Fig. 48** e **49** e risultano analoghi a quelli ottenuti impiegando HCEpiC.



**Figura 48.** Studi di permeazione transcorneale *in vitro* con MCEpiC:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti, DEX, T e TA permeati in funzione del tempo (fino a 3 h) dopo somministrazione di soluzioni di farmaco (nero) e dispersioni di micelle cariche INU-EDA-RA (rosso)



Per quantificare realmente l'entità dell'effetto *enhancer* mediato dalle micelle sono stati applicati gli opportuni modelli matematici, come precedentemente descritto, al fine di paragonare i risultati sperimentali sia di flusso ( $J_s$ ) di farmaco attraverso la superficie di assorbimento, ma anche, e soprattutto, in termini di coefficiente di permeabilità ( $K_p$ ). Questo è, infatti, l'unico modo per avere un dato reale che normalizzi la differente concentrazione di farmaco inizialmente caricata nel donore.

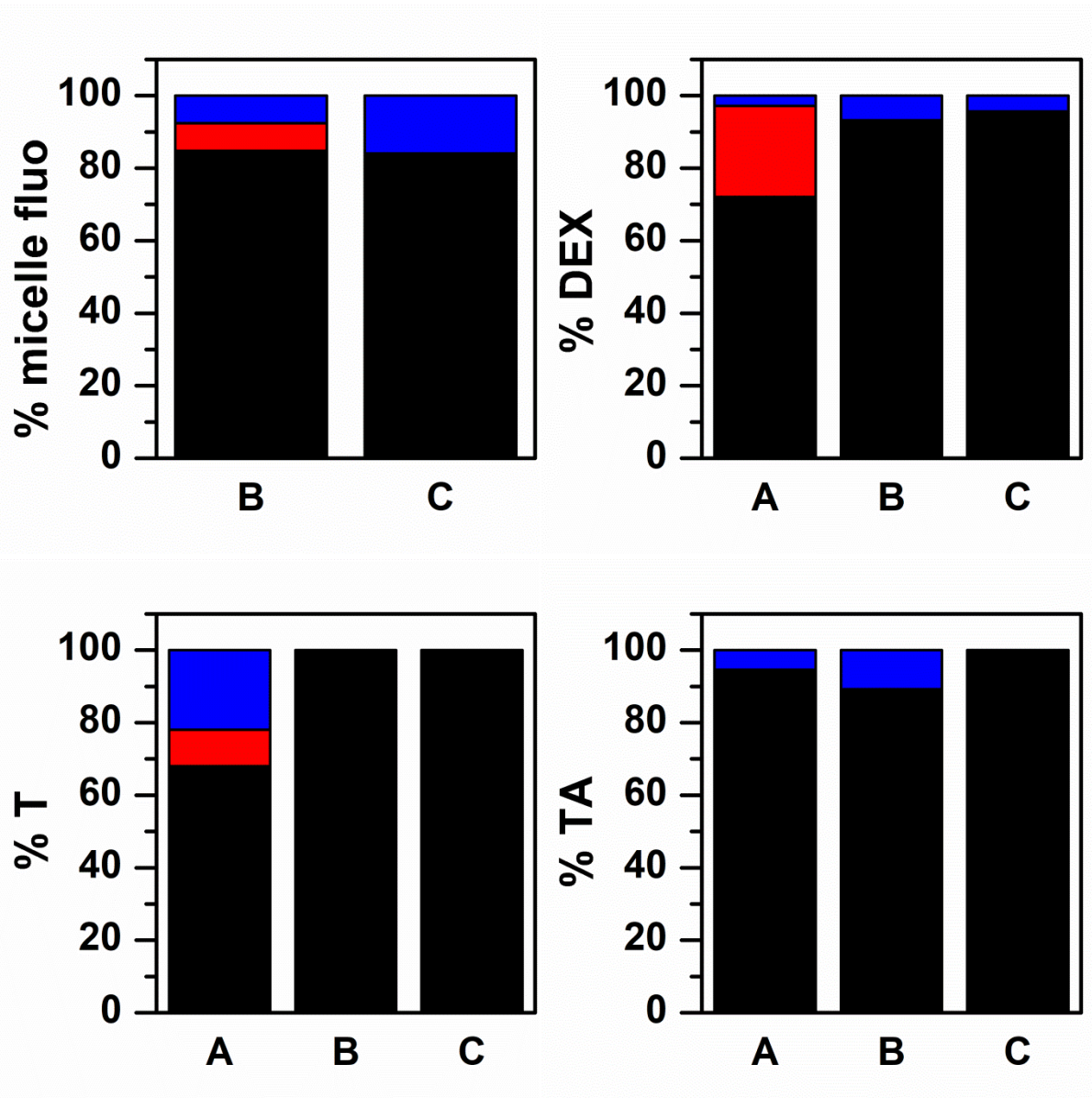


Figura 49. Studi di permeazione transcorneale *in vitro* con HCEpiC: % di micelle fluorescenti, DEX, T e TA nel compartimento accettore (nero), all'interno delle cellule (rosso) e nel donore (blu) al termine dell'esperimento (6 h) dopo somministrazione di soluzioni di farmaco (A), micelle INU-EDA-RA (B) o micelle INU-EDA-RA-PEG (C)

I valori di  $J_s$  e  $K_p$  calcolati per i test di permeazione transcorneale *in vitro* sono riportati in **Tabella 3** e confermano quanto già evinto dai grafici di permeazione.

**Tabella 3. Valori di  $J_s$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) e  $K_p$  (cm/h)  $\pm$  SD ottenuti dai test di permeazione transcorneale *in vitro* per DEX, T e TA somministrati come soluzione o caricati all'interno delle micelle**

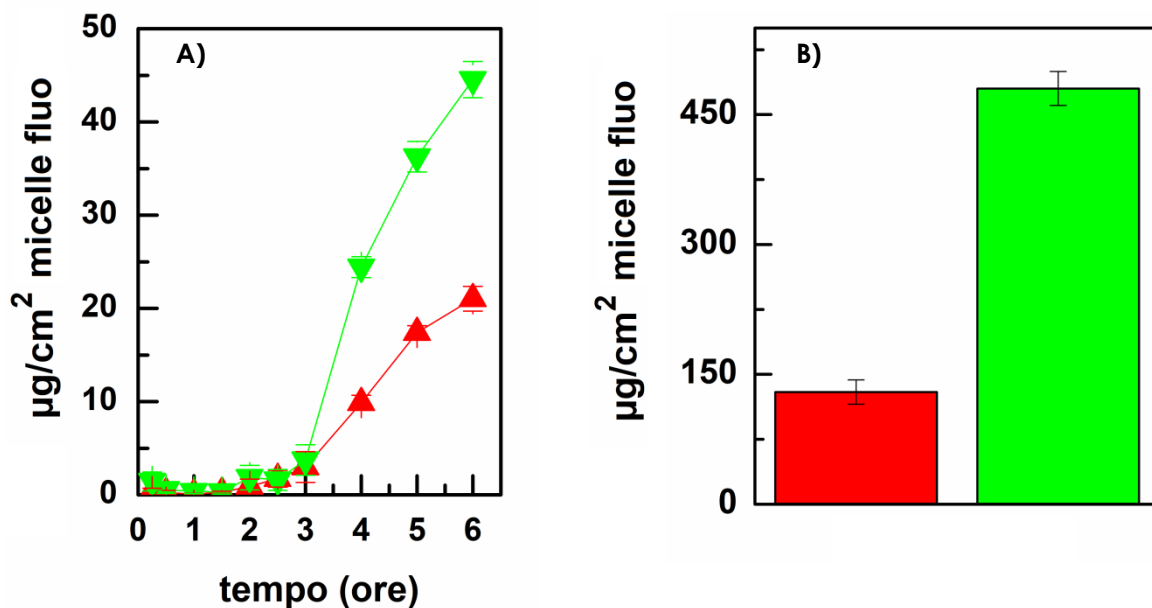
	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) (MCEpiC)	$K_p$ (cm/h) (MCEpiC)	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) (HCEpiC)	$K_p$ (cm/h) (HCEpiC)
DEX (soluzione)	3.859 $\pm$ 0.109	0.0772 $\pm$ 0.0016	3.962 $\pm$ 0.224	0.0792 $\pm$ 0.0023
INU-EDA-RA/DEX	13.474 $\pm$ 0.415	0.1347 $\pm$ 0.0054	10.120 $\pm$ 0.136	0.1012 $\pm$ 0.0024
INU-EDA-RA-PEG/DEX	-	-	10.444 $\pm$ 0.114	0.1044 $\pm$ 0.0030
T (soluzione)	5.405 $\pm$ 0.098	0.1081 $\pm$ 0.0011	2.667 $\pm$ 0.251	0.0533 $\pm$ 0.0045
INU-EDA-RA/T	12.319 $\pm$ 0.194	0.1232 $\pm$ 0.0021	12.224 $\pm$ 0.165	0.1222 $\pm$ 0.0013
INU-EDA-RA-PEG/T	-	-	12.188 $\pm$ 0.146	0.1219 $\pm$ 0.0015
TA (soluzione)	2.089 $\pm$ 0.135	0.0836 $\pm$ 0.0035	2.244 $\pm$ 0.245	0.0898 $\pm$ 0.0041
INU-EDA-RA/TA	4.732 $\pm$ 0.114	0.0473 $\pm$ 0.0014	7.183 $\pm$ 0.105	0.0718 $\pm$ 0.0012
INU-EDA-RA-PEG/TA	-	-	9.326 $\pm$ 0.152	0.0933 $\pm$ 0.0014

Entrambi i sistemi micellari funzionano da *enhancer* di permeazione transcorneale *in vitro* nei confronti dei 3 farmaci testati. Si osservano, infatti aumenti sia dei valori di  $J_s$  che di  $K_p$  rispetto ai valori calcolati per la soluzione di farmaco libero. Inoltre, in generale, è possibile osservare che impiegando cellule murine o umane non vi sono significative differenze e che, stando semplicemente ai test *in vitro*, le micelle, siano esse PEG-ylate o no, si comportano esattamente nello stesso modo, dando luogo ad un effetto *enhancer* della stessa entità.

Lo studio di permeazione transcorneale *in vitro* in questo caso specifico risulta, però, alquanto riduttivo. Negli studi finora condotti, infatti, è stato mimato semplicemente

l'attraversamento della prima porzione corneale, ossia l'epitelio. Tuttavia, la cornea è una barriera complessa costituita da 5 differenti strati che, dall'esterno all'interno sono: epitelio, membrana di Bowman, stroma, membrana di Descemet ed endotelio. Essi creano una struttura altamente selettiva, ove porzioni lipofile e idrofile si alternano rendendo difficile il passaggio sia per molecole lipofile che idrofile. In tal senso le micelle polimeriche possono essere promettenti *penetration/permeation enhancers* in quanto, essendo costituite da polimeri anfifilici, sono idealmente in grado di interagire efficacemente con tutte le porzioni della barriera corneale. Per di più, l'epitelio corneale è, in realtà, una struttura pluristratificata. Tuttavia negli studi *in vitro* condotti è stata valutata la permeazione attraverso un monolayer cellulare. I dati finora ottenuti sono, quindi, estremamente preliminari e sarebbe prematuro magnificare già adesso le qualità da *enhancer* delle micelle.

Di conseguenza, al fine di valutare in maniera più approfondita l'efficacia delle micelle sono stati condotti studi di permeazione *ex vivo* impiegando celle di Franz, scelte quale modello a due compartimenti aperti, cornee bovine, in quanto altamente rassomiglianti ai corrispondenti tessuti umani, ed HEPES pH 7.4, come fluido simulante i liquidi oculari. Gli esperimenti sono stati condotti, in analogia a quanto fatto prima, sia impiegando le micelle vuote marcate con la sonda fluorescente che impiegando le micelle cariche di farmaco. In questo caso, però, è stato possibile studiare il profilo di permeazione dei farmaci liberi somministrati sia come soluzione che come sospensione. I risultati ottenuti per le micelle fluorescenti sono mostrati in **Fig. 50**.



**Figura 50. Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti A) permeate in funzione del tempo (fino a 6 h) e B) intrappolate all'interno del tessuto corneale, dopo somministrazione di micelle fluorescenti INU-EDA-RA (rosso) e INU-EDA-RA-PEG (verde) fino a 6 h**

Già da questi primi studi è possibile osservare come i risultati *ex vivo* appaiano totalmente differenti da quelli osservati per gli studi *in vitro*. Le micelle fluorescenti, infatti, sono in entrambi i sistemi in grado di attraversare la barriera corneale. Dal profilo di permeazione ottenuto, però, è chiaramente visibile come l'andamento di permeazione per le due micelle sia nettamente diverso ed in particolare significativamente maggiore nel caso delle micelle PEG-ylate, a dimostrazione dell'effetto di *permeation enhancer* del PEG. Al termine dell'esperimento, infatti, la quantità di micelle INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> permeata risulta 2.12 volte maggiore rispetto alla quantità di micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> ritrovata nel compartimento accettore allo stesso tempo. L'influenza del PEG si osserva anche sulla penetrazione corneale in quanto la quantità di micelle fluorescenti PEG-ylate incorporata all'interno del tessuto al termine del test di permeazione risulta 3.79 volte superiore rispetto a quella delle micelle INU-EDA-RA.

I risultati ottenuti dai test di permeazione *ex vivo* condotti somministrando le micelle polimeriche risultano in totale accordo con quanto finora osservato. In tutti i casi, infatti, le micelle INU-EDA-RA-PEG comportano un profilo di permeazione dei farmaci più favorevole rispetto a quello osservato per le corrispondenti micelle INU-EDA-RA (**Fig.**

51). Inoltre, in generale l'impiego delle micelle sembra risultare vantaggioso paragonato alla somministrazione di una soluzione o sospensione di farmaco.

Anche in questo caso per quantificare l'entità dell'eventuale effetto da *permeation enhancer* sono stati calcolati i valori di  $J_s$  e  $K_p$ . Inoltre, in maniera analoga, sono stati valutati anche altri due parametri relativi all'effetto *penetration enhancer* delle micelle. Si tratta della quantità di farmaco intrappolata ( $D_e$ ) all'interno del tessuto corneale per unità di superficie al termine di ogni esperimento di permeazione e del coefficiente di accumulo ( $K_a$ ) nel tessuto corneale che, analogamente al  $K_p$ , normalizza le differenti concentrazioni di farmaco effettivamente caricate nel compartimento donatore permettendo di comparare i differenti esperimenti.

I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 4**. Come riportato, dai test *ex vivo* è possibile valutare e quantificare l'effettiva differenza di comportamento tra le micelle PEG-ylate e non, nonché apprezzare le differenze di permeazione dei 3 differenti farmaci.

Dai test *in vitro*, infatti, la PEG-ylazione del sistema sembra non apportare una miglioria, cosa che, invece, risulta evidente nei test di permeazione *ex vivo*. È probabile, infatti, che la presenza di un'ulteriore porzione idrofila, per l'appunto il PEG, possa favorire ulteriormente le interazioni con lo stroma, la regione idrofila della cornea nonché parte preponderante dell'intera barriera corneale, favorendo così il passaggio nonché l'accumulo del farmaco.

I dati ottenuti sono, quindi, in perfetto accordo tra di loro e confermano la potenzialità dei sistemi micellari proposti.



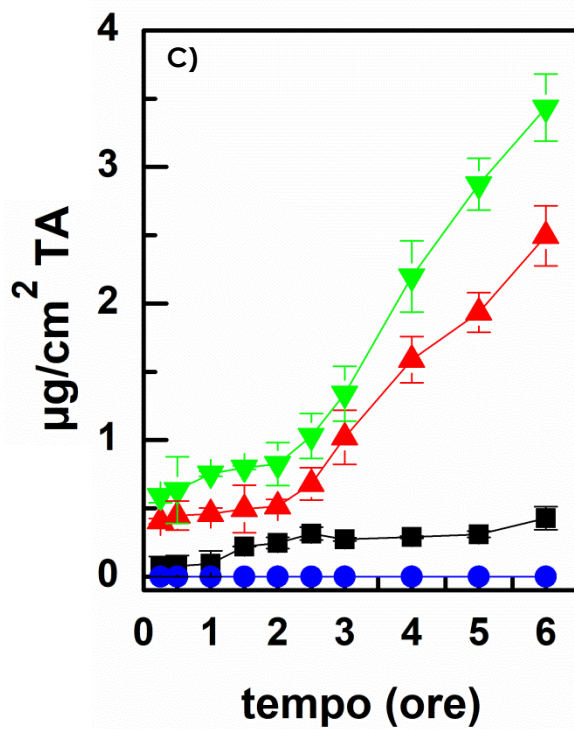
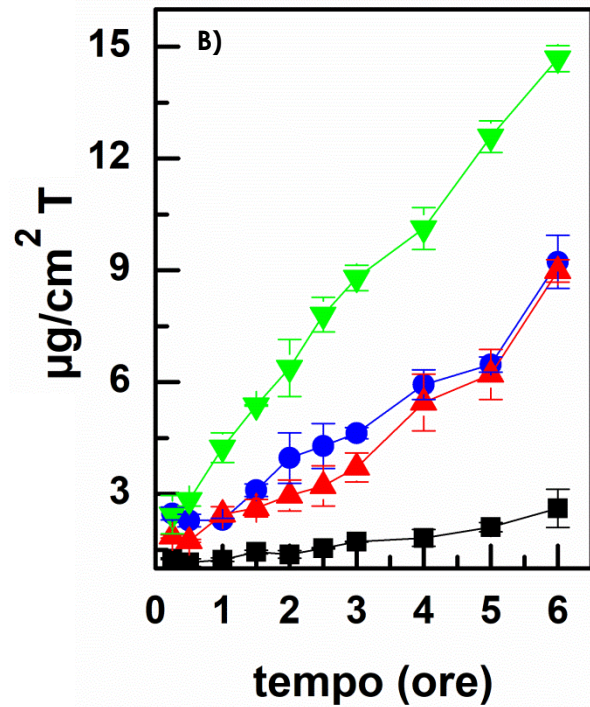
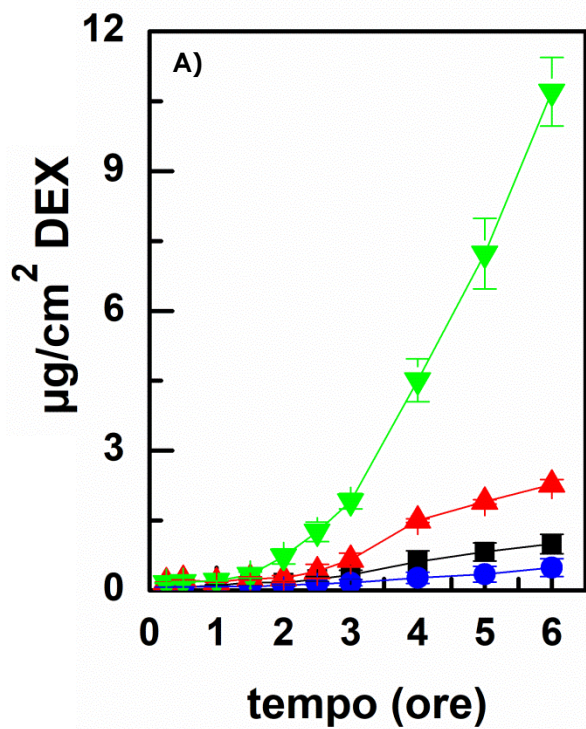


Figura 51. Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di A) DEX, B) T e C) TA permeati in funzione del tempo (fino a 6 h) dopo somministrazione di soluzioni (nero) e sospensioni (blu) di farmaco o dispersioni di micelle cariche INU-EDA-RA (rosso) e INU-EDA-RA-PEG (verde)

**Tabella 4. Valori di  $J_s$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $K_p$  (cm/h),  $D_e$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e  $K_a$  (cm)  $\pm$  SD ottenuti dai test di permeazione transcorneale *ex vivo* per DEX, T e TA somministrati come soluzione, sospensione o caricati all'interno delle micelle**

	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) ex vivo	$K_p$ (cm/h) ex vivo	$D_e$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ex vivo	$K_a$ (cm) ex vivo
DEX (soluzione)	0.218 $\pm$ 0.009	0.0044 $\pm$ 0.0004	1.736 $\pm$ 0.379	0.0347 $\pm$ 0.0012
DEX (sospensione)	0.093 $\pm$ 0.005	0.0006 $\pm$ 0.0001	2.101 $\pm$ 0.835	0.0128 $\pm$ 0.0014
INU-EDA-RA/DEX	0.535 $\pm$ 0.009	0.0016 $\pm$ 0.0001	14.622 $\pm$ 0.616	0.0441 $\pm$ 0.0013
INU-EDA-RA-PEG/DEX	2.909 $\pm$ 0.010	0.0086 $\pm$ 0.0006	20.231 $\pm$ 0.048	0.0600 $\pm$ 0.0015
T (soluzione)	0.281 $\pm$ 0.008	0.0056 $\pm$ 0.0005	35.173 $\pm$ 6.663	0.7035 $\pm$ 0.0107
T (sospensione)	1.227 $\pm$ 0.009	0.0081 $\pm$ 0.0013	27.913 $\pm$ 5.159	0.1851 $\pm$ 0.0116
INU-EDAR-RA/T	1.555 $\pm$ 0.011	0.0043 $\pm$ 0.0003	49.737 $\pm$ 4.221	0.1361 $\pm$ 0.0136
INU-EDA-RA-PEG/T	2.110 $\pm$ 0.013	0.0062 $\pm$ 0.0003	64.551 $\pm$ 3.588	0.1881 $\pm$ 0.0122
TA (soluzione)	0.033 $\pm$ 0.002	0.0013 $\pm$ 0.0001	2.285 $\pm$ 0.220	0.0457 $\pm$ 0.0014
TA (sospensione)	0	0	4.315 $\pm$ 0.352	0.0878 $\pm$ 0.0028
INU-EDA-RA/TA	0.498 $\pm$ 0.007	0.0016 $\pm$ 0.0003	4.813 $\pm$ 0.157	0.0154 $\pm$ 0.0011
INU-EDA-RA-PEG/TA	0.700 $\pm$ 0.006	0.0025 $\pm$ 0.0002	20.189 $\pm$ 1.372	0.0726 $\pm$ 0.0019

In generale, è possibile osservare che tutti i farmaci liberi sotto forma di soluzione hanno una loro intrinseca capacità di attraversamento della barriera corneale e di accumulo al suo interno. Tuttavia queste proprietà risultano molto limitate e, chiaramente, differenti al variare della lipofilia del farmaco. Infatti, Non va dimenticato che, a causa della scarsa solubilità in acqua dei tre farmaci scelti, in tutti i casi sarebbe possibile somministrare solo

piccole quantità di farmaco in soluzione che, come ogni altro normale collirio, risentirebbero dell'elevata clearance dalla superficie oculare, minimizzando ulteriormente la quota di farmaco potenzialmente assorbibile. Per ovviare tali problemi in genere i corticosteroidi vengono infatti somministrati sotto forma di sospensione farmaceutica. Questo consente la somministrazione di una dose maggiore ma comunque limitata dalla bassa quota solubile di farmaco presente e dalla sua lenta cinetica di dissoluzione (come visto anche nei test di dissoluzione e diffusione *in vitro*). Inoltre anche le sospensioni oftalmiche possono essere soggette a rapida clearance e la presenza di particelle solide può ridurre la compliance del paziente.

Le micelle sembrano essere quindi notevolmente vantaggiose in quanto sono in grado innanzitutto di aumentare in maniera importante la solubilità dei tre farmaci in mezzo acquoso rendendo quindi una più elevata quantità di farmaco disponibile per l'assorbimento. Grazie alla loro proprietà mucoadesive possono ridurre la clearance permanendo al livello del sito di somministrazione e di assorbimento per un tempo prolungato e adeguato. Come osservato inoltre, gli unimeri che compongono le micelle di per sé risultano in grado di oltrepassare la membrana corneale e di accumularvisi in buona quantità ed, come suggeriscono i risultati combinati dei test di permeazione sia *in vitro* che *ex vivo*, essi sono in grado di esplicare un'azione da *permeation/penetration enhancer*. L'effetto *enhancer*, infatti, non sembra legato solo ad un aumento della quota di farmaco solubile e disponibile per l'assorbimento. Se l'unico beneficio fosse questo, infatti, i due sistemi micellari dovrebbero apportare risultati identici in quanto, dai test di rilascio *in vitro*, è stato possibile osservare dei profili di rilascio del farmaco sovrapponibili. Inoltre, l'effetto *enhancer* delle micelle è dimostrato inequivocabilmente dai valori di  $K_p$  e  $K_a$ . In particolare l'efficacia delle micelle proposte sembra legata alla lipofilia del farmaco veicolato in maniera differente per quanto riguarda l'effetto da *penetration o permeation enhancer*.

## ***4.2 Micelle polimeriche di natura polisaccaridica Vs Micelle polimeriche di natura poliamminoacidica: variazione dell'effetto enhancer nei confronti dell'Imatinib***

Al fine di raggiungere gli obiettivi previsti, il lavoro di ricerca svolto è proseguito con la valutazione dell'efficacia di differenti sistemi micellari costituiti da polimeri anfifilici analoghi in quanto a funzionalizzazione ma totalmente differenti in quanto a backbone polimerico di partenza.

Per questo lavoro è stato, quindi, deciso di sfruttare i derivati anfifilici dell'inulina precedentemente visti (INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG) e compararli con polimeri analoghi progettati, sintetizzati e caratterizzati a partire dalla  $\alpha,\beta$ -Poly(N-2-HydroxyEthyl)-D,L-Aspartamide (PHEA).

Il PHEA è un polimero sintetico di natura poliamminoacidica preparato a partire dalla PSI, un polimero ottenuto mediante policondensazione dell'acido aspartico. Le sintesi della PSI e del PHEA sono ben note in letteratura e presso il laboratorio dove è stato portato avanti questo progetto di ricerca (*Giammona G et al. 1987*).

Il PHEA è stato scelto in quanto polimero altamente idrosolubile e biocompatibile nonché estremamente versatile dal punto di vista chimico grazie alla grande quantità di ossidrili presenti nel suo backbone.

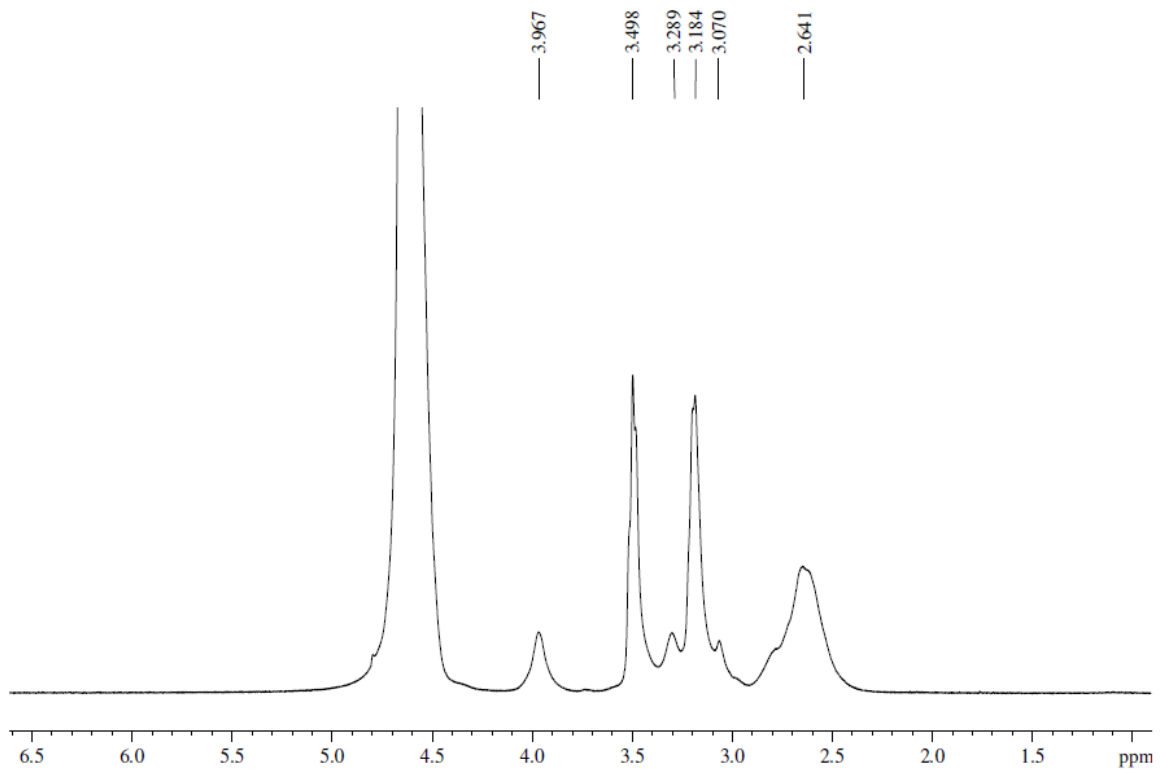
Analogamente a quanto fatto sull'inulina, il PHEA è stata sottoposto a sequenziale funzionalizzazione con etilendiammina, acido retinoico e, per la sintesi del derivato PEGylato, polietilene glicole.

In particolare, il PHEA-EDA è stato progettato e sintetizzato in modo da avere una quantità di EDA in moli % chimicamente legata molto più alta di quella presente nei derivati dell'INU, al fine teorico di ottenere un sistema finale dotato di proprietà mucoadesive più marcate. Inoltre, per quanto riguarda la funzionalizzazione in RA, sono state condotte differenti prove di sintesi in termini di rapporto molare (R) tra RA e U.R. di PHEA al fine di ottenere un derivato polimerico avente non lo stesso DD mol % in RA di quello osservato per i derivati dell'INU, ma, più che altro, valori paragonabili di CAC in quanto questo può essere indice di analoga stabilità e comportamento micellare. In particolare il valore di R scelto è stato 0.100. Ad R superiori si ottiene un DD mol % in RA troppo alto con conseguente difficoltà di solubilizzazione in mezzo acquoso. Al contrario,

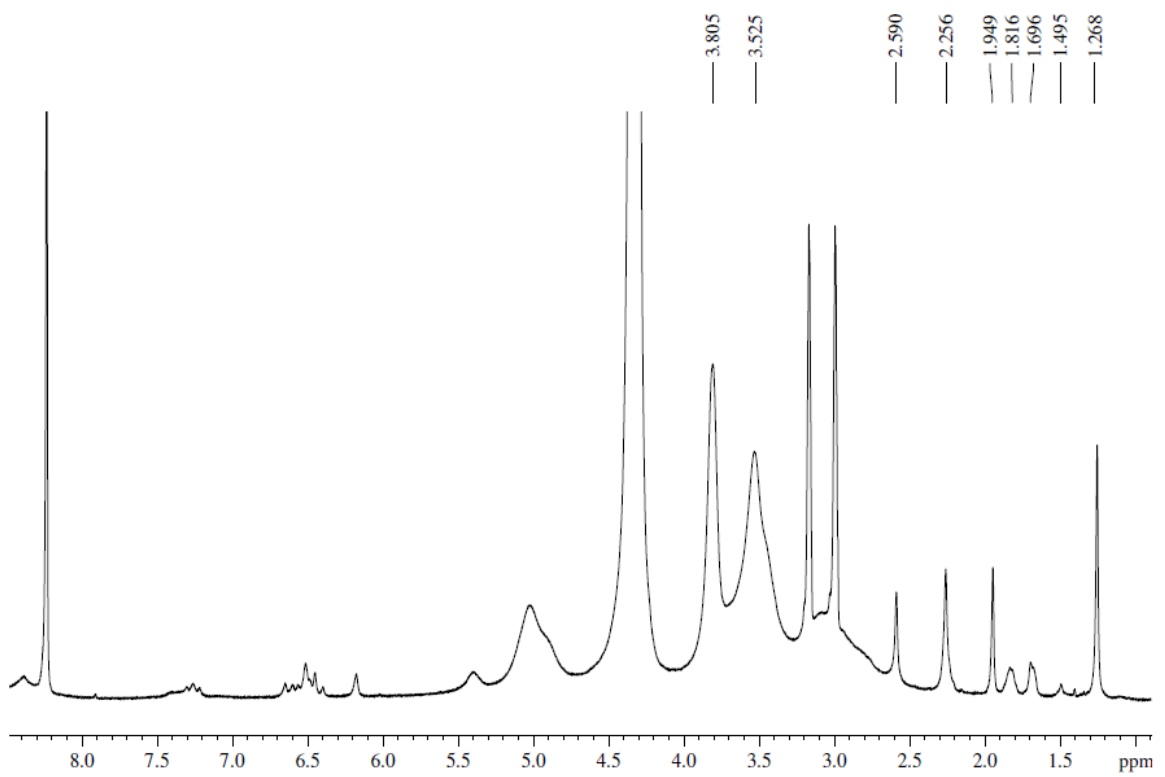
utilizzando valori di R inferiori, si arriva ad ottenere il medesimo DD mol % calcolato per i derivati di INU, tuttavia, in queste condizioni i derivati anfifilici ottenuti mostrano valori di CAC tropo elevati. Infine, per quanto riguarda il PEG, introdotto sempre al fine di migliorare la stabilità, la mucoadesione e la permeazione/penetrazione del sistema finale, è stato pensato di mantenere il medesimo grado di funzionalizzazione.

I polimeri ottenuti sono stati, innanzitutto caratterizzati mediante analisi spettroscopica. Le analisi spettrofotometriche ed infrarosse non hanno fornito risultati diagnostici, pertanto i dati ottenuti non sono riportati. Analogamente a quanto osservato per i derivati dell'INU, all'analisi UV-VIS è chiaramente visibile il picco dell'RA per i derivati PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG, mentre esso è assente nel derivato PHEA-EDA, così come nel PHEA di partenza. Per quanto riguarda l'ATRFT-IR, in questo caso, non è possibile osservare il picco relativo al carbonile dell'RA in quanto esso cade nella medesima regione dei picchi relativi ai carbonili del backbone di PHEA che, pertanto, lo coprono. L'unica informazione utile, in questo caso, resta, quindi, la variazione della zona dell'impronta digitale al variare del campione analizzato.

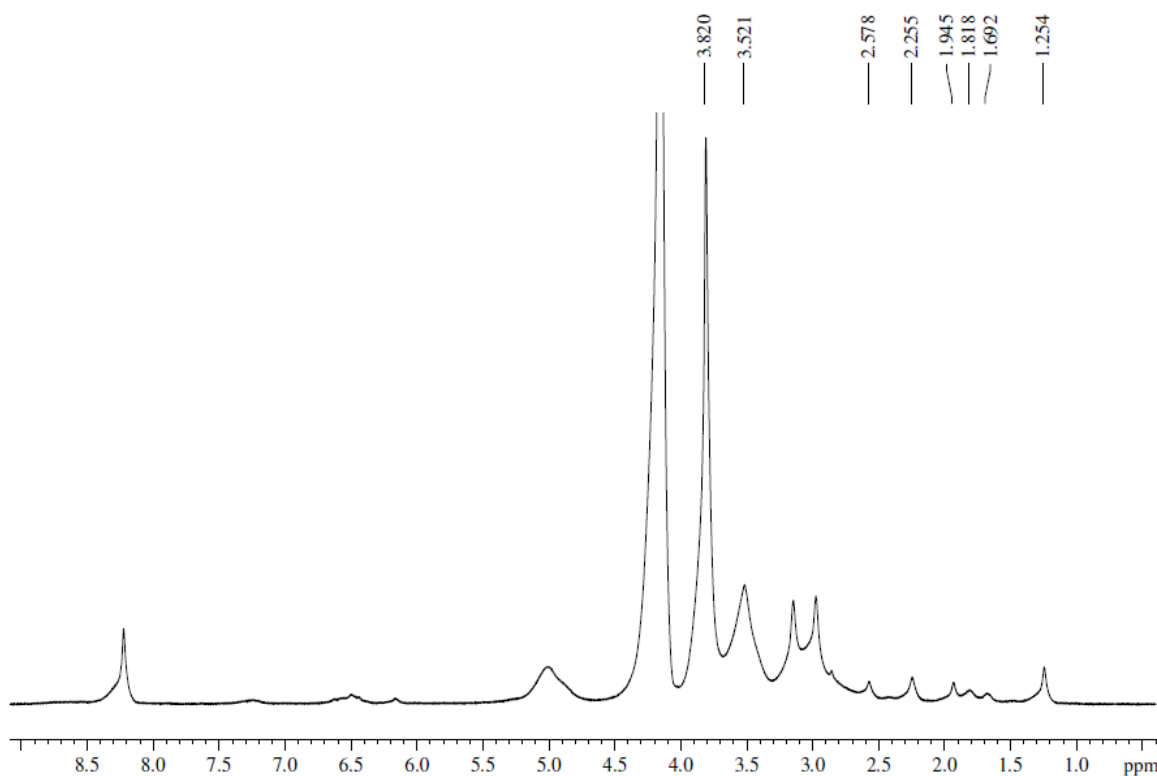
Anche in questo caso, l'ottenimento dei prodotti di sintesi desiderati è inequivocabilmente mostrato dalle analisi  $^1\text{H-NMR}$  (**Fig. 52, 53 e 54**), impiegate per il calcolo dei DD mol % in EDA, RA e PEG, riportati in **Tabella 5**, utile per il confronto dei valori di DD mol % ottenuti per i 4 derivati polimerici oggetto del presente lavoro (INU-EDA-RA, INU-EDA-RA-PEG, PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG).



**Figura 52. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di PHEA-EDA**



**Figura 53. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di PHEA-EDA-RA**



**Figura 54. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di PHEA-EDA-RA-PEG**

**Tabella 5. DD mol % in EDA, RA e PEG per i derivati INU-EDA-RA, INU-EDA-RA-PEG ed i loro analoghi PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG**

	DD mol % EDA	DD mol % RA	DD mol % PEG
INU-EDA-RA	11.30 ± 1.50 %	4.30 ± 0.30 %	-
INU-EDA-RA-PEG	11.30 ± 1.50 %	4.30 ± 0.30 %	1.50 ± 0.25 %
PHEA-EDA-RA	46.00 ± 1.25 %	7.81 ± 0.52 %	-
PHEA-EDA-RA-PEG	46.00 ± 1.25 %	7.81 ± 0.52 %	1.90 ± 0.10 %

Come già discusso, sebbene differenti tra di loro in termini di DD mol %, i 4 derivati polimerici sono stati opportunamente progettati al fine di ottenere valori di CAC paragonabili in acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 ed HEPES pH 7.4. Questi sono illustrati in **Tabella 6** e sono stati calcolati come precedentemente descritto utilizzando il pirene come sonda fluorescente. Come è possibile osservare, in termini di CAC i valori ottenuti risultano paragonabili, come definito in fase di progettazione e, pertanto, le micelle dovrebbero mostrare un comportamento analogo.

**Tabella 6. Valori di Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC) in mg/ml calcolati per INU-EDA-RA, INU-EDA-RA-PEG, PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG in acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 ed HEPES pH 7.4**

	CAC acqua	CAC DPBS	CAC HEPES
INU-EDA-RA	0.135 ± 0.003	0.136 ± 0.002	0.135 ± 0.003
INU-EDA-RA-PEG	0.290 ± 0.004	0.073 ± 0.001	0.185 ± 0.002
PHEA-EDA-RA	0.123 ± 0.002	0.118 ± 0.001	0.125 ± 0.001
PHEA-EDA-RA-PEG	0.270 ± 0.003	0.180 ± 0.002	0.210 ± 0.004

Terminata la caratterizzazione polimerica sono state quindi preparate micelle polimeriche vuote, micelle polimeriche marcate con una sonda fluorescente e micelle polimeriche cariche di farmaco. Il farmaco da incorporare nelle micelle polimeriche è stato, in questo caso, l'Imatinib (IMA), un farmaco altamente idrofobico ( $\log P = 3.78$ ) ad azione anti-VEGF indiretta.

Per la preparazione di micelle polimeriche ottimali in termini non solo di incorporazione del farmaco, ma anche di particle size e PDI delle micelle prodotte, è stato necessario ricorrere al metodo di mortaio e pestello utilizzando come solvente atto alla solubilizzazione di farmaco e polimero una miscela di acetone e THF.

La tecnica di mortaio e pestello, altro non è che una variante del metodo del casting. Farmaco e polimero sono, infatti solubilizzati nell'opportuno solvente o miscela di solventi e la soluzione limpida è posta in un mortaio dove è trattata fino a completa evaporazione del solvente e creazione di un film continuo ed omogeneo di farmaco e polimero in intimo contatto. Il film viene quindi idratato con acqua bidistillata e trasferito in un vial dove è lasciato sotto vigorosa agitazione. Per massimizzare la quantità di farmaco incorporata nel sistema il tempo di incubazione dopo idratazione è stato stabilito pari a 24 h. Questo consente di ottenere una migliore resa senza però, in questo caso, intaccare altre proprietà essenziali, come la ridispersibilità e la stabilità del sistema finale.

Al contrario impiegando la tecnica del casting con DMF come descritto precedentemente, il sistema micellare finale non risultava idoneo per i successivi studi.

La caratterizzazione tecnologica dei sistemi micellari prodotti è, quindi iniziata con la valutazione della DL % nonché le analisi di DLS e potenziale zeta. I valori ottenuti per le micelle INU-EDA-RA, INU-EDA-RA-PEG, INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e INU-EDA-



RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> non sono stati nuovamente riportati in quanto analoghi a quelli ottenuti per le micelle precedentemente preparate con il metodo del casting.

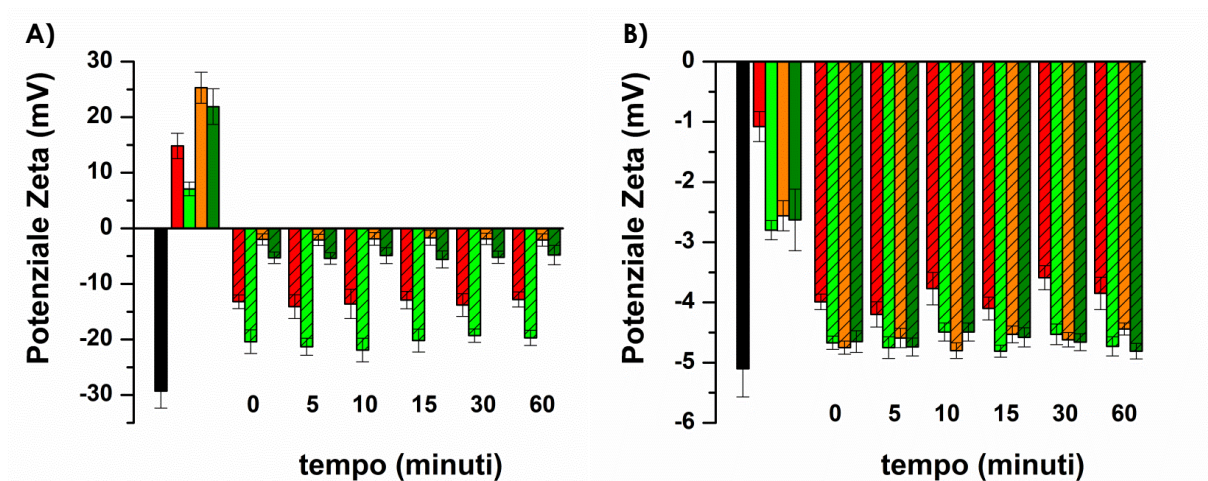
Com'è possibile valutare confrontando i dati riportati in **Tabella 7**, sebbene le micelle cariche incorporino ottime quantità di farmaco, non si osservano significative variazioni in termini di particle size rispetto alle micelle vuote, così come anche le variazioni di potenziale zeta risultano poco marcate. In tutti i casi, inoltre, i valori osservati in termini di size, rimangono pressochè invariati al variare della fase disperdente. Tutti i risultati ottenuti sono perfettamente compatibili con la via di somministrazione oculare topica.

**Tabella 7 . Particle Size (nm), PDI, Potenziale Zeta e Drug Loading % (p/p) di tutte le micelle preparate**

	DL % (p/p)	Particle Size (nm)	PDI	Z-Potential (mV)	Fase Disperdente
INU-EDA-RA/IMA	9.48 ± 0.18 %	219.94 ± 13.81	0.235	13.9 ± 0.18	Acqua
		214.32 ± 18.94	0.188	-2.25 ± 0.49	DPBS
		214.27 ± 13.89	0.227	-1.68 ± 0.21	HEPES
INU-EDA-RA-PEG/IMA	19.69 ± 1.02 %	269.22 ± 13.73	0.125	12.14 ± 0.43	Acqua
		253.18 ± 12.27	0.134	-1.14 ± 0.24	DPBS
		271.33 ± 11.89	0.127	-1.57 ± 0.34	HEPES
PHEA-EDA-RA	-	217.70 ± 15.42	0.225	25.30 ± 2.79	Acqua
		222.25 ± 16.15	0.206	-2.56 ± 0.25	DPBS
		211.15 ± 12.05	0.299	-2.25 ± 0.21	HEPES
PHEA-EDA-RA-Alexa Fluor <sub>488</sub>	-	214.12 ± 12.05	0.207	23.56 ± 1.98	Acqua
		213.06 ± 14.52	0.292	-2.06 ± 0.47	DPBS
		215.11 ± 13.64	0.240	-1.99 ± 0.31	HEPES
PHEA-EDA-RA/IMA	7.18 ± 0.67 %	216.50 ± 15.49	0.203	26.51 ± 2.63	Acqua
		216.23 ± 17.03	0.240	-2.24 ± 0.35	DPBS
		212.28 ± 12.52	0.208	-2.43 ± 0.26	HEPES
PHEA-EDA-RA-PEG	-	231.45 ± 13.45	0.206	21.90 ± 3.21	Acqua
		234.35 ± 11.17	0.266	-2.63 ± 0.51	DPBS
		227.15 ± 10.95	0.299	-1.56 ± 0.39	HEPES
PHEA-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor <sub>488</sub>	-	219.85 ± 15.67	0.239	19.91 ± 0.65	Acqua
		217.67 ± 17.98	0.211	-2.25 ± 0.26	DPBS
		218.36 ± 16.20	0.217	-2.34 ± 0.31	HEPES
PHEA-EDA-RA-PEG/IMA	3.07 ± 0.23 %	224.22 ± 13.54	0.201	26.43 ± 1.06	Acqua
		229.8 ± 10.55	0.263	-2.26 ± 0.14	DPBS
		215.05 ± 18.15	0.291	-2.82 ± 0.32	HEPES

A questo punto, le micelle vuote sono state sottoposte a studi di mucoadesione utilizzando i metodi sia del potenziale zeta che della turbidimetria, come precedentemente visto.

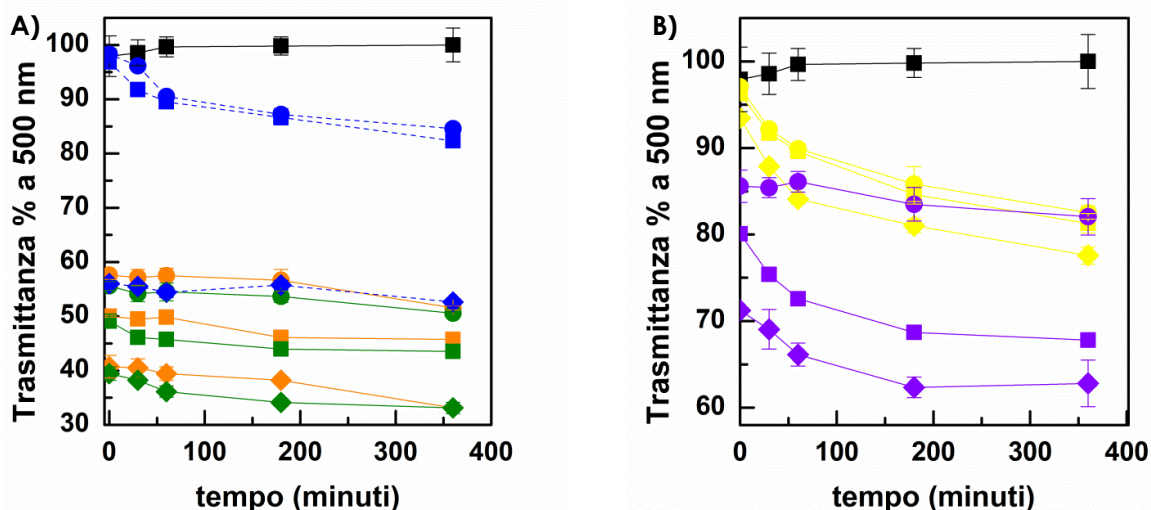
Per quanto riguarda la valutazione del potenziale zeta, come è possibile osservare dal grafico in **Fig. 55**, sembra che tutti i sistemi micellari siano in grado di instaurare una forte e duratura interazione con la mucina. Tuttavia questo metodo da solo non consente di discriminare quale sistema sia più mucoadesivo e quale sia l'andamento del fenomeno di mucoadesione nel tempo.



**Figura 55. Test di mucoadesione condotti con metodo del Potenziale Zeta: valori di Potenziale Zeta calcolati in A) acqua bidistillata e B) DPBS pH 7.4 per mucina (nero), micelle INU-EDA-RA (rosso), micelle INU-EDA-RA-PEG (verde), micelle PHEA-EDA-RA (arancione), micelle PHEA-EDA-RA-PEG (verde scuro) e miscele INU-EDA-RA+Mucina (rosso a linee nere), INU-EDA-RA-PEG+Mucina (verde a linee nere), PHEA-EDA-RA+Mucina (arancione a linee nere) e PHEA-EDA-RA-PEG+Mucina (verde scuro a linee nere) a differenti tempi di incubazione**

Nuovamente, per confermare i dati finora ottenuti e valutare in maniera più approfondita le differenze tra i differenti sistemi micellari, sono stati condotti studi di turbidimetria a 500 nm.

Inoltre, per avere un quadro più chiaro della situazione nel suo complesso, in analogia a quanto precedentemente fatto, la medesima analisi è stata condotta non solo sulle micelle PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG ma anche sul PHEA e sul PHEA-EDA di partenza. Ancora una volta, i dati relativi alle micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG, come pure all'INU ed all'INU-EDA non sono stati riportati in quanto già illustrati al paragrafo 4.1.



**Figura 56.** Trasmittanza % a 500 nm di Mucina (nero), A) micelle PHEA-EDA-RA (arancione), micelle PHEA-EDA-RA-PEG (verde scuro), acido poliacrilico (blu), B) PHEA (giallo) e PHEA-EDA (viola) alle concentrazioni di 0.5 mg/ml (cerchio), 1 mg/ml (quadrato) e 5 mg/ml (rombo)

Il grafico in **Fig. 56 – pannello A**, mostra a confronto le micelle PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG nonché il controllo positivo di PAA. Com'è possibile osservare, entrambi i sistemi micellari mostrano spiccate proprietà mucoadesive concentrazione-dipendenti ma tempo-indipendenti. Tuttavia, in questo caso, non si osservano significative variazioni nel comportamento dei due differenti sistemi micellari. Infatti la trasmittanza % osservata a 500 nm a 6 h di esperimento risulta essere per PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG pari rispettivamente a 51.57 e 50.57 % alla concentrazione di 0.5 mg/ml, 45.73 e 43.51 % alla concentrazione di 1 mg/ml e, infine, 33.12 % per entrambe le micelle alla concentrazione di 5 mg/ml (la barra di errore, tra l'altro, è talmente piccola da essere trascurabile per cui i risultati ottenuti sono effettivamente identici). È importante sottolineare che le micelle a base di PHEA risultano in tutti i casi marcatamente più mucoadesive delle analoghe micelle a base di INU. Infatti, la trasmittanza % a 500 nm a 6 h di esperimento e alla concentrazione di 5 mg/ml arriva solo al 58.51 e 53.82 % per le micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG rispettivamente. In entrambi i casi quindi, le micelle a base di PHEA si dimostrano più mucoadesive della concentrazione più alta testata (5 mg/ml) di micelle a base di INU, già alla loro concentrazione più bassa (0.5 mg/ml), sebbene essa sia 10 volte inferiore. Questo è probabilmente dovuto alla notevole differenza in termini di DD mol % in EDA da cui conseguono i valori di potenziale zeta in

acqua più positivi per le micelle a base di PHEA e la maggiore disponibilità di gruppi amminici protonabili in grado di instaurare forti legami con i residui di acido sialico della mucina.

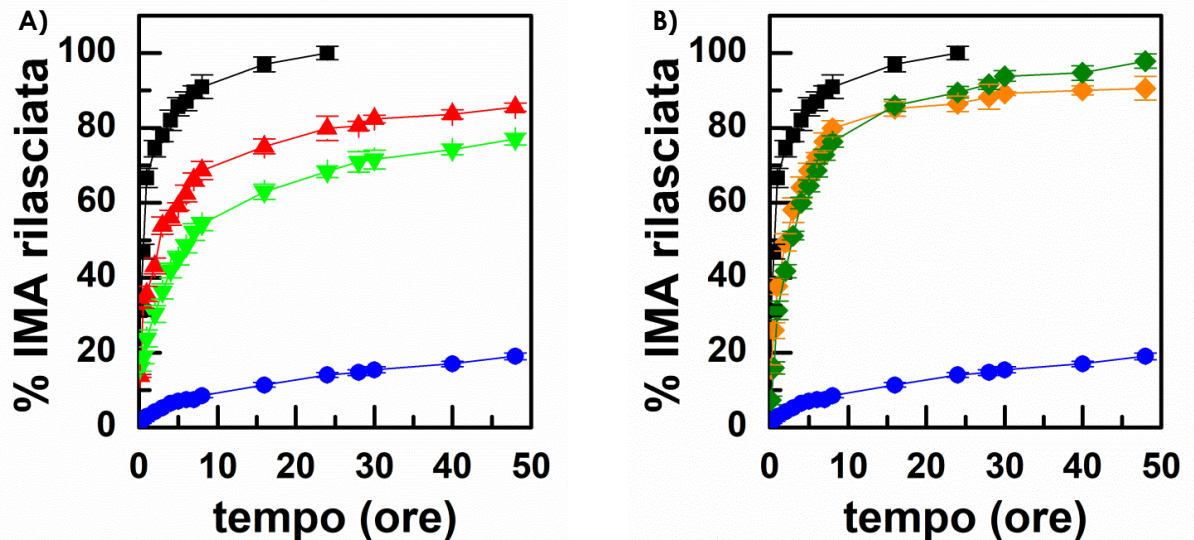
Per comprendere meglio il motivo di questa enorme differenza, sono stati analizzati analogamente anche il PHEA ed il PHEA-EDA. Com'è possibile osservare dal grafico in **Fig. 56 – pannello B**, l'inserimento dell'EDA nel backbone del PHEA comporta un notevole aumento del carattere mucoadesivo a tutte le concentrazioni studiate. È importante, però, considerare che nel caso dell'INU e dell'INU-EDA il delta tra la trasmittanza % a 500 nm in assenza o in presenza dell'EDA in catena laterale risulta molto meno marcata di quella osservata paragonando PHEA e PHEA-EDA. Questo è certamente legato alla notevole differenza in termini di DD mol % in EDA riscontrata tra l'INU-EDA ed il PHEA-EDA. Ed infatti, è proprio al fine di aumentare le caratteristiche mucoadesive del sistema finale che è stato progettato e sintetizzato un derivato del PHEA con un più alto grado di derivatizzazione in etilendiammina.

In definitiva, quindi, tutti e 4 i sistemi sono marcatamente mucoadesivi in modo concentrazione-dipendente e praticamente tempo-indipendente in quanto le interazioni micella-mucina si instaurano rapidamente e permangono nel tempo. Tuttavia, come desiderato in fase di progettazione, le micelle a base di PHEA risultano più mucoadesive.

Successivamente, è stata valutata la cinetica di rilascio dell'IMA dai 4 sistemi micellari carichi e confrontata con la cinetica di diffusione del farmaco libero da una soluzione alla sua massima solubilità (pari a 25 µg/ml, raggiunta previa preparazione di una soluzione madre altamente concentrata in metanolo e successiva diluizione in DPBS pH 7.4) e con la cinetica di dissoluzione-diffusione del farmaco sotto forma di sospensione, alla luce della sua elevata lipofilia. Per lo studio di sospensioni o dispersioni micellari di farmaco è stata caricata all'interno della membrana da dialisi la medesima quantità di IMA pari a 500 µg/ml.

I grafici in **Fig. 57** mostrano una lieve ma costante differenza nel profilo di rilascio dell'IMA dalle micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG, mentre le micelle PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG iniziano a discostarsi tra di loro solo dopo 24 h di esperimento, rimanendo, tuttavia, sempre paragonabili. Al termine dell'esperimento, comunque, il gap tra i due sistemi a base di INU e tra i due a base di PHEA è più o meno lo stesso sebbene il trend sia invertito. Dopo 48 h di esperimento, le micelle INU-EDA-RA hanno un rilascio maggiore delle micelle INU-EDA-RA-PEG e pari rispettivamente

all'85.51 ed al 76.98 % di farmaco (nel caso specifico pari a 342.04 e 307.92  $\mu\text{g}$ ). Per le micelle a base di PHEA osserviamo, invece, la situazione opposta. Infatti le micelle non PEG-ylate rilasciano, nell'arco delle 48 h, il 90.55 % del farmaco (362.20  $\mu\text{g}$ ) a fronte del 97.86 % di IMA (391.44  $\mu\text{g}$ ) rilasciato nello stesso tempo dalle micelle PEG-ylate.



**Figura 57. Profilo di rilascio percentuale dell'IMA dalle micelle A) INU-EDA-RA (rosso) e INU-EDA-RA-PEG (verde) e B) PHEA-EDA-RA (arancione) e PHEA-EDA-RA-PEG (verde scuro), confrontati con il profilo di diffusione del farmaco dalla soluzione (nero) e di dissoluzione e diffusione del farmaco dalla sospensione (blu)**

In tutti e 4 i casi comunque le considerazioni più importanti da fare sono le seguenti:

- ☉ Il confronto con la soluzione di IMA, che ad un primo sguardo può sembrare sfavorevole, in realtà porta risultati molto incoraggianti. Infatti, è vero che tutto l'IMA in soluzione fuoriesce facilmente dalla membrana da dialisi nell'arco di 24 h ed è quindi disponibile per l'assorbimento. Tuttavia non dobbiamo dimenticare che questo 100% di rilascio corrisponde solo a 20  $\mu\text{g}$  di farmaco nel caso specifico e che, inoltre, l'ottenimento di una soluzione a questa, già bassa, concentrazione richiede la presenza di un solvente organico quale il metanolo. Il dato, quindi, è "falsato" in quanto comunque non esiste la possibilità di somministrare una soluzione di IMA come collirio a questa concentrazione. Questo dato serve quindi più che altro per dimostrare che il farmaco non interagisce con la membrana da dialisi e che la sua diffusione non viene da essa in alcun modo ostacolata. Pertanto gli unici fattori in grado di rallentarne la

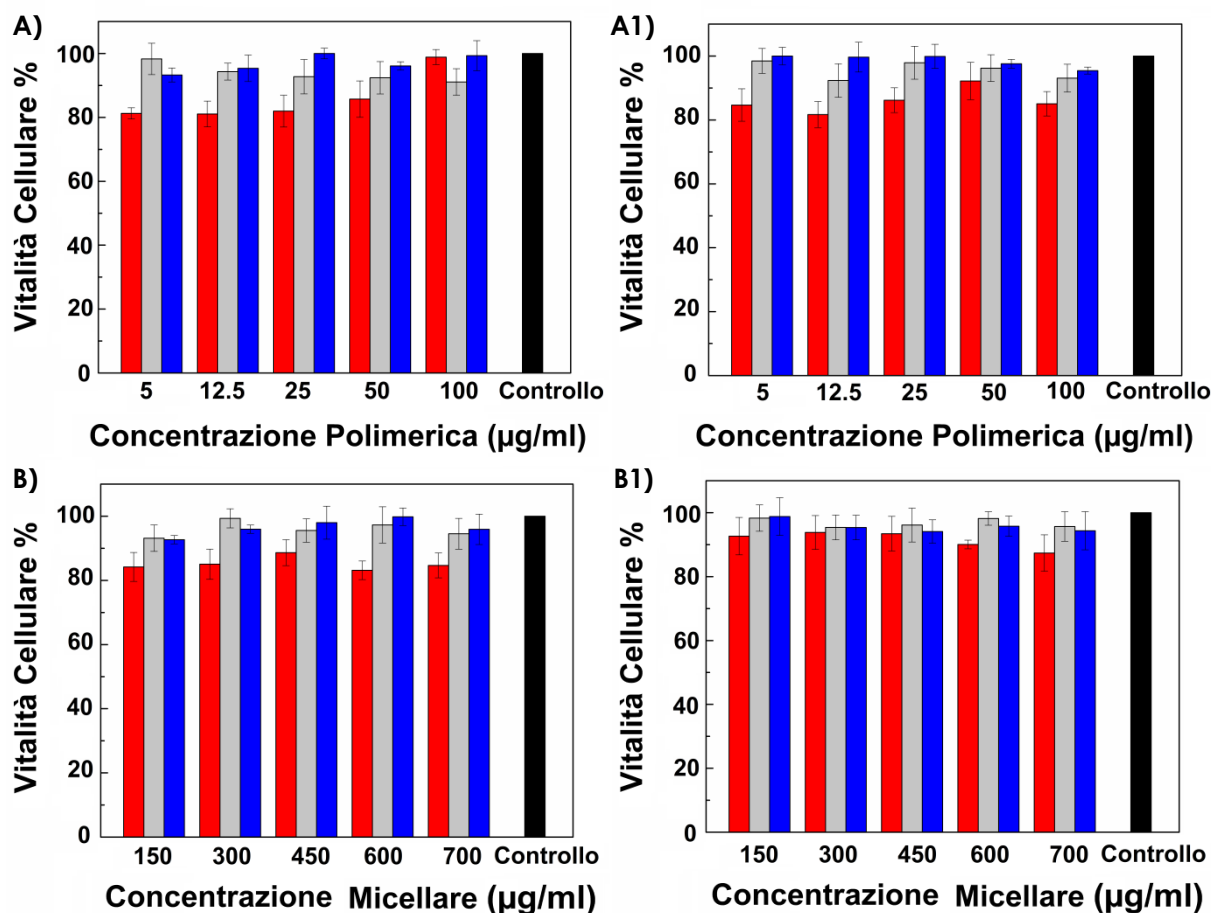
fuoriscita sono la sua cinetica di dissoluzione (per la sospensione) e la forza di interazione che esso instaura con il core micellare (per i sistemi carichi).

- ☉ Il confronto più significativo è, però, quello osservabile in relazione al comportamento della sospensione di IMA. Qui la quantità totale di farmaco caricata all'interno della dialisi è la stessa e, tuttavia, in 48 h solo il 19.01% del farmaco caricato è in grado di solubilizzarsi e fuoriuscire dalla membrana da dialisi. Questo comporta che, la somministrazione di una sospensione farmaceutica oftalmica di IMA apporterebbe basse quantità di farmaco in soluzione e quindi disponibile per l'assorbimento e l'azione farmacologica.

L'effettiva somministrabilità di questi nuovi sistemi micellari, finora così promettenti, è stata quindi valutata mediante saggio di citocompatibilità su HCEpiC. I risultati ottenuti sono mostrati in **Fig. 58** e confermano la citocompatibilità dei polimeri e delle micelle PHEA-EDA-RA e PHEA-EDA-RA-PEG. I dati per i polimeri INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG non sono, invece, nuovamente riportati in quanto precedentemente visti.

Tutti e 4 i sistemi prodotti sono, dunque, somministrabili pe via oculare topica in quanto compatibili con le HCEpiC.

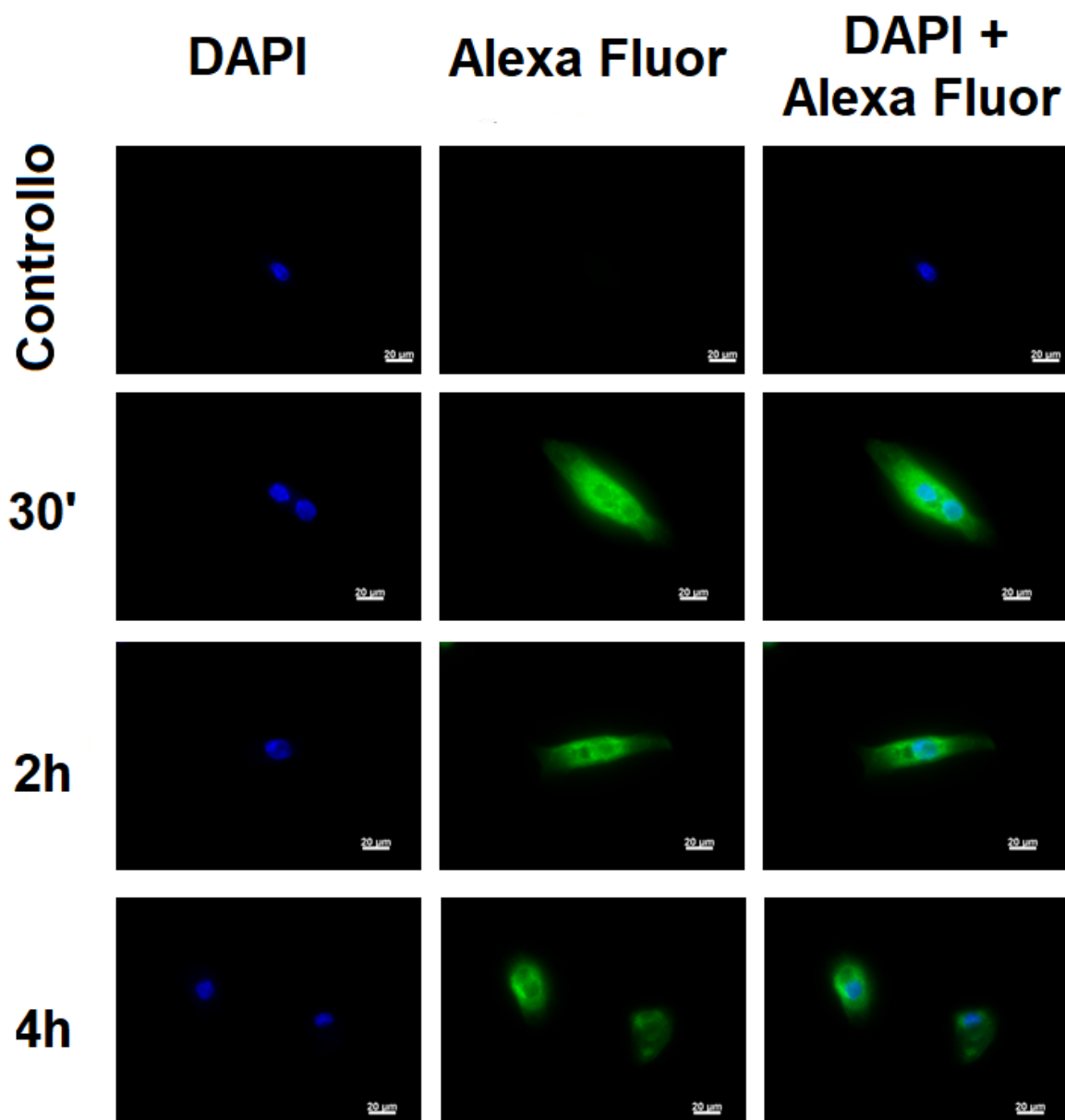




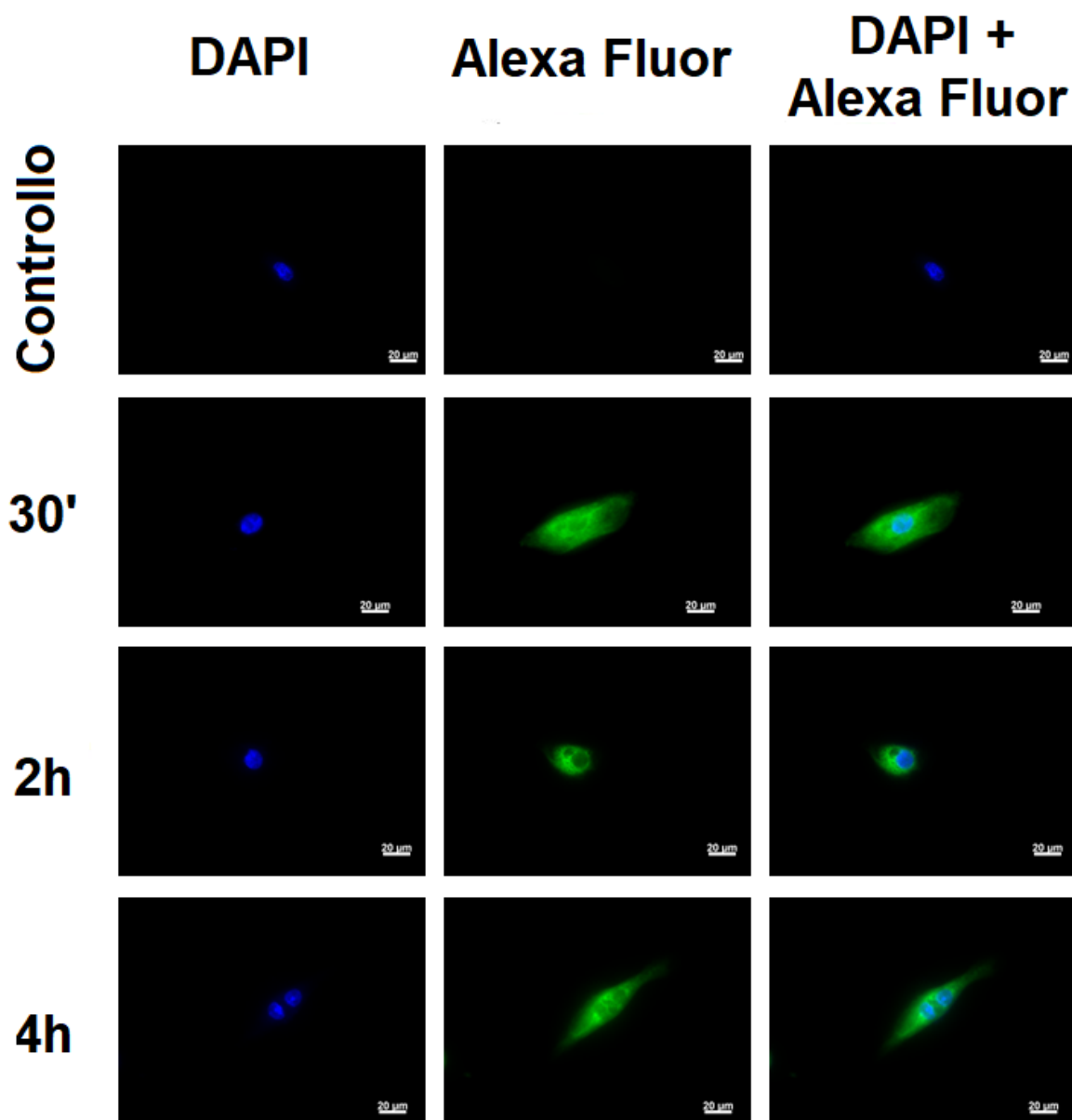
**Figura 58.** Vitalità Cellulare %, riferita a cellule controllo non trattate (nero) dopo il trattamento di cellule dell'epitelio corneale umano (HCEpiC) con A) concentrazioni crescenti di polimero PHEA-EDA-RA e B) PHEA-ERA-RA-PEG o A1) micelle PHEA-EDA-RA e B1) PHEA-EDA-RA-PEG per 1 h (rosso con linee nere), 4 h (grigio con linee nere) e 24 h (blu con linee nere)

A questo punto è stata, quindi valutata la capacità dei nuovi sistemi micellari a base di PHEA di interagire opportunamente con le cellule corneali umani ed essere, dalle stesse, internalizzati. Per fare questo sono stati condotti studi di uptake qualitativo *in vitro*. Le immagini ottenute mediante microscopia a fluorescenza sono riportate in **Fig. 59** (micelle PHEA-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub>) e **Fig. 60** (micelle PHEA-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub>) mostrano come anche le micelle a base di PHEA siano perfettamente in grado di essere internalizzate dalle HCEpiC velocemente e stabilmente.





**Figura 59. Studi di uptake qualitativo *in vitro* di micelle PHEA-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> su HCEpiC. Le immagini sono acquisite mediante microscopia a fluorescenza (40 X)**

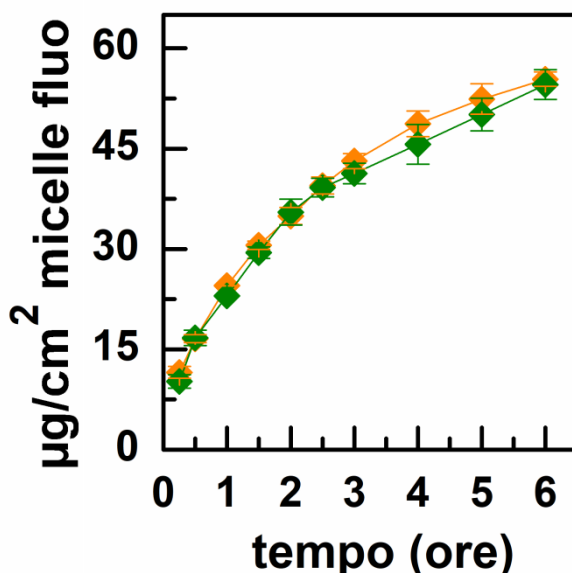


**Figura 60. Studi di uptake qualitativo *in vitro* di micelle PHEA-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> su HCEpiC. Le immagini sono acquisite mediante microscopia a fluorescenza (40 X)**

Infine, è stata attentamente valutata la capacità dei sistemi proposti di agire da *penetration/permeation enhancer* per l'IMA sia *in vitro* che *ex vivo*, in modo da confrontare effettivamente la reale e differente efficacia di sistemi micellari costituiti da polimeri di base differenti.

Per gli studi *in vitro* sono stati utilizzati sistemi transwell e HCEpiC, ed i risultati sono riportati in termini di  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti o farmaco permeati nell'unità di tempo.

In **Fig. 61** è illustrato il profilo di permeazione delle micelle PHEA-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e PHEA-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> mentre in **Fig. 62** è riportato il profilo di permeazione dell'IMA dalle micelle INU-EDA-RA/IMA e INU-EDA-RA-PEG/IMA (**pannello A**) o PHEA-EDA-RA/IMA e PHEA-EDA-RA-PEG/IMA (**pannello B**) paragonato ai profili di permeazione del farmaco libero in soluzione. Va sempre ricordato che, nel caso della soluzione è stato prima necessario solubilizzare il farmaco in metanolo prima di diluirlo in mezzo di coltura cellulare al fine di evitarne la precipitazione. Il dato di permeazione dell'IMA in soluzione è quindi falsato in quanto, come precedentemente discusso, il metanolo stesso può fungere da *enhancer*.

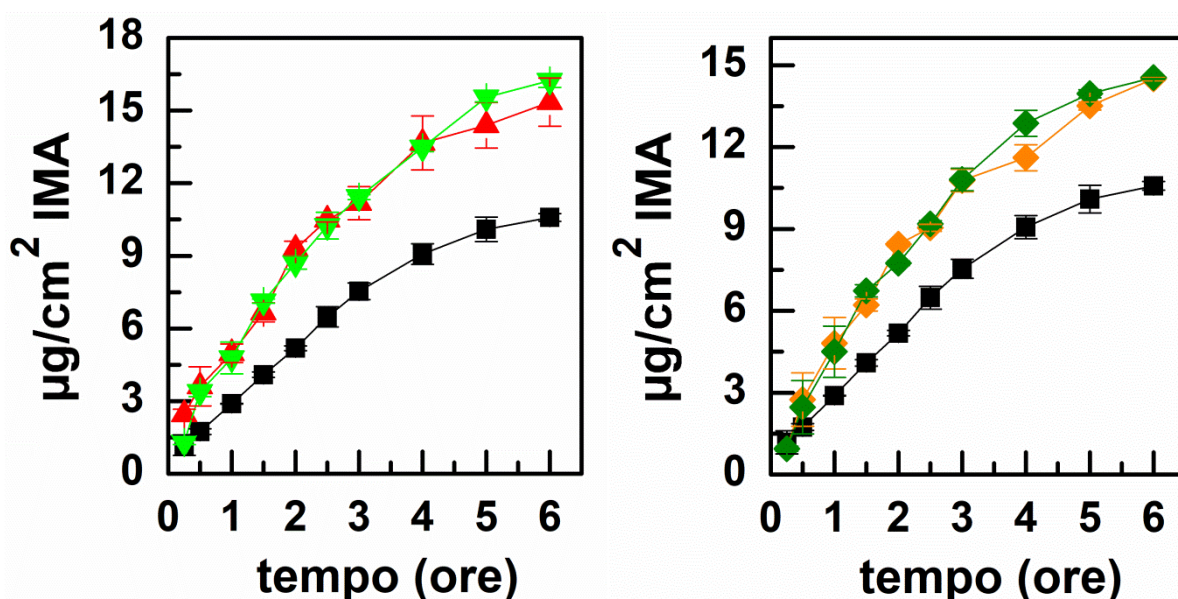


**Figura 61.** Studi di permeazione transcorneale *in vitro* con HCEpiC:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti PHEA-EDA-RA (arancione) e PHEA-EDA-RA-PEG (verde scuro) permeati in funzione del tempo fino a 6 h

Com'è possibile osservare dal grafico in **Fig. 61** entrambe le micelle fluorescenti a base di PHEA sono in grado di attraversare il monolayer di HCEpiC con un andamento tra di loro paragonabile. I dati relativi alla permeazione transcorneale *in vitro* delle analoghe micelle a base di INU non sono stati nuovamente riportati in quanto precedentemente illustrati. Si ricorda comunque che, nel caso delle micelle a base di INU l'entità della permeazione era maggiore ( $77.10$  e  $76.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub>

e INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> permeati rispettivamente in 6 h) sebbene, anche in quel caso, nel complesso non ci fossero grosse differenze tra i sistemi PEG-ylato e non.

Per quanto riguarda la permeazione dell'IMA, i grafici riportati in **Fig. 62** mostrano come, anche in questo caso, l'entità della permeazione aumenta ma il metodo *in vitro* non consente di discriminare un differente comportamento tra le micelle con o senza il PEG legato covalentemente. Sembrano, comunque, confermati i dati ottenuti con lo studio di permeazione delle micelle fluorescenti dai quali emerge una maggiore permeazione delle micelle a base di INU rispetto a quelle a base di PHEA.



**Figura 62.** Studi di permeazione transcorneale *in vitro* con HCEpiC:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di IMA permeato in funzione del tempo (fino a 6 h) dopo la somministrazione di A) micelle INU-EDA-RA (rosso) e INU-EDA-RA-PEG (verde) o B) micelle PHEA-EDA-RA (arancione) e PHEA-EDA-RA-PEG (verde scuro) confrontate con il profilo di permeazione del farmaco libero in soluzione (nero)

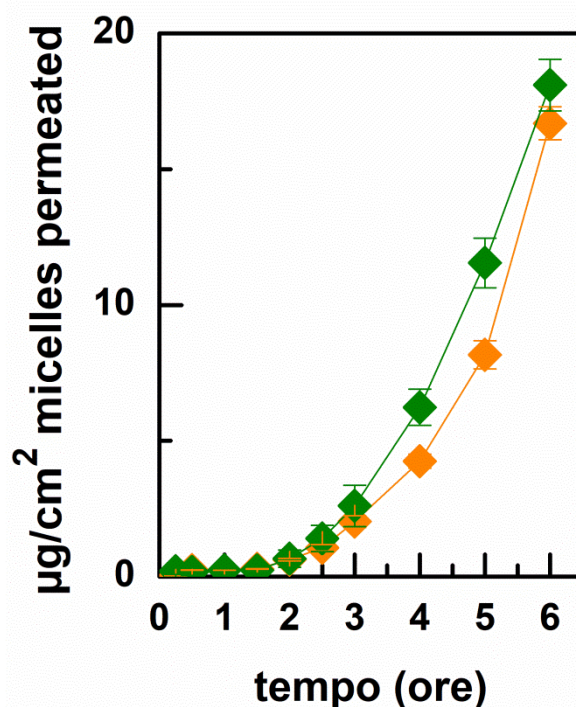
I dati ottenuti, inoltre, mostrano un comportamento analogo tra i sistemi a base di INU e quelli a base di PHEA. Tale risultato è confermato mediante valutazione matematica dei valori di  $J_s$  e  $K_p$ , riportati in **Tabella 8**. La somministrazione di tutte le micelle cariche di IMA comporta un aumento sia del suo flusso attraverso il monolayer corneale che del suo coefficiente di permeabilità. Le reali differenze tra i 4 sistemi micellari risultano, però, poco evidenti.

**Tabella 8. Valori di Js ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) e Kp (cm/h)  $\pm$  SD ottenuti dai test di permeazione transcorneale *in vitro* per l'IMA somministrato come soluzione o caricato all'interno delle micelle a base di INU e PHEA**

	Js ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) <i>in vitro</i>	Kp (cm/h) <i>in vitro</i>
Imatinib (soluzione)	2.3302 $\pm$ 0.2536	0.0932 $\pm$ 0.0021
INU-EDA-RA/IMA	3.3298 $\pm$ 0.2042	0.1236 $\pm$ 0.0019
INU-EDA-RA-PEG/IMA	3.5971 $\pm$ 0.3109	0.1982 $\pm$ 0.0023
PHEA-EDA-RA/IMA	3.4217 $\pm$ 0.2840	0.1179 $\pm$ 0.0020
PHEA-EDA-RA-PEG/IMA	3.4675 $\pm$ 0.2711	0.1353 $\pm$ 0.0018

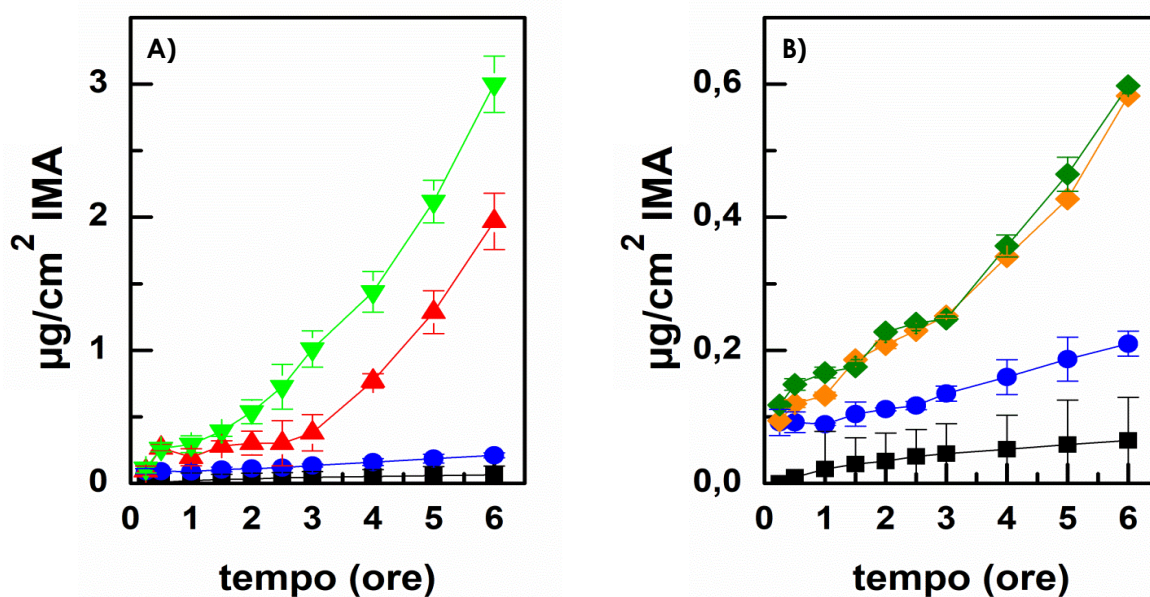
Allo scopo di valutare le eventuali effettive differenze tra i sistemi micellari proposti e valutare se una tipologia di micelle risulti più promettente rispetto all'altra, sono stati condotti studi più completi mediante valutazione della permeazione transcorneale *ex vivo* in quanto, come enfatizzato precedentemente, sebbene il modello *in vitro* dia un'idea generale della permeazione, talvolta le effettive differenze tra sistemi diversi sono riscontrabili solo applicando un modello che mimica in maniera più completa la reale situazione *in vivo*. È per questo che, come membrana per la permeazione sono state utilizzate cornee bovine. I risultati sono riportati come  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti o di farmaco permeati nell'unità di tempo.

In **Fig. 63** è illustrato il profilo di permeazione delle micelle PHEA-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e PHEA-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> mentre in **Fig. 64** è riportato il profilo di permeazione dell'IMA dalle micelle INU-EDA-RA/IMA e INU-EDA-RA-PEG/IMA (**pannello A**) o PHEA-EDA-RA/IMA e PHEA-EDA-RA-PEG/IMA (**pannello B**) paragonato ai profili di permeazione del farmaco libero in soluzione o in sospensione. Va sempre ricordato che, nel caso della soluzione di IMA sono sempre presenti tracce di metanolo che, comunque, falsano il dato di permeazione incrementandolo, in quanto, come precedentemente discusso, il metanolo stesso può fungere da *enhancer*.



**Figura 63. Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti PHEA-EDA-RA (arancione) e PHEA-EDA-RA-PEG (verde scuro) permeati in funzione del tempo fino a 6 h**

Come emerge dal grafico in **Fig. 63**, le micelle fluorescenti a base di PHEA sono in grado di attraversare l'intera struttura corneale. Il test *ex vivo*, però, da anche altre informazioni non deducibili dal solo test *in vitro*. Infatti il dato ottenuto conferma la capacità di permeazione del sistema micellare vuoto di per sé, ma conferma anche che i due sistemi a base di PHEA si comportano in maniera analoga nonostante uno sia PEG-ylato e l'altro no. Inoltre emerge in maniera definitiva la migliore attitudine delle micelle a base di INU a permeare la barriera corneale. I dati inerenti la permeazione delle micelle a base di INU ad attraversare la barriera corneale. Paragonando tra di loro i due sistemi micellari a base di INU si osservano, infatti, due significative differenze: le micelle PEG-ylate mostrano un profilo di permeazione migliore e, comunque, in generale entrambi i sistemi a base di INU permeano meglio dei sistemi a base di PHEA. Infatti, al termine delle 6 h di esperimento la quantità di micelle INU-EDA-RA-Alexa Fluor<sub>488</sub> e INU-EDA-RA-PEG-Alexa Fluor<sub>488</sub> permeata ammonta rispettivamente a 21.02 e 44.54  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .



**Figura 64.** Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di IMA permeati in funzione del tempo (fino a 6 h) dopo somministrazione di A) micelle INU-EDA-RA (rosso) e INU-EDA-RA-PEG (verde) o B) PHEA-EDA-RA (arancione) e PHEA-EDA-RA-PEG (verde scuro) confrontati con il profilo di permeazione del farmaco da una soluzione (nero) o sospensione (blu)

I dati ottenuti in termini di permeazione di farmaco attraverso la cornea dopo somministrazione dei differenti sistemi micellari sono riportati in **Fig. 64** e risultano perfettamente in accordo con quanto dedotto a seguito degli studi di permeazione *ex vivo* dei soli sistemi micellari vuoti marcati con la sonda fluorescente. Infatti, appare chiaro che le micelle a base di INU comportano una permeazione nettamente superiore rispetto alle micelle a base di PHEA, inoltre, mentre per le micelle a base di INU si continua ad osservare una importante differenza tra le micelle PEG-ylate e quelle non PEG-ylate, questo non è vero per le micelle a base di PHEA. È confermato, quindi, il dato finora visto in tutti i differenti test condotti: le micelle a base di PHEA si comportano in maniera perfettamente sovrapponibile nonostante siano chimicamente differenti in quanto uno dei due sistemi porta delle catene di PEG legate covalentemente.

I dati ottenuti sono stati opportunamente elaborati per valutare matematicamente i valori di  $J_s$ ,  $K_p$ ,  $D_e$  e  $K_a$  (**Tabella 9**).



**Tabella 9. Valori di Js ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ), Kp (cm/h), De ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e Ka (cm)  $\pm$  SD ottenuti dai test di permeazione transcorneale *ex vivo* per l'IMA somministrato come soluzione, sospensione o caricato all'interno delle micelle a base di INU e PHEA**

	Js ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) ex vivo	Kp (cm/h) ex vivo	De ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ex vivo	Ka (cm) ex vivo
Imatinib (soluzione)	0.0074 $\pm$ 0.0009	0.0002 $\pm$ 0.0001	1.1433 $\pm$ 0.2536	0.0457 $\pm$ 0.0037
Imatinib (sospensione)	0.0255 $\pm$ 0.0015	0.0006 $\pm$ 0.0001	1.3861 $\pm$ 0.3012	0.0372 $\pm$ 0.0021
INU-EDA-RA/IMA	0.4782 $\pm$ 0.0181	0.0015 $\pm$ 0.0004	4.0141 $\pm$ 0.2915	0.0129 $\pm$ 0.0012
INU-EDA-RA-PEG/IMA	0.6022 $\pm$ 0.0152	0.0025 $\pm$ 0.0003	4.3466 $\pm$ 0.2870	0.0180 $\pm$ 0.0013
PHEA-EDA-RA/IMA	0.1079 $\pm$ 0.0120	0.0003 $\pm$ 0.0001	4.0177 $\pm$ 0.3001	0.0111 $\pm$ 0.0010
PHEA-EDA-RA-PEG/IMA	0.1159 $\pm$ 0.0101	0.0004 $\pm$ 0.0001	5.3869 $\pm$ 0.3205	0.0157 $\pm$ 0.0012

Dai dati ottenuti è evidente che tutti i sistemi micellari proposti comportano un aumento di Js e De importante. Tuttavia i dati più significativi e rilevanti sono quelli ottenuti in termini di Kp e Ka. Come risultava già graficamente evidente, le micelle a base di INU risultano nettamente migliori rispetto alle micelle a base di PHEA. Resta confermata, inoltre, in questo caso, la significativa differenza tra il sistema non PEG-ylato e quello PEG-ylato, il quale comporta un effetto *enhancer* nettamente superiore. In entrambi i casi, comunque, le micelle a base di INU mostrano un effetto da *permeation enhancer* nei confronti dell'IMA. Tale effetto risulta molto meno marcato quando si somministrano le micelle a base di PHEA, le quali, tra l'altro, mostrano il medesimo comportamento anche nei test *ex vivo*. Tutte e 4 le micelle non apportano, invece, aumenti del Ka, anzi apparentemente lo riducono. Questo può essere dovuto al fatto che, somministrando il farmaco da solo (sia come soluzione che come sospensione), a causa della sua elevata lipofilia esso si accumula all'interno delle cellule, presumibilmente a livello dell'epitelio corneale (come dimostrato anche dai test di permeazione *in vitro* che consentivano di osservare quote di farmaco residuo a livello cellulare). È probabile che la presenza delle micelle modifichi il pathway di permeazione impedendo, quindi, questo accumulo



intracellulare (anche questa ipotesi è supportata dai dati ottenuti dagli studi di permeazione *in vitro*).

I motivi per cui le micelle a base di PHEA risultano meno efficienti potrebbero essere sostanzialmente due:

- ☉ Da un lato forse i sistemi a base di PHEA, essendo molto più mucoadesivi, potrebbero rimanere maggiormente a contatto con la superficie corneale ma non riescono ad oltrepassarla, rimanendovi intrappolati,
- ☉ Questo potrebbe essere dovuto anche al differente PM dell'unimero costituente le micelle. Infatti l'INU di partenza ha un PM di 5000 Da, mentre il PHEA di 40000 Da. È quindi probabile che gli unimeri anfifilici e più piccoli dei derivati dell'INU siano in grado di introdursi più facilmente all'interno della barriera corneale modificandone la permeabilità.

Comunque, anche se per motivi diversi, entrambi i sistemi hanno le loro grosse potenzialità. A prescindere dall'effetto *enhancer* più o meno marcato, infatti, le micelle rendono facilmente somministrabile l'IMA che, altrimenti, a causa della sua elevata lipofilia non sarebbe di semplice formulazione. Inoltre la forte mucoadesione dei sistemi comporta la possibilità di massimizzare l'effetto terapeutico di una goccia di collirio.

### **4.3 Micelle Polimeriche A Base Di Inulina: Valutazione Dell'Efficacia Di Differenti Penetration/Permeation Enhancers Legati Chimicamente E Non**

Alla luce dei risultati così promettenti finora ottenuti con le micelle polimeriche a base di INU è stato deciso di proseguire il lavoro utilizzando come sistema di partenza il polimero e, dunque, le micelle INU-EDA-RA, al fine di ottimizzare ulteriormente il sistema finale.

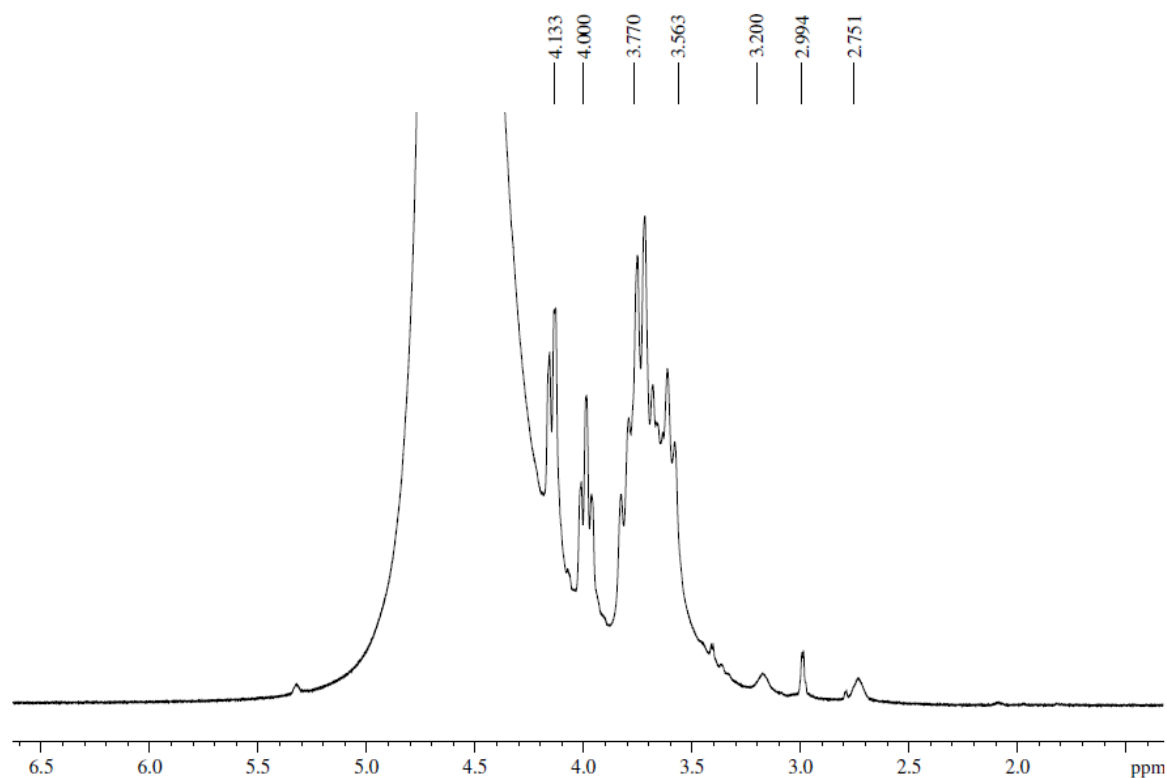
A questo punto del lavoro di ricerca svolto, sono stati, quindi, indagati differenti *penetration/permeation enhancers*. In tal senso sono state sfruttate molecole i cui specifici trasportatori sono siti al livello dell'epitelio corneale. Nella fattispecie sono state impiegate la taurina, la carnitina e la creatina. Il razionale di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficacia delle suddette molecole non solo quando legate chimicamente al backbone del polimero costituente il sistema micellare, ma anche quando cosomministrati con le micelle previa solubilizzazione nell'opportuno sistema tampone. Allo scopo di completare il quadro positivo finora osservato circa l'azione del PEG, anche tale molecola è stata inserita come *enhancer* da valutare nello studio, sebbene non possieda specifici trasportatori a livello corneale. L'impiego di molecole i cui trasportatori sono siti al livello dell'epitelio corneale ha, quindi, lo scopo di verificare se quanto utile in termini di formulazione di profarmaci possa essere, in qualche modo, traslato anche sui nanocarrier. In particolare questo studio è fattibile in quanto il carrier proposto è una struttura micellare costituita da unimeri in equilibrio dinamico tra la forma aggregata e non e quindi in grado, potenzialmente, di interagire in maniera opportuna con la cornea non solo come micella polimerica nel suo insieme ma anche come unimero stesso.

Il punto di partenza di questo lavoro, quindi, è consistito nella sintesi dei derivati polimerici leganti gli *enhancers* scelti.

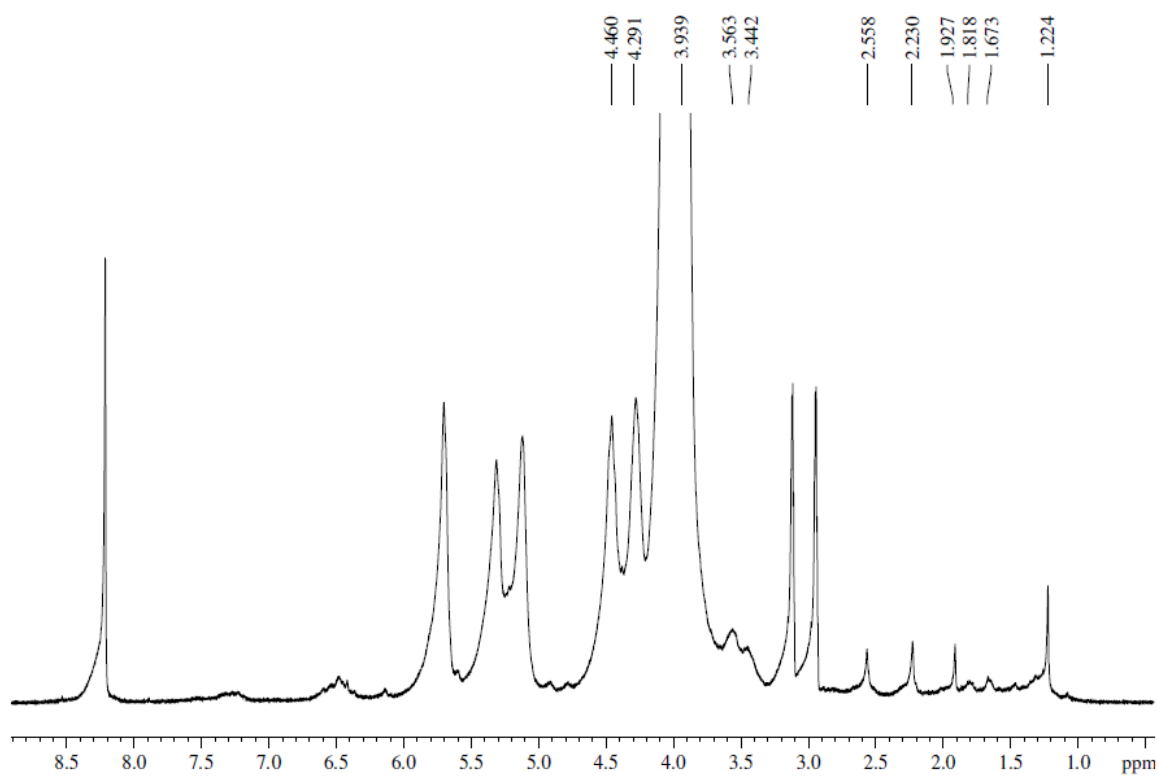
Il derivato polimerico di partenza è quindi l'INU-EDA-RA.

La procedura sintetica per la realizzazione dei nuovi derivati, denominati INU-EDA-TAU-RA, INU-EDA-RA-CAR e INU-EDA-RA-CRE, è stata opportunamente messa a punto al fine di ottenere valori di DD mol % in termini di molecola *enhancer* di circa il 2%. In questo modo è stato possibile paragonare tra di loro le medesime quantità di *enhancer* in rapporto alle catene di polimero.

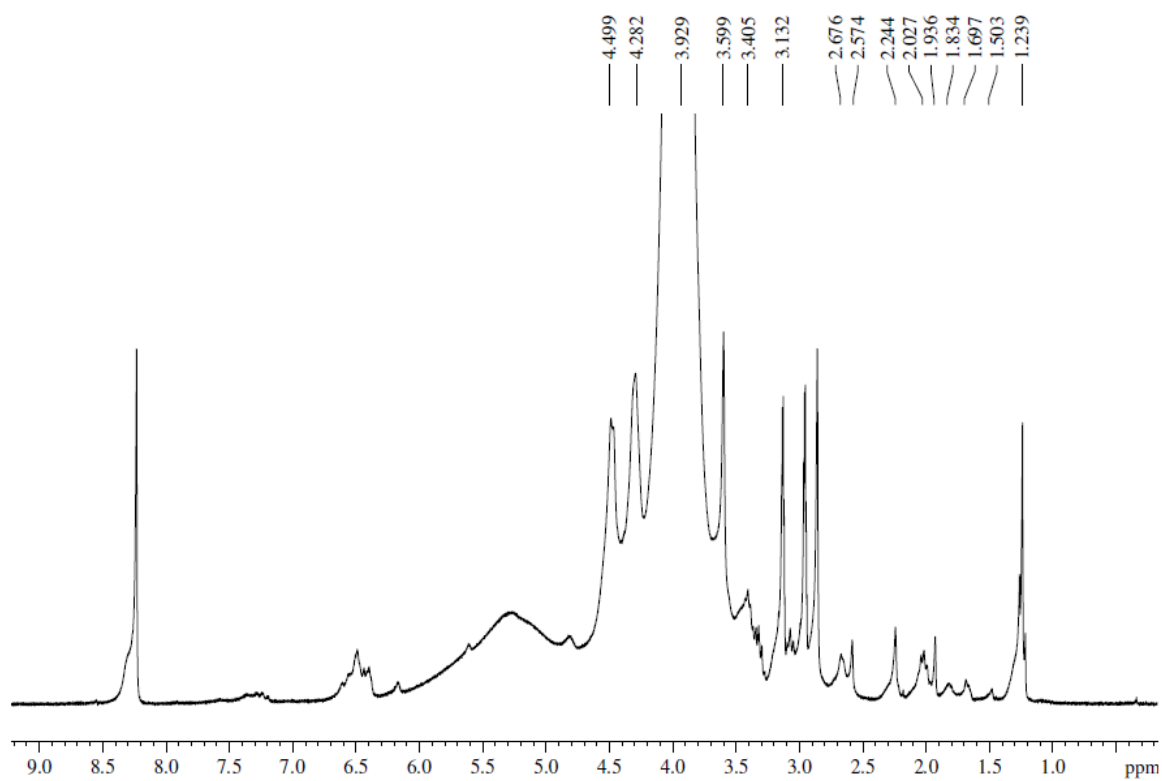
I nuovi derivati polimerici prodotti sono stati, quindi caratterizzati mediante analisi spettrofotometriche, infrarosse e  $^1\text{H-NMR}$ . Gli spettri UV-VIS e ATRFT-IR non sono riportati in quanto non utili a fini diagnostici e quantitativi. Sono invece riportati in **Fig. 65, 66, 67 e 68** gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  di INU-EDA-TAU, INU-EDA-TAU-RA, INU-EDA-RA-CAR e INU-EDA-RA-CRE rispettivamente, utilizzati per il calcolo dei DD mol % riportati in **Tabella 10**.



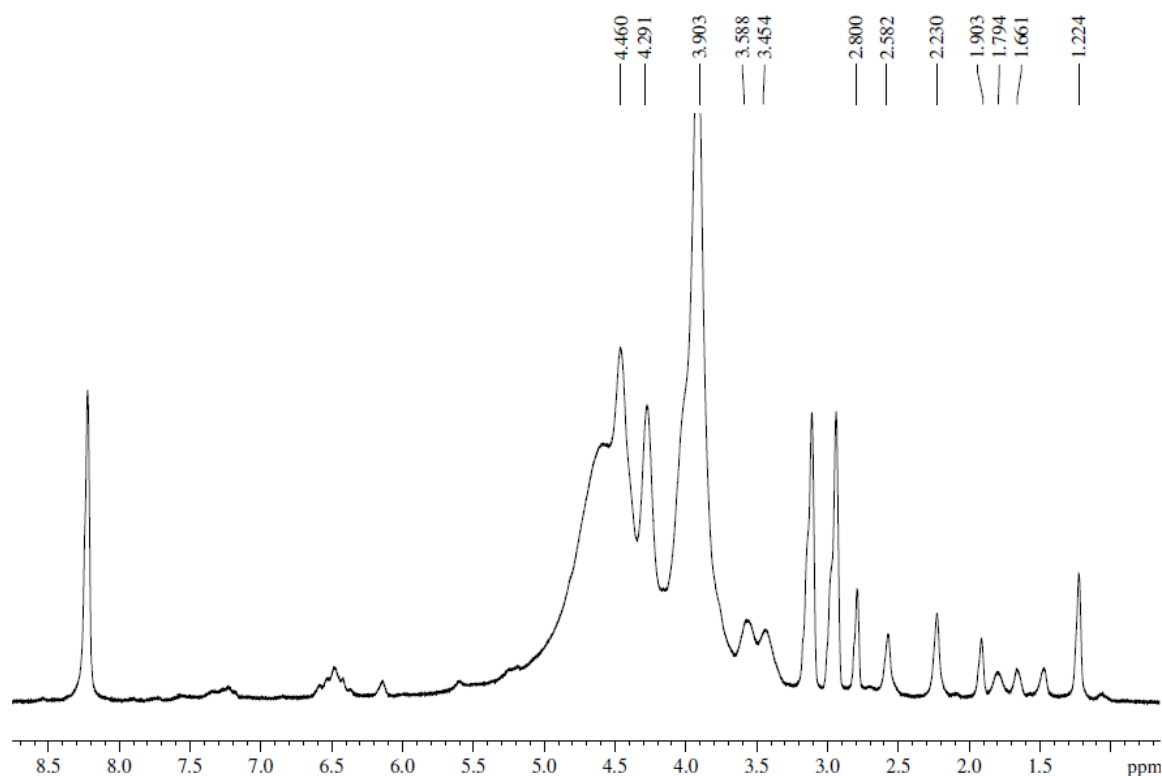
**Figura 65. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di INU-EDA-TAU**



**Figura 66. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di INU-EDA-TAU-RA**



**Figura 67. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di INU-EDA-RA-CAR**



**Figura 68. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di INU-EDA-RA-CRE**

Come è possibile osservare (**Tabella 10**), è stato raggiunto l'obiettivo prefissato di sintetizzare derivati polimerici con pressocchè la stessa quantità in termini di mol % di molecola ad azione *enhancer*.

**Tabella 10. DD mol % in EDA, RA, PEG, TAU, CAR e CRE per i derivati INU-EDA-RA, INU-EDA-RA-PEG, INU-EDA-TAU-RA, INU-EDA-RA-CAR e INU-EDA-RA-CRE calcolati mediante analisi  $^1\text{H-NMR}$**

	DD mol % <sub>EDA</sub>	DD mol % <sub>RA</sub>	DD mol % <sub>PEG</sub>	DD mol % <sub>TAU</sub>	DD mol % <sub>CAR</sub>	DD mol % <sub>CRE</sub>
INU-EDA-RA	11.30 ± 1.50	4.30 ± 0.30	–	–	–	–
INU-EDA-RA-PEG	11.30 ± 1.50	4.30 ± 0.30	1.50 ± 0.25	–	–	–
INU-EDA-TAU-RA	11.30 ± 1.50	4.30 ± 0.30	–	2.16 ± 0.10	–	–
INU-EDA-RA-CAR	11.30 ± 1.50	4.30 ± 0.30	–	–	2.00 ± 0.13	–
INU-EDA-RA-CRE	11.30 ± 1.50	4.30 ± 0.30	–	–	–	1.90 ± 0.15

Per ogni nuovo derivato polimerico è stata, ovviamente, valutata la CAC in acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 ed HEPES pH 7.4. I risultati riportati in **Tabella 11** mostrano chiaramente come tutti i derivati prodotti sono in grado di auto-aggregare in ambiente acquoso e in genere l'introduzione chimica dell'*enhancer* comporta una maggiore dipendenza del self-assembling dal pH e dalla forza ionica del mezzo, come già precedentemente osservato per il derivato PEG-ylato.

**Tabella 11. Valori di Concentrazione di Aggregazione Critica (CAC) in mg/ml calcolati per tutti i polimeri in acqua bidistillata, DPBS pH 7.4 ed HEPES pH 7.4**

	Acqua Bidistillata	DPBS pH 7.4	HEPES pH 7.4
INU-EDA-RA	0.135 ± 0.003	0.136 ± 0.002	0.135 ± 0.003
INU-EDA-RA-PEG	0.209 ± 0.004	0.073 ± 0.001	0.185 ± 0.002
INU-EDA-TAU-RA	0.142 ± 0.003	0.125 ± 0.002	0.135 ± 0.002
INU-EDA-RA-CAR	0.100 ± 0.002	0.110 ± 0.002	0.140 ± 0.003
INU-EDA-RA-CRE	0.245 ± 0.004	0.150 ± 0.003	0.125 ± 0.003

In analogia a quanto già fatto inizialmente con i polimeri INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG, tutti i nuovi derivati sono stati impiegati per la realizzazione di micelle polimeriche vuote e cariche, nonché di micelle polimeriche marcate con una sonda fluorescente.

Quale farmaco modello da utilizzare per la valutazione dell'efficacia di tutti i differenti *enhancer* scelti è stato scelto grazie alla sua semplice detection sia UV-VIS che HPLC ma anche alla sua lipofilia e al suo logP che sono già risultati opportuni per ottenere una buona incorporazione all'interno delle micelle, un sistema stabile e risultati ottimali in termini di valutazione della variazione sia di K<sub>p</sub> che di K<sub>a</sub> *ex vivo*.

Inoltre, si tratta comunque di un farmaco utilissimo nel trattamento delle patologie degenerative retiniche grazie al suo meccanismo d'azione ad ampio spettro e, tuttavia, difficilmente somministrabile a causa delle sue proprietà chimico-fisiche che lo rendono scarsamente solubile in ambiente acquoso e dotato di bassa emivita intravitreale. Si tratta quindi di un farmaco potenzialmente efficace ma che, per diventare tale, necessita di essere veicolato da una formulazione progettata *ad hoc*.

Il metodo utilizzato per la preparazione delle micelle è stato il metodo del casting poiché, come già visto, tale metodo permette una buona incorporazione del farmaco scelto.

La caratterizzazione delle micelle polimeriche in termini di DL%, dimensioni, PDI e potenziale zeta è mostrata in **Tabella 12** e denota dimensioni micellari pressoché costanti sia al variare del mezzo disperdente sia a seguito dell'incorporazione del farmaco. Per le micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG, invece, era stato osservato un significativo aumento delle dimensioni micellari dopo caricamento del DEX, questo però è probabilmente legato ai più elevati valori di DL% ottenuti per le micelle INU-EDA-RA/DEX e INU-EDA-RA-PEG/DEX rispetto agli altri sistemi micellari prodotti che, comunque, risultano tutti in grado di incorporare il desametasone. Sono, invece, da notare le importanti variazioni in termini di potenziale zeta delle micelle in acqua in base all'*enhancer* introdotto. In particolare, come è possibile osservare, non tutti i sistemi micellari risultano dotati di carica positiva in acqua.

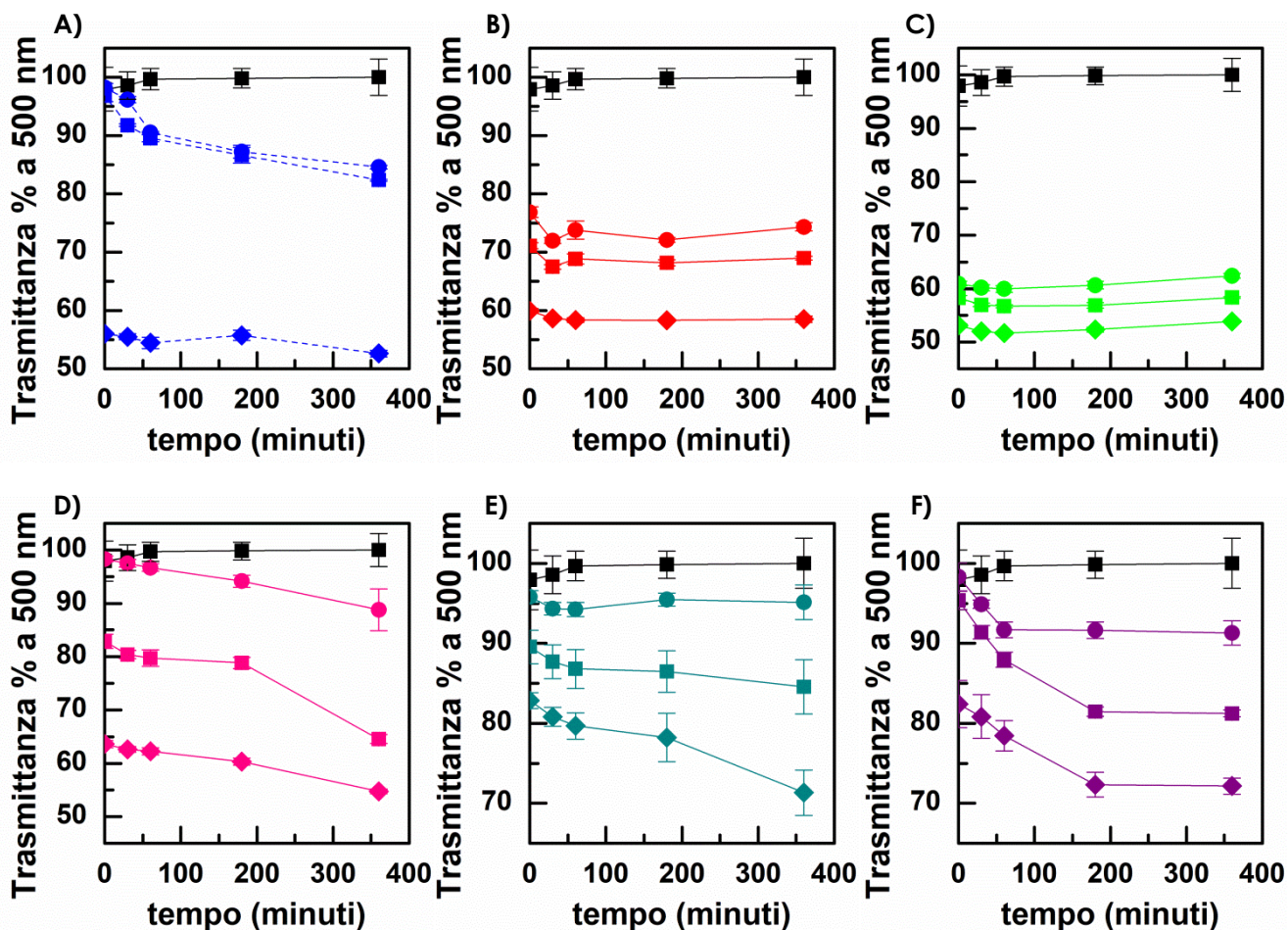
Le micelle vuote sono state dunque, sottoposte a test di mucoadesione condotti, questa volta, solo con il metodo della turbidimetria in quanto non solo esso sia in grado di dare maggiori informazioni, ma anche alla luce del fatto che non tutti i sistemi micellari da testare posseggono potenziale zeta in acqua positivo e, pertanto, in alcuni casi potrebbe essere esclusa una mucoadesione per interazione elettrostatica.

La mucoadesione è stato un importante parametro valutato principalmente a due scopi: il primo è quello di osservare le effettive variazioni strutturali superficiali delle micelle, dovute alla funzionalizzazione chimica con i differenti *enhancer*, attraverso le modifiche nel loro carattere mucoadesivo, il secondo, se possibile, è quello di valutare se esista una correlazione tra mucoadesione ed effetto *enhancer*.

**Tabella 12. Particle Size (nm), PDI, Potenziale Zeta e Drug Loading % (p/p) di tutte le micelle preparate**

	DL % (p/p)	Particle Size (nm)	PDI	Z-Potential (mV)	Medium
INU-EDA-TAU-RA	–	227.41 ± 12.33	0.159	-7.72 ± 0.88	Acqua
		225.62 ± 11.70	0.145	-2.65 ± 0.13	DPBS
		234.40 ± 15.62	0.149	-2.96 ± 0.20	HEPES
INU-EDA-TAU-RA-Alexa Fluor <sub>488</sub>	–	222.78 ± 13.81	0.169	-6.99 ± 0.40	Acqua
		228.98 ± 15.00	0.160	-2.06 ± 0.11	DPBS
		229.99 ± 14.67	0.159	-2.49 ± 0.16	HEPES
INU-EDA-TAU-RA/DEX	6.60 ± 0.56 %	226.00 ± 10.42	0.100	-9.10 ± 0.74	Acqua
		250.63 ± 18.17	0.102	-3.22 ± 0.54	DPBS
		235.00 ± 13.31	0.198	-0.27 ± 0.01	HEPES
INU-EDA-RA-CAR	–	220.22 ± 12.03	0.109	18.72 ± 1.03	Acqua
		223.94 ± 16.00	0.125	-1.65 ± 0.12	DPBS
		225.49 ± 15.47	0.139	-1.96 ± 0.10	HEPES
INU-EDA-RA-CAR-Alexa Fluor <sub>488</sub>	–	224.54 ± 11.19	0.115	16.99 ± 0.80	Acqua
		228.89 ± 12.09	0.150	-1.09 ± 0.10	DPBS
		226.97 ± 13.40	0.147	-1.40 ± 0.14	HEPES
INU-EDA-RA-CAR/DEX	4.10 ± 0.33 %	224.00 ± 11.87	0.131	20.33 ± 1.13	Acqua
		230.60 ± 14.14	0.109	-1.22 ± 0.21	DPBS
		231.20 ± 13.99	0.118	-2.27 ± 0.15	HEPES
INU-EDA-RA-CRE	–	227.41 ± 13.09	0.159	12.30 ± 0.94	Acqua
		225.66 ± 12.00	0.196	-1.65 ± 0.18	DPBS
		234.43 ± 18.01	0.138	-2.96 ± 0.22	HEPES
INU-ED-RA-CRE-Alexa Fluor <sub>488</sub>	–	229.01 ± 11.50	0.163	11.98 ± 0.99	Acqua
		228.81 ± 12.09	0.158	-1.49 ± 0.23	DPBS
		232.32 ± 17.00	0.166	-2.50 ± 0.30	HEPES
INU-ED-RA-CRE/DEX	4.20 ± 0.20 %	226.00 ± 17.08	0.140	10.5 ± 0.79	Acqua
		250.60 ± 19.22	0.191	-3.63 ± 0.33	DPBS
		235.01 ± 13.66	0.108	-4.8 ± 0.35	HEPES





**Figura 69.** Trasmittanza % a 500 nm di Mucina (nero), A) acido poliacrilico (blu) e micelle B) INU-EDA-RA (rosso), C) INU-EDA-RA-PEG (verde), D) INU-EDA-TAU-RA (rosa), E) INU-EDA-RA-CAR (petrolio), F) INU-EDA-RA-CRE (viola) alle concentrazioni di 0.5 mg/ml (cerchio), 1 mg/ml (quadrato) e 5 mg/ml (rombo)

Come possiamo vedere dai grafici in **Fig. 69**, tutte le nuove micelle preparate sono dotate di proprietà mucoadesive, confermate paragonando i risultati di trasmittanza % ottenuti singolarmente con quelli calcolati per il controllo positivo di PAA (**pannello A**). Tuttavia, il carattere mucoadesivo dei differenti sistemi micellari risulta molto differente. Il comportamento delle micelle funzionalizzate con i vari *enhancer* selezionati risulta estremamente vario sia in termini di dipendenza dal tempo che dalla concentrazione.

Le micelle INU-EDA-RA (**pannello B**) ed INU-EDA-RA-PEG (**pannello C**), come già discusso mostrano un comportamento tempo-indipendente e concentrazione-dipendente. Inoltre, è evidente l'effetto positivo della PEG-ylazione sulla mucoadesione.

Le micelle INU-EDA-TAU-RA (**pannello D**) mostrano un trend di aumento della mucoadesione in funzione del tempo di incubazione. La dipendenza della mucoadesione

dal tempo è probabilmente dovuta al fatto che, avendo le micelle potenziale zeta in acqua negativo, i legami che esse formano con la mucina non sono di natura elettrostatica e pertanto, probabilmente, necessitano di un tempo maggiore per instaurarsi. Inoltre, anche se il loro comportamento resta concentrazione-dipendente, la differenza di mucoadesività alle 3 concentrazioni testate è molto più evidente rispetto a quella osservata per le micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG. La trasmittanza % a 500 nm a 6 h passa infatti dall'88.80%, osservato per una concentrazione di micelle pari a 0.5 mg/ml, al 64,55%, per una concentrazione micellari pari a 1 mg/ml, fino a raggiungere il valore di 54.73% per la più alta concentrazione testata (5 mg/ml), paragonabile al valore ottenuto per le micelle INU-EDA-RA-PEG alla medesima concentrazione ed al medesimo tempo. La principale differenza con le micelle sia INU-EDA-RA che INU-EDA-RA-PEG è, quindi, ascrivibile al differente tempo necessario al sistema per la creazione di una, via via, più salda interazione mucoadesiva.

Le micelle INU-EDA-RA-CAR e INU-EDA-RA-CRE mostrano un comportamento mucoadesivo meno marcato di tutte le altre e paragonabile tra di loro, sebbene l'andamento osservato non sia esattamente sovrappomibile.

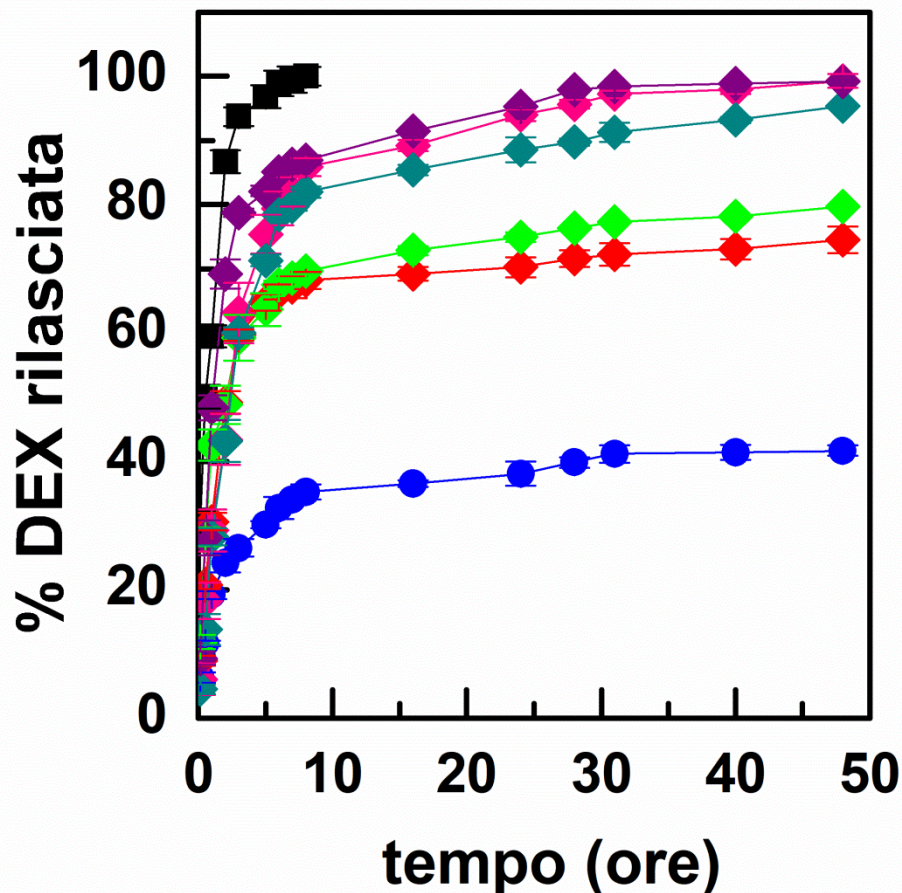
Infatti, alle 2 concentrazioni più basse le micelle INU-EDA-RA-CAR (**pannello E**) mostrano un comportamento praticamente tempo-indipendente, mentre mostrano un trend di riduzione della trasmittanza % alla concentrazione di 5 mg/ml.

Al contrario, le micelle INU-EDA-RA-CRE (**pannello F**) mostrano sempre un andamento decrescente di trasmittanza % ma solo fino al raggiungimento di un plateau che si osserva dopo 1 h di incubazione analizzando la concentrazione 0.5 mg/ml e dopo 3 h di incubazione per le altre due concentrazioni testate. È probabile quindi che, ad un certo punto, il sistema saturi la mucina presente.

Comparare in maniera lineare ed univoca i risultati ottenuti risulta, quindi, piuttosto complesso. Infatti, sebbene in generale è possibile dire che le micelle INU-EDA-RA-CAR e INU-EDA-RA-CRE siano le meno mucoadesive, è difficile asserire con certezza quale sistema sia il più mucoadesivo, in quanto non è possibile riferirsi solo al valore finale di trasmittanza % ma si deve tenere in considerazione anche il differente comportamento in funzione del tempo. Le differenze osservate tra tutti i sistemi micellari proposti sono, però, una ulteriore prova dell'avvenuta funzionalizzazione chimica che ha portato alla realizzazione di sistemi carrier dotati di superficie differente e, quindi, in grado di interagire in maniera diversa con l'ambiente ad essi circostante.

Per di più, nello scenario del complesso fenomeno di mucoadesione in vivo, non va dimenticato che, presumibilmente, le micelle funzionalizzate con *enhancer* quali la taurina, la carnitina e la creatina potrebbero aderire alla superficie corneale anche mediante interazione con gli specifici recettori per le suddette molecole siti proprio al livello dell'epitelio corneale. I risultati ottenuti, quindi, sono del tutto pilota e, tuttavia, estremamente incoraggianti.

Per quanto riguarda le micelle cariche di farmaco, ancora una volta, sono stati condotti studi di rilascio *in vitro*. Il profilo di rilascio del DEX dai differenti sistemi micellari è stato valutato, come precedentemente visto, utilizzando il metodo della dialisi.

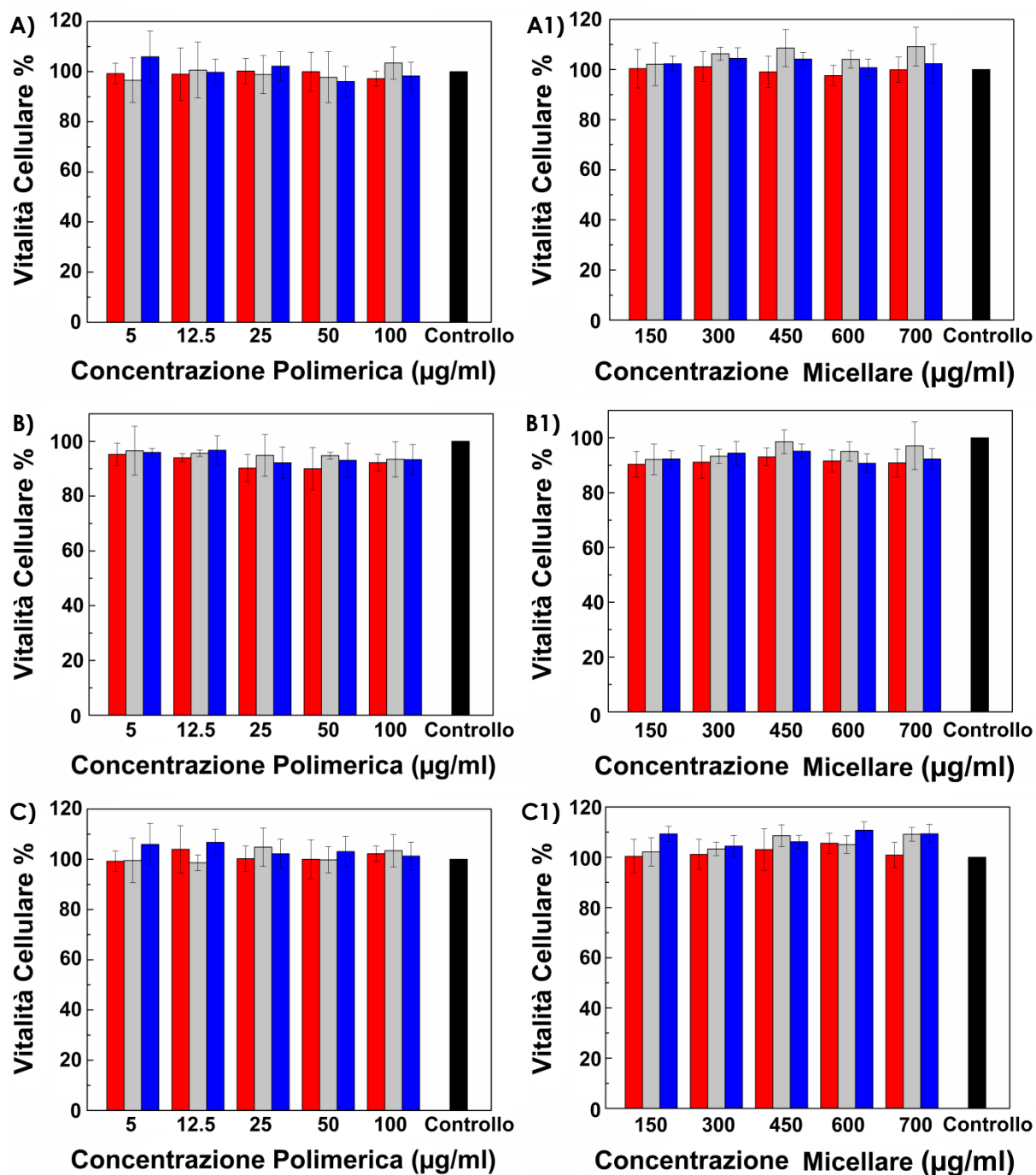


**Figura 70.** Profilo di rilascio percentuale del DEX dalle micelle INU-EDA-RA (rosso), INU-EDA-RA-PEG (verde), INU-EDA-TAU-RA (rosa), INU-EDA-RA-CAR (petrolio) e INU-EDA-RA-CRE (viola) confrontati con il profilo di diffusione del farmaco dalla soluzione (nero) e di dissoluzione e diffusione del farmaco dalla sospensione (blu)

Come mostra il grafico in **Fig. 70**, i nuovi sistemi micellari sono tutti in grado di rilasciare il DEX e, di conseguenza, apportano gli stessi vantaggi già discussi per le micelle INU-EDA-RA e INU-EDA-RA-PEG cioè la possibilità di somministrare una maggiore

quantità di farmaco rispetto alla soluzione nonché la possibilità di rilasciare maggiori quantità di farmaco libero, e quindi disponibile per il fenomeno di assorbimento, rispetto alla sospensione. È importante osservare che i profili di rilascio più lenti sono proprio quelli relativi alle micelle INU-EDA-RA/DEX e INU-EDA-RA-PEG/DEX. Questo non stupisce in quanto tali sistemi micellari sono gli stessi che posseggono più alti valori di DL% e, quindi, i sistemi carrier maggiormente in grado di interagire saldamente con il farmaco scelto e, di conseguenza, di trattenerlo più a lungo, restando pur sempre estremamente vantaggiosi.

A questo punto, è stata valutata la citocompatibilità di tutti i nuovi derivati polimerici nonché strutture micellari nei confronti di HCEpiC al fine di valutarne l'effettiva somministrabilità per via oculare topica.



**Figura 71. Vitalità Cellulare % di HCEpiC riferita a cellule controllo non trattate (nero) dopo il trattamento con A) soluzioni e A1) dispersioni micellari di INU-EDA-TAU-RA, B) soluzioni e B1) dispersioni micellari di INU-EDA-RA-CAR, C) soluzioni e C1) dispersioni micellari di INU-EDA-RA-CRE dopo trattamento di 1 h (rosso), 4 h (grigio) e 24 h (blu)**

Come illustrato in **Fig. 71** tutti i nuovi derivati polimerici ed i sistemi micellari prodotti a partire dagli stessi risultano perfettamente citocompatibili a tutte le concentrazioni testate.

Per uno studio più completo ogni *enhancer* (PEG, TAU, CAR e CRE) è stato valutato sia quando esso è parte integrante del polimero formante le micelle in quanto legato ad esso chimicamente (ci si riferisce dunque ai sistemi micellari finora caratterizzati e discussi) sia quando presente in soluzione all'interno del mezzo disperdente. In questo caso sono, quindi, state impiegate micelle INU-EDA-RA/DEX disperse in HEPES pH 7.4 contenente un'opportuna quantità di molecola *enhancer* in soluzione calcolata in modo tale che corrispondesse sempre al 2% in moli rispetto alla quantità di polimero caricata sotto forma di micelle.

Dato che, gli studi di permeazione precedentemente condotti sia sulle sole micelle di INU (permeazioni di DEX, T e TA) che per confrontare micelle a base di INU e micelle a base di PHEA (permeazioni IMA) hanno chiaramente messo in evidenza come la valutazione della permeazione transcorneale *in vitro* impiegando sistemi transwell non risulti diagnostica e rivelatrice al fine di evidenziare le differenze tra diverse strutture micellari, per il presente studio si è optato per la valutazione della permeazione transcorneale solo *ex vivo* impiegando, come precedentemente illustrato, cornee bovine e celle di diffusione verticali di Franz. Gli studi sono stati condotti in maniera analoga sia con le micelle fluorescenti che con le micelle cariche di farmaco.

I risultati ottenuti sono riportati in **Fig. 72** per quanto riguarda i profili di permeazione delle micelle fluorescenti ed in **Fig. 73** per quanto riguarda il profilo di permeazione del DEX somministrato sotto forma di farmaco incorporato all'interno di tutti i sistemi micellari ed in presenza di tutti gli *enhancers*. Inoltre in **Fig. 74** è riportata, per ogni esperimento condotto con le micelle fluorescenti, la quantità di micelle ( $\mu\text{g}$ ) rimasta intrappolata all'interno del tessuto corneale al termine di ognuno dei test di permeazione condotti. Infine, l'analisi matematica dei dati ottenuti per quanto riguarda la permeazione del DEX ha permesso di calcolare i valori di  $J_s$ ,  $K_p$ ,  $D_e$  e  $K_a$  riportati in **Tabella 13**.

È importante osservare, innanzi tutto, che i dati dei 2 differenti set di esperimenti di permeazione sono perfettamente concordi.



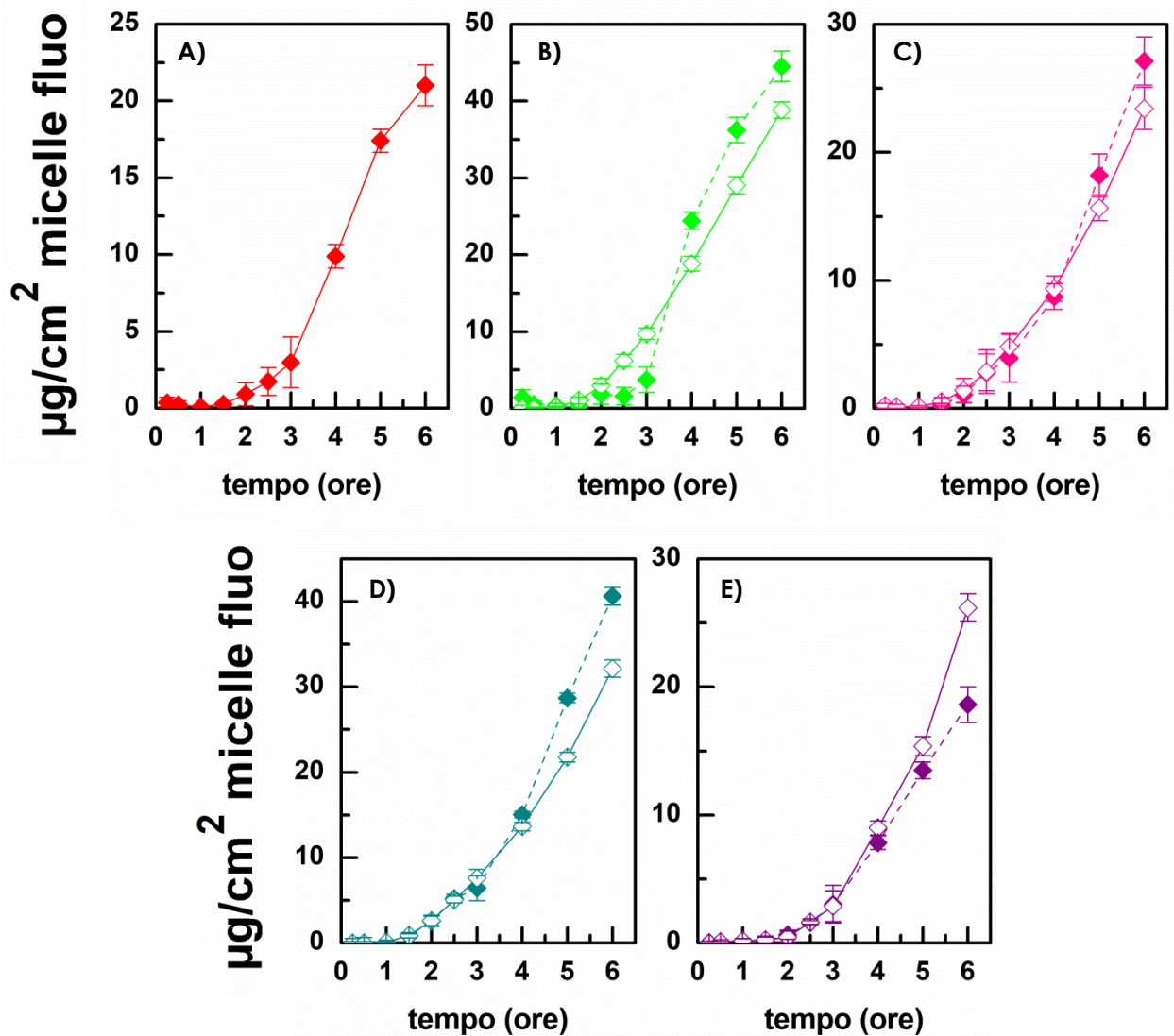


Figura 72. Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di micelle fluorescenti permeate in funzione del tempo (fino a 6 h) dopo somministrazione di A) micelle INU-EDA-RA (rosso), B) micelle INU-EDA-RA-PEG (verde – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di PEG in HEPES pH 7.4 (verde – simbolo vuoto), C) micelle INU-EDA-TAU-RA (rosa – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di TAU in HEPES pH 7.4 (rosa – simbolo vuoto), D) micelle INU-EDA-RA-CAR (petrolio – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di CAR in HEPES pH 7.4 (petrolio – simbolo vuoto) e E) micelle INU-EDA-RA-CRE (viola – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di CAR in HEPES pH 7.4 (viola – simbolo vuoto)

In generale possiamo osservare che la presenza degli enhacer, siano essi parte della micella o no, comporta sempre un aumento sia del  $K_p$  che del  $K_a$  del DEX rispetto a quello

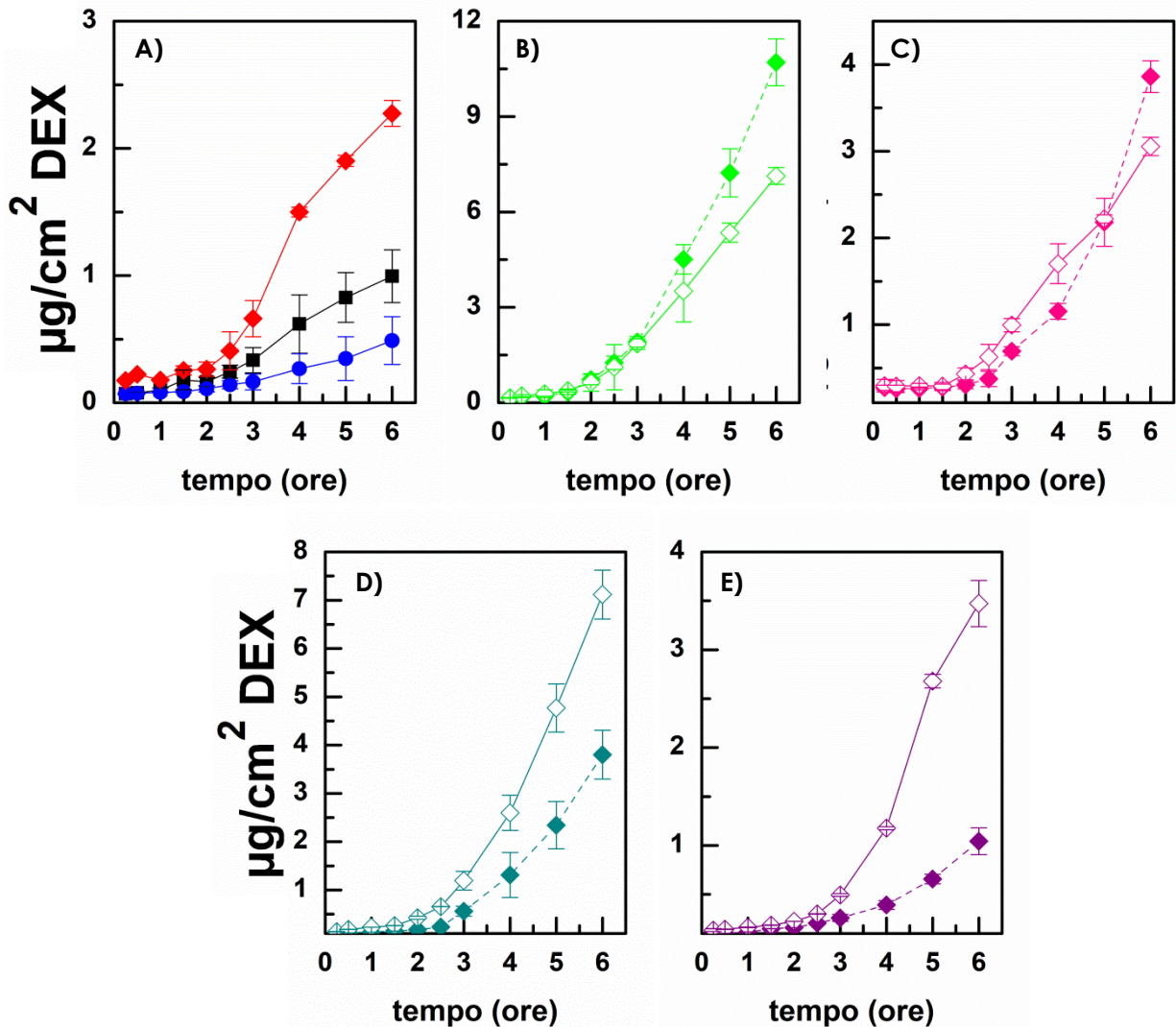
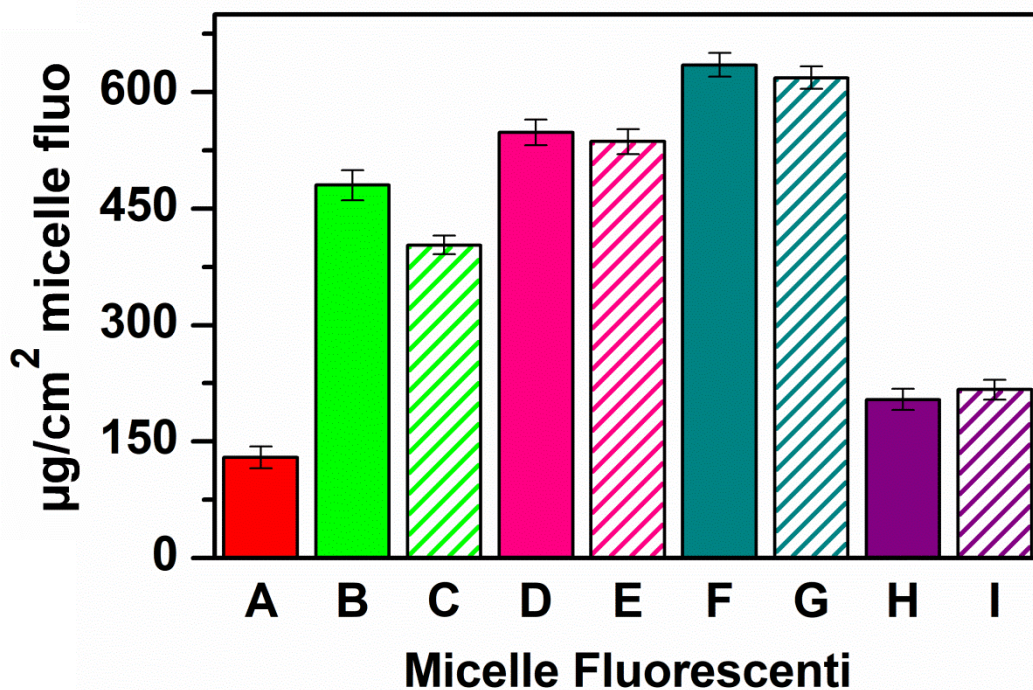


Figura 73. Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di DEX permeato in funzione del tempo (fino a 6 h) dopo somministrazione di A) micelle INU-EDA-RA/DEX (rosso), B) micelle INU-EDA-RA-PEG/DEX (verde – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA/DEX disperse in una soluzione di PEG in HEPES pH 7.4 (verde – simbolo vuoto), C) micelle INU-EDA-TAU-RA/DEX (rosa – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA/DEX disperse in una soluzione di TAU in HEPES pH 7.4 (rosa – simbolo vuoto), D) micelle INU-EDA-RA-CAR/DEX (petrolio – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA/DEX disperse in una soluzione di CAR in HEPES pH 7.4 (petrolio – simbolo vuoto) e E) micelle INU-EDA-RA-CRE/DEX (viola – simbolo pieno) o micelle INU-EDA-RA/DEX disperse in una soluzione di CAR in HEPES pH 7.4 (viola – simbolo vuoto) confrontati con il profilo di diffusione del farmaco dalla soluzione (nero) e di dissoluzione e diffusione del farmaco dalla sospensione (blu)

calcolato quando il farmaco è somministrato con le micelle base INU-EDA-RA, l'unica eccezione è costituita in entrambi i casi dalle micelle INU-EDA-RA-CRE/DEX che sono le



uniche a non apportare alcuna miglioria. Nonostante ciò la CRE come *enhancer* in soluzione risulta efficace. Probabilmente questa differenza è legata ad una non appropriata esposizione del gruppo guanidinico della CRE quando legata chimicamente, in quanto, secondo dati presenti in letteratura, sarebbe proprio tale gruppo il responsabile dell'azione *enhancer*. Nello specifico, è possibile osservare come alcuni *enhancers* (PEG e TAU) agiscano al meglio quando sono legati chimicamente al sistema micellare piuttosto che liberi in soluzione mentre, per CAR e CRE si osserva un comportamento esattamente opposto. Questo può dipendere non solo dai differenti meccanismi coinvolti nel loro effetto *enhancer* ma anche dalla loro esposizione sulla superficie micellare e dall'eventuale ingombro sterico che li maschera quando sono legati covalentemente.



**Figura 74. Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*: µg/cm<sup>2</sup> di micelle fluorescenti rimaste intrappolate al livello del tessuto corneale al termine del test di permeazione (6 h) dopo somministrazione di A) micelle INU-EDA-RA (rosso), B) micelle INU-EDA-RA-PEG (verde), C) micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di PEG in HEPES pH 7.4 (a righe verdi), D) micelle INU-EDA-TAU-RA (rosa), E) micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di TAU in HEPES pH 7.4 (a righe rosa), F) micelle INU-EDA-RA-CAR (petroli), G) micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di CAR in HEPES pH 7.4 (a righe petrolio), H) micelle INU-EDA-RA-CRE (viola) e I) micelle INU-EDA-RA disperse in una soluzione di CAR in HEPES pH 7.4 (a righe viola)**

Inoltre come si osserva sia dal grafico in **Fig. 74** per le micelle fluorescenti che dai valori di  $D_e$  e  $K_a$  riportati in **Tabella 13**, sembra che, in termini di quantità di micelle/farmaco penetrati e ritenuti al termine dell'esperimento nel tessuto corneale, non ci siano particolari e significative differenze quando l'*enhancer* è legato covalentemente piuttosto che in soluzione.

Va osservato, inoltre, che non c'è corrispondenza tra effetto di *penetration* (aumento di  $K_p$ ) o *permeation* (aumento di  $K_a$ ) *enhancer*. Infatti, sebbene il migliore *permeation enhancer* risulti il PEG, d'altro parte il migliore *penetration enhancer* è la carnitina.

L'incremento in termini di  $K_a$  risulta, talvolta estremamente notevole anche se lo stesso non si può dire per l'incremento osservato in termini di  $K_p$ . Provabilmente la presenza di molecole in grado di agire con specifici trasportatori di membrana attua un meccanismo *enhancer* differente che necessita anche di un po' più di tempo per tradursi da penetrazione a permeazione. Tuttavia va ricordato che la penetrazione è il primo step per la permeazione e, dunque, i dati finora ottenuti sono estremamente positivi.

In definitiva possiamo comunque concludere che decorando in maniera opportuna la superficie dei sistemi micellari con molecole ad azione *enhancer*, possibilmente in grado di interagire con degli specifici trasportatori a livello cellulare, può effettivamente migliorare le caratteristiche del sistema finale comportando un importante aumento nel passaggio di farmaco attraverso la membrana biologica di interesse. Tuttavia per migliorare l'efficacia delle molecole *enhancer* può essere auspicabile legarle sulla superficie del carrier mediante uno spacer in grado di favorirne al meglio l'esposizione superficiale e, quindi, l'attività *enhancer* finale.

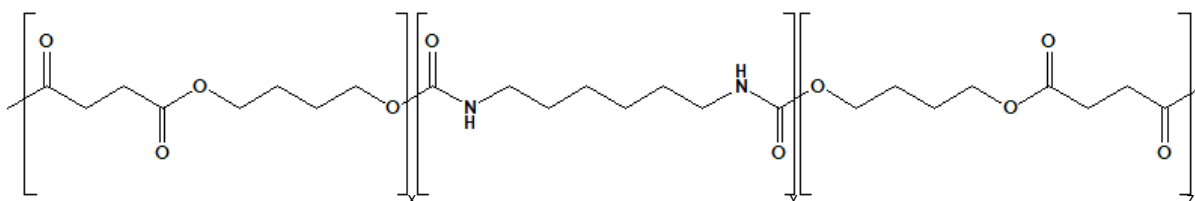
**Tabella 13. Valori di  $J_s$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $K_p$  (cm/h),  $D_e$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e  $K_a$  (cm)  $\pm$  SD ottenuti dai test di permeazione transcorneale *ex vivo* per il DEX, somministrato caricato all'interno delle micelle**

	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ )	$K_p$ (cm/h)	$D_e$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$K_a$ (cm)
INU-EDA-RA/DEX	$0.535 \pm 0.009$	$0.0016 \pm 0.0001$	$14.622 \pm 0.616$	$0.0441 \pm 0.0013$
INU-EDA-RA-PEG/DEX	$2.909 \pm 0.010$	$0.0086 \pm 0.0006$	$20.231 \pm 0.048$	$0.0600 \pm 0.0015$
INU-EDA-RA/DEX + PEG	$1.731 \pm 0.011$	$0.0052 \pm 0.0004$	$18.455 \pm 0.053$	$0.0556 \pm 0.0012$
INU-EDA-TAU-RA/DEX	$0.953 \pm 0.008$	$0.0024 \pm 0.0002$	$25.903 \pm 0.120$	$0.0652 \pm 0.0013$
INU-EDA-RA/DEX + TAU	$0.713 \pm 0.008$	$0.0022 \pm 0.0001$	$25.673 \pm 0.136$	$0.0773 \pm 0.0014$
INU-EDA-RA-CAR/DEX	$1.001 \pm 0.010$	$0.0026 \pm 0.0001$	$37.722 \pm 0.245$	$0.0961 \pm 0.0013$
INU-EDA-RA/DEX + CAR	$1.994 \pm 0.012$	$0.0060 \pm 0.0005$	$31.527 \pm 0.233$	$0.0950 \pm 0.0011$
INU-EDA-RA-CRE/DEX	$0.326 \pm 0.003$	$0.0008 \pm 0.0001$	$15.886 \pm 0.197$	$0.0373 \pm 0.0010$
INU-EDA-RA/DEX + CRE	$1.044 \pm 0.009$	$0.0031 \pm 0.0002$	$15.090 \pm 0.188$	$0.0455 \pm 0.0011$

#### **4.4 Funzionalizzazione Superficiale Plasma-Assistita di Scaffold Polimerici Come Inerti Oculari Mucoadesivi Per Il Rilascio Protratto Di Triamcinolone Acetonide**

Parallelamente alla progettazione, realizzazione ed ottimizzazione di sistemi carrier micellari sono stati anche opportunamente disegnati, preparati e caratterizzati gli scaffold fibrillari da impiegare come opportuni inserti oftalmici per il rilascio protratto di farmaci altamente idrofobici, quali il triamcinolone acetonide, e, quindi, altrimenti di difficile formulazione e somministrazione.

Per fare ciò, il punto di partenza è consistito nella realizzazione dei suddetti scaffold mediante tecnica di elettrospinning o elettrofilatura. Il polimero utilizzato a tale scopo è il Poly(1, 4-butilene succinato) (PBS), un polimero altamente idrofobico avente struttura chimica illustrata in **Fig. 75**.



**Figura 75. Struttura chimica del PBS**

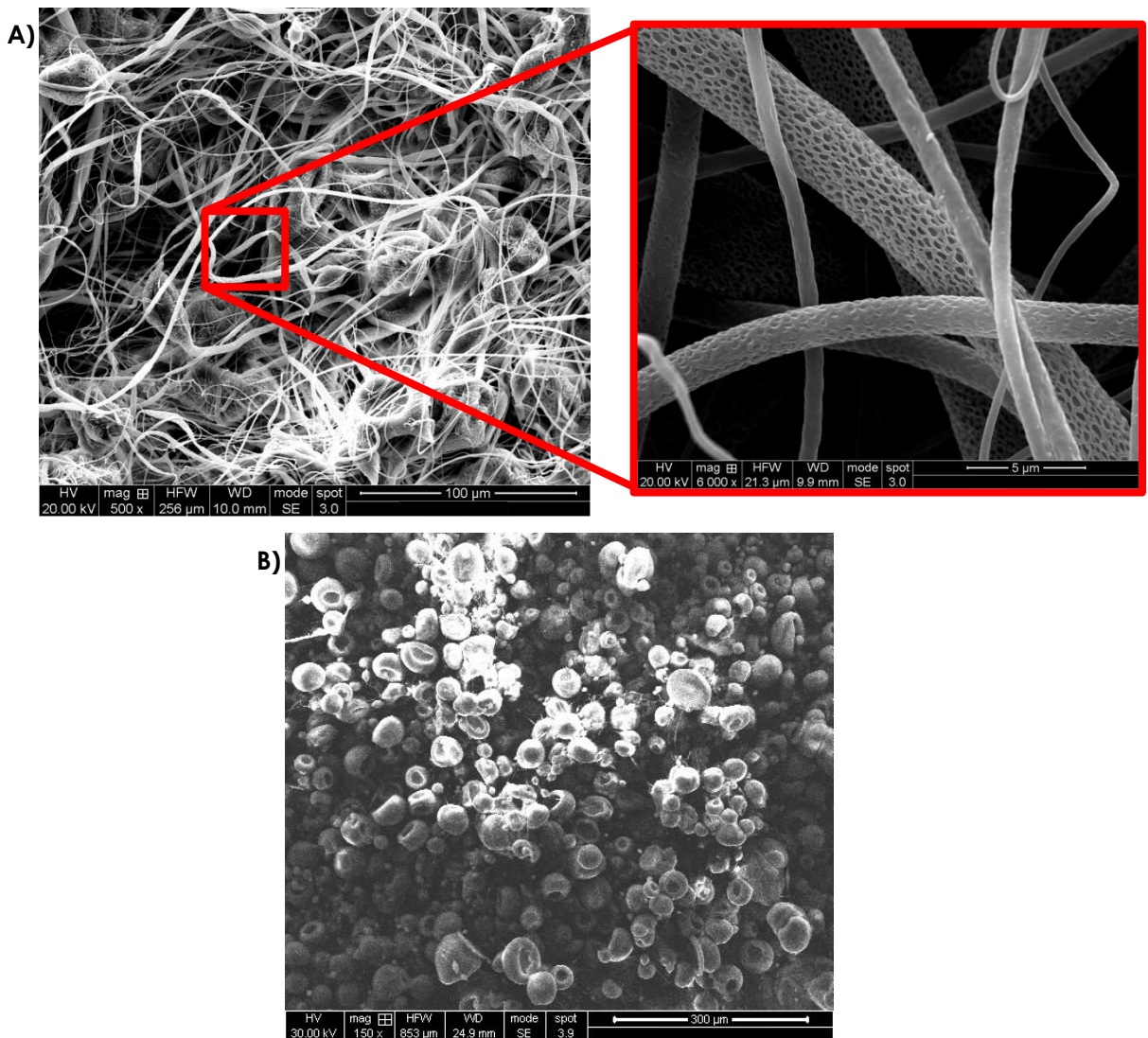
Per la preparazione degli scaffold fibrillari di PBS sono state preparate soluzioni al 15% in solo diclorometano o miscela diclorometano/clorofornio (7:3), ottenendo, quindi, mediante elettrospinning, scaffold denominati rispettivamente della serie A e della serie B, aventi comunque aspetto anagolo (**Fig. 76**).



**Figura 76. Fotografia degli scaffold di PBS ottenuti mediante elettrospinning**

Nonostante l'aspetto degli scaffold della serie A e della serie B risulti analogo, tuttavia già dopo la loro preparazione è stato possibile valutare qualitativamente delle differenze in termini di rigidità, flessibilità ed elasticità. In particolare gli scaffold della serie A risultano molto più morbidi, elastici e flessibili di quelli della serie B.

La differenza effettiva tra i due materiali ottenuti è stata dimostrata dalle analisi SEM. Infatti, in **Fig. 77** è possibile osservare che il processo di elettrospinning del PBS comporta la formazione di un filo di perle rade nel caso della serie A (**pannello A**) e molto più fitte nel caso della serie B (**pannello B**). È evidente, quindi, che la formazione di tali perle conferisca maggiore rigidità allo scaffold finale.



**Figura 77. Immagini SEM degli scaffold ottenuti: A) scaffold della serie A con relativo ingrandimento e B) scaffold della serie B**

Entrambi gli scaffold ottenuti, ovviamente, mantengono le caratteristiche del PBS e sono, pertanto, estremamente lipofili, al punto da non risultare bagnabili. Tal quali, quindi, non sarebbero di alcuna utilità per raggiungere gli obiettivi prefissati ed è stato quindi necessario funzionalizzarli opportunamente.

Al fine di modificare le caratteristiche superficiali degli scaffold rendendoli bagnabili in prima istanza ed inoltre probabilmente compatibili nonché somministrabili, è stato deciso di graftare la superficie del materiale con opportuni biopolimeri quali l'inulina (INU), il PHEA e l'eparina (EPA). L'INU ed il PHEA sono stati scelti in quanto, come precedentemente descritto, si tratta di polimeri idrosolubili, mucoadesivi, biocompatibili, biodegradabili/bioeliminabili nonché facilmente processabili. Anche l'eparina è un'opportuno polimero naturale a struttura polisaccaridica. Si tratta di un glicosamminoglicano altamente solforato, mucoadesivo, biocompatibile e facilmente processabile dotato di intrinseche proprietà farmacologiche e, quindi, spesso impiegato come anticoagulante. Studi di letteratura hanno inoltre dimostrato l'efficacia dell'eparina, da sola o in combinazione con i corticosteroidi, nel ridurre la neoangiogenesi (*Tomida D et al. 2011; Michels R et al. 2012*).

Per ottenere il grafting progettato è necessario introdurre sulla superficie degli scaffold dei gruppi reattivi opportuni.

A tal fine, si è ricorsi ad una funzionalizzazione plasma assistita, trattando opportunamente lo scaffold ottenuto con plasma di N<sub>2</sub> (**Fig. 78**). Questo comporta l'inserimento di gruppi amminici random in grado di reagire con i polimeri scelti comportando la formazione di un legame covalente.





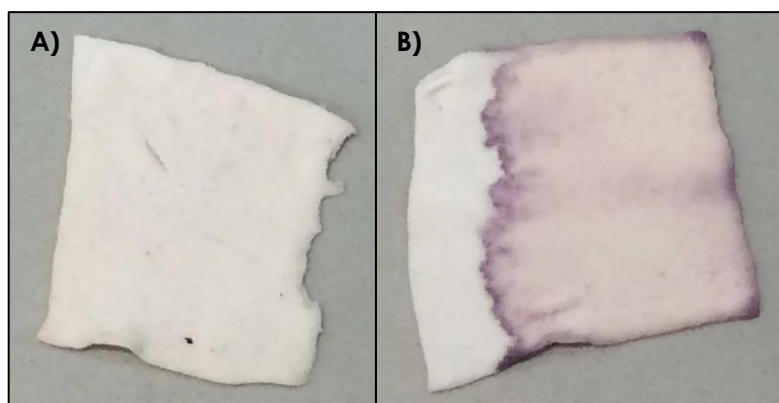
**Figura 78. Attivazione del PBS con plasma di N<sub>2</sub> e successiva reazione tra lo scaffold attivato al plasma ed INU, PHEA ed EPA previamente attivati**

Lo scaffold così attivato è stato quindi immediatamente immerso in una soluzione di polimero previamente attivato (vedi paragrafo 3.2.4.4). La reazione in eterofase tra scaffold e biopolimeri è stata, quindi, lasciata a reagire a 24 h a 40°C (**Fig. 78**).

Il primo step di caratterizzazione è consistito nella valutazione qualitativa dell'effettivo inserimento dei gruppi amminici sulla superficie dello scaffold a seguito di trattamento al plasma, mediante saggio alla ninidrina. Questa valutazione, sebbene solo qualitativa, è stata indispensabile per selezionare le condizioni operative di trattamento al plasma più opportune.

La ninidrina è una molecola in grado di reagire con i gruppi amminici formando un composto di colore viola. Bagnando, quindi, la superficie dello scaffold subito dopo attivazione al plasma con una soluzione di ninidrina è possibile vedere la comparsa di una colorazione violacea imputabile alla presenza di gruppi amminici superficiali, cosa che, invece, non si osserva trattando allo stesso modo una porzione di scaffold che non ha prima subito attivazione al plasma. Quanto detto è osservabile in **Fig. 79** dove troviamo nel **pannello A** la foto dello scaffold non trattato al plasma ma trattato con ninidrina e nel **pannello B** la foto dello scaffold che ha subito entrambi i trattamenti. In quest'ultimo caso il trattamento con ninidrina non è stato completo ma solo parziale poiché se la colorazione non fosse risultata molto intensa, così facendo sarebbe comunque stato possibile osservare

una differenza di colore tra la porzione di scaffold non trattata e quella trattata con ninidrina.



**Figura 79. A) Porzione di scaffold non trattato al plasma ma sottoposto al trattamento con ninidrina e B) porzione di scaffolds trattata in maniera consecuzionale al plasma e con la ninidrina**

Gli scaffold funzionalizzati ottenuti sono stati denominati PBS-p-INU, PBS-p-PHEA e PBS-p-EPA sia della serie A che della serie B. Da una prima valutazione qualitativa è stato possibile osservare che dopo trattamento al plasma e successiva funzionalizzazione gli scaffold della serie B si irrigidiscono ulteriormente e, talvolta si spezzano. Pertanto gli scaffold della serie B sono stati esclusi dai seguenti studi in quanto non rispondono ai requisiti richiesti in termini di elasticità e morbidezza, per l'inserimento nel fornice congiuntivale.

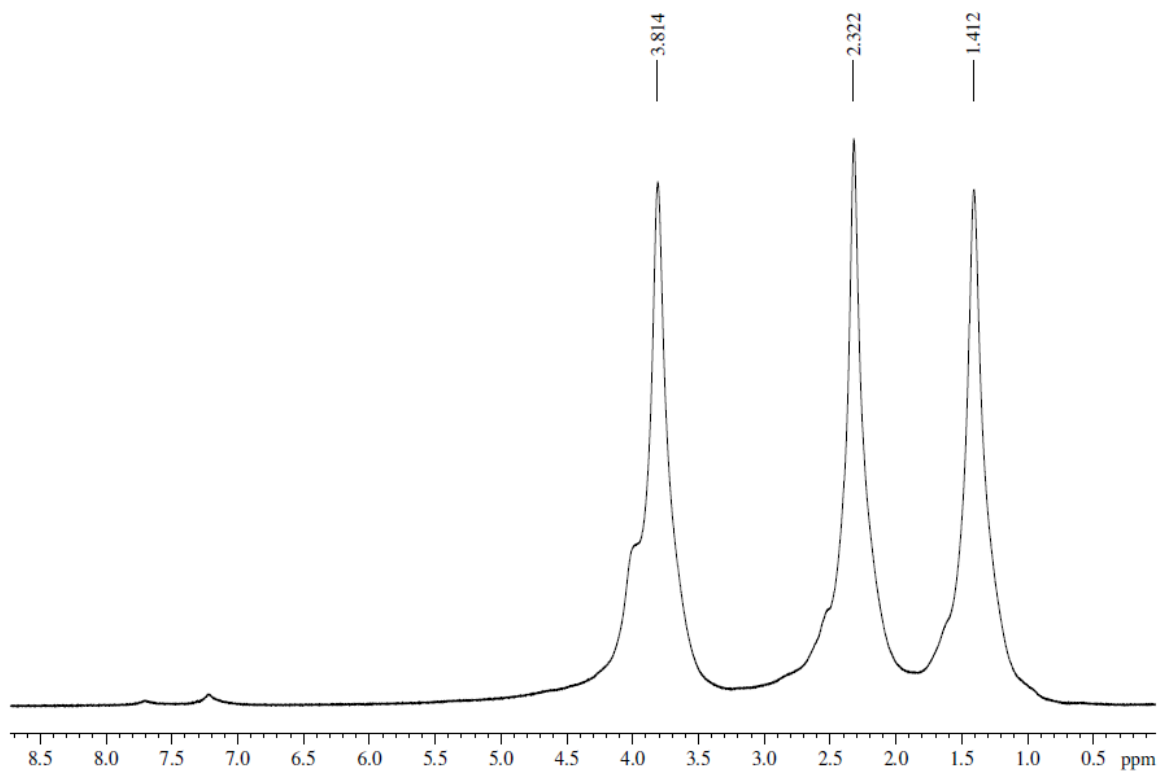
Gli scaffold funzionalizzati selezionati sono stati, quindi, sottoposti ad analisi spettroscopica per valutare l'effettivo grafting con i 3 polimeri scelti.

Le analisi ATRFT-IR non consentono di apprezzare la funzionalizzazione in INU, PHEA ed EPA in quanto, probabilmente, i segnali dei suddetti polimeri risultano poco intensi in quanto il grafting è solo superficiale e non di bulk e, dunque, la loro presenza è mascherata dai segnali del PBS. Di conseguenza i dati IR non sono stati riportati.

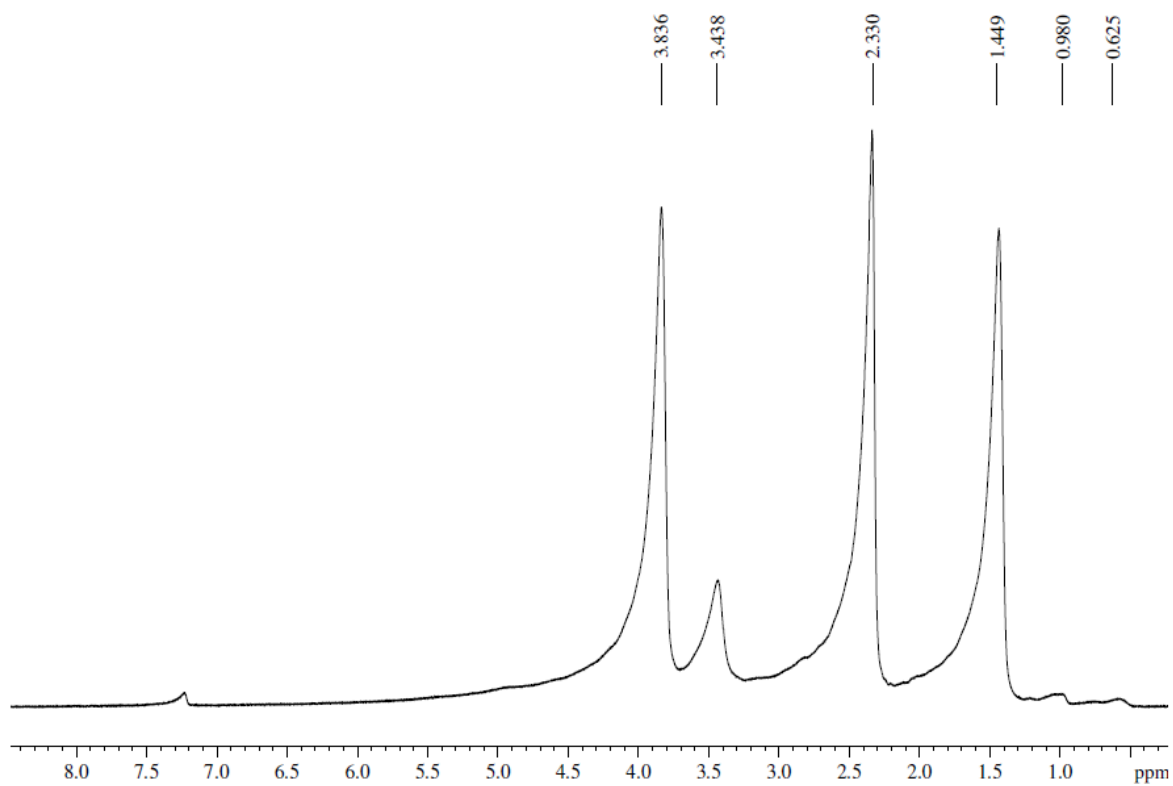
Tuttavia buoni risultati sono stati ottenuti mediante le analisi  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  che, come illustrato nella sezione sperimentale, consentono effettivamente di valutare l'avvenuta funzionalizzazione.

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono riportati in **Fig. 80, 81, 82 e 83** rispettivamente per il PBS, il PBS-p-INU, il PBS-p-PHEA ed il PBS-p-EPA. Come è possibile osservare, la comparsa di nuovi picchi rispetto a quelli osservati per il solo PBS, conferma l'effettivo grafting con tutti e 3 i biopolimeri utilizzati.

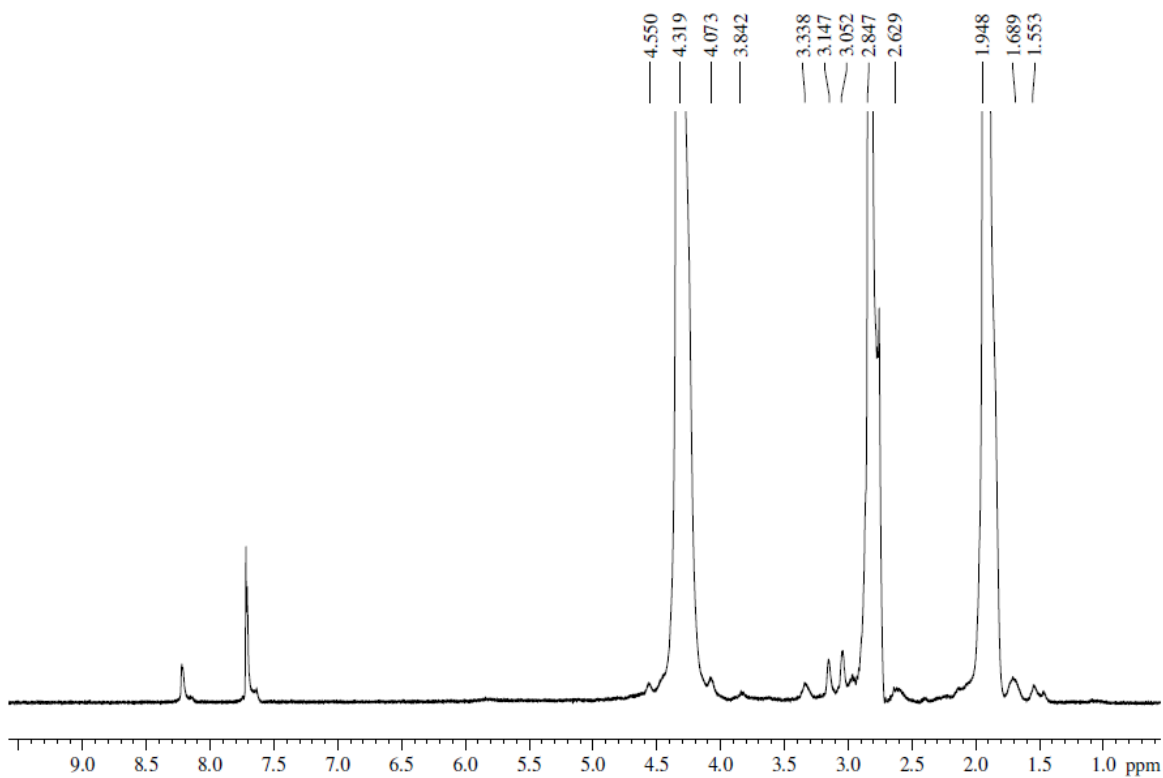




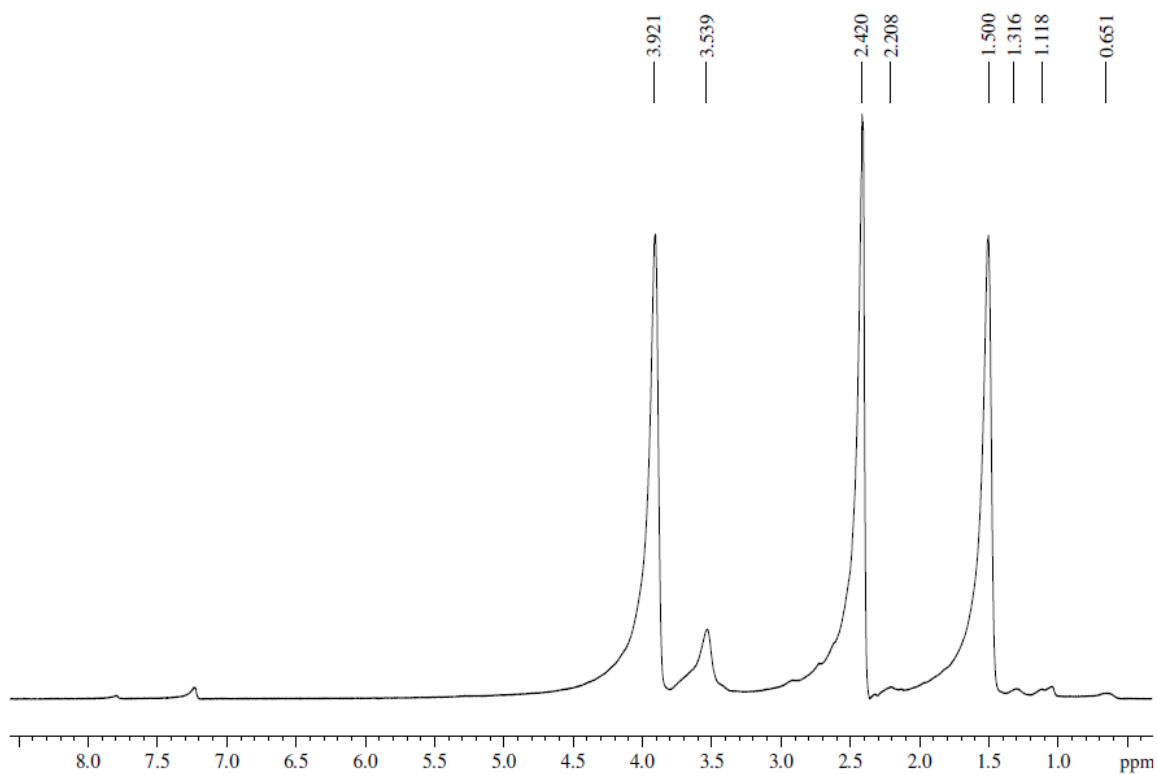
**Figura 80. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS**



**Figura 81. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS-p-INU**

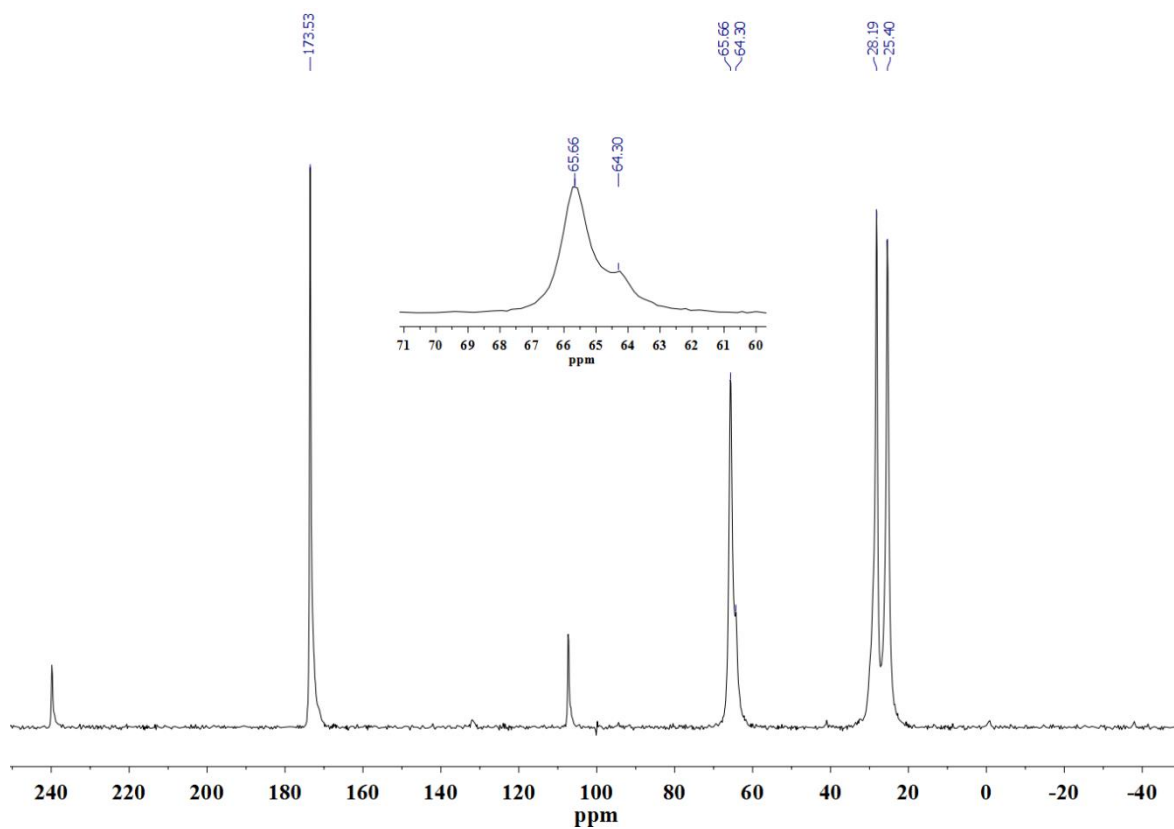


**Figura 82. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS-p-PHEA**



**Figura 83. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS-p-EPA**

Dalle analisi  $^{13}\text{C}$ -NMR (**Fig. 84, 85, 86 e 87**) la funzionalizzazione chimica con i 3 polimeri risulta meno evidente. Si osserva, tuttavia, una variazione della morfologia dei picchi a circa 64 e 65 ppm, nonché un lieve shift, compatibili, secondo letteratura, con una variazione della cristallinità superficiale del materiale legata alla funzionalizzazione dello stesso (*Kuwabara K et al. 2002; Caruso F et al. 2011*).



**Figura 84.**  $^{13}\text{C}$ -NMR del PBS

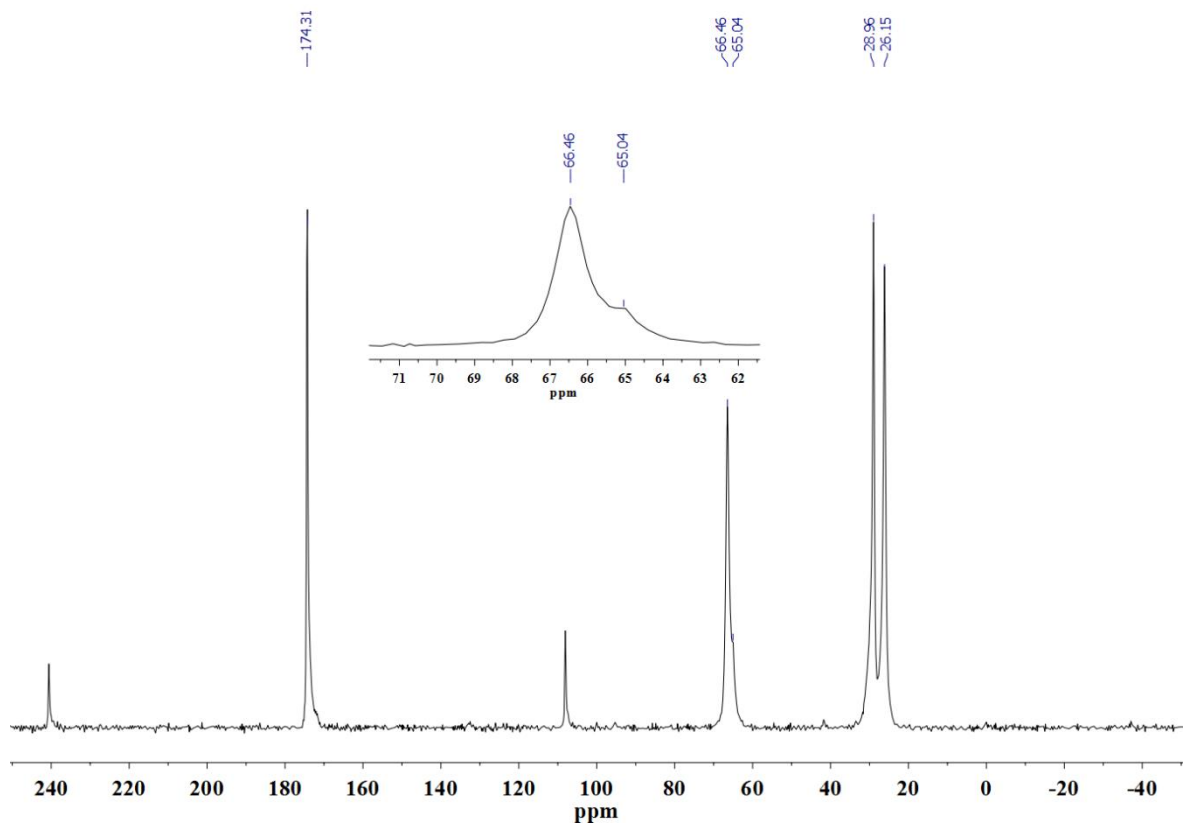


Figura 85.  $^{13}\text{C}$ -NMR del PBS-p-INU

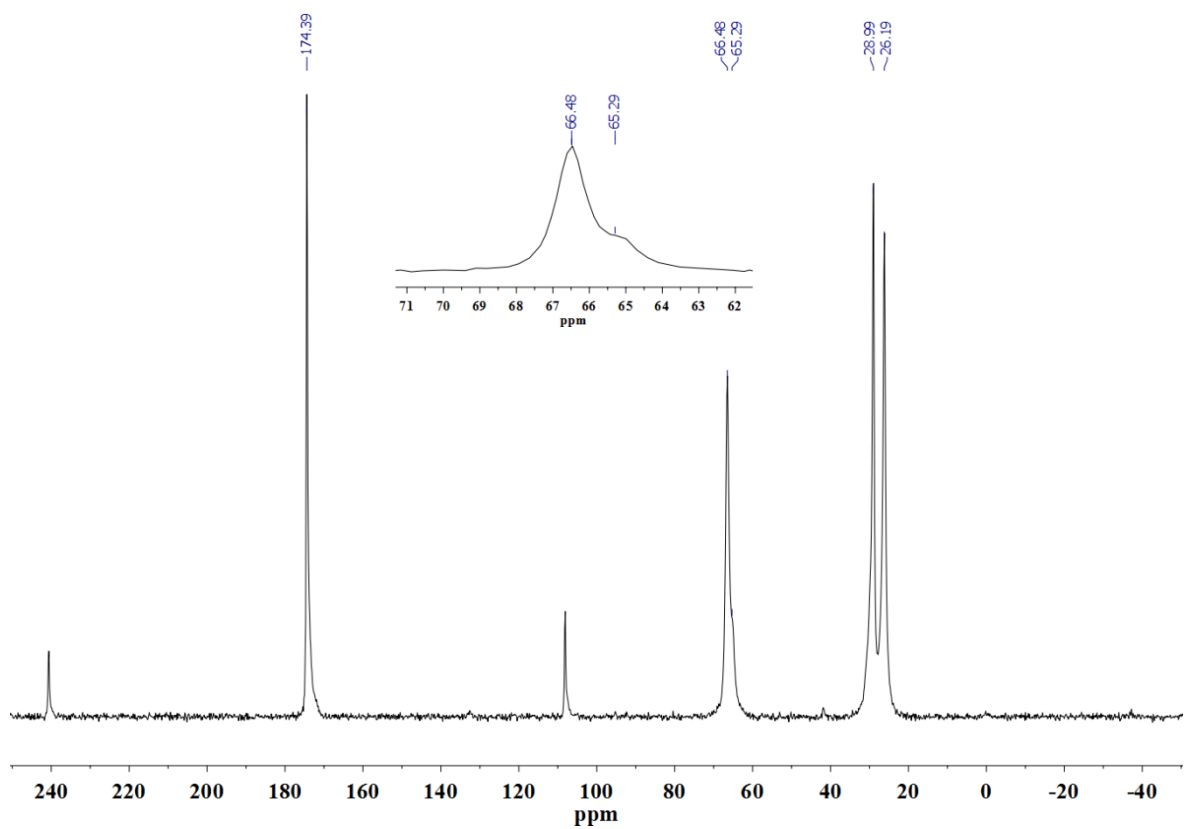
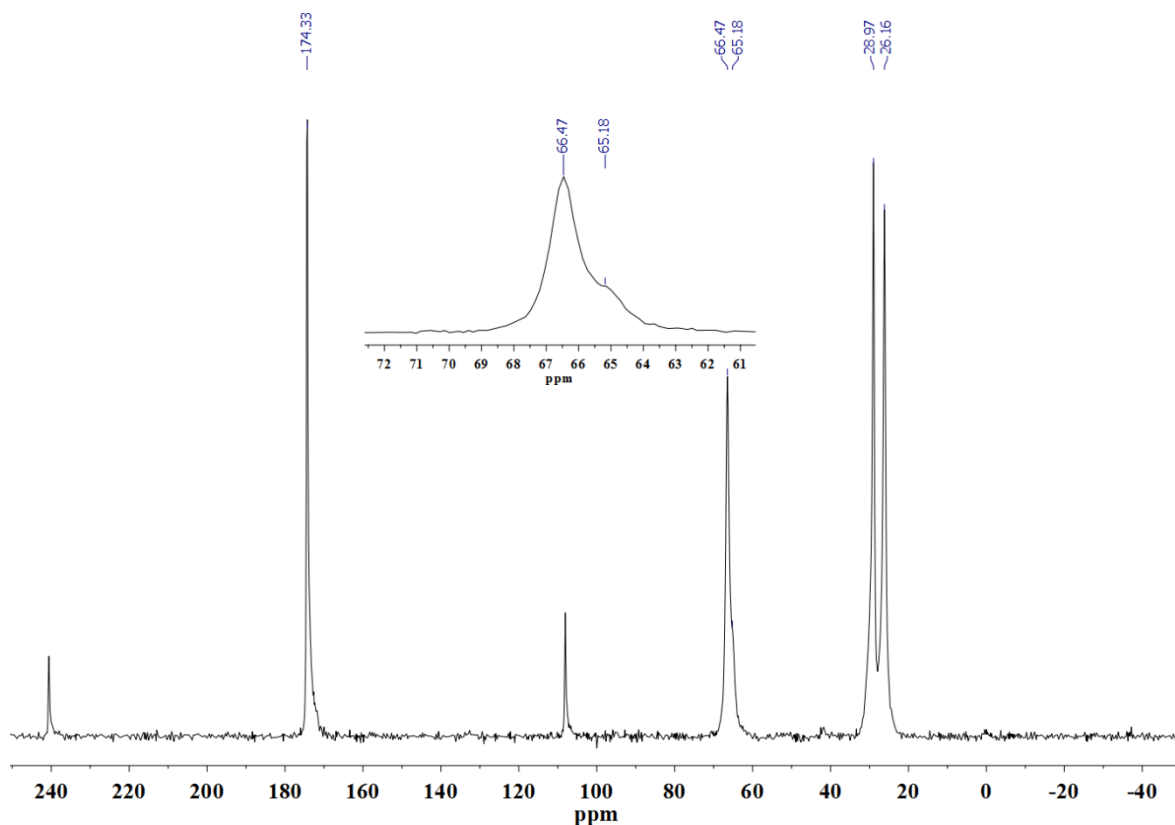


Figura 86.  $^{13}\text{C}$ -NMR del PBS-p-PHEA

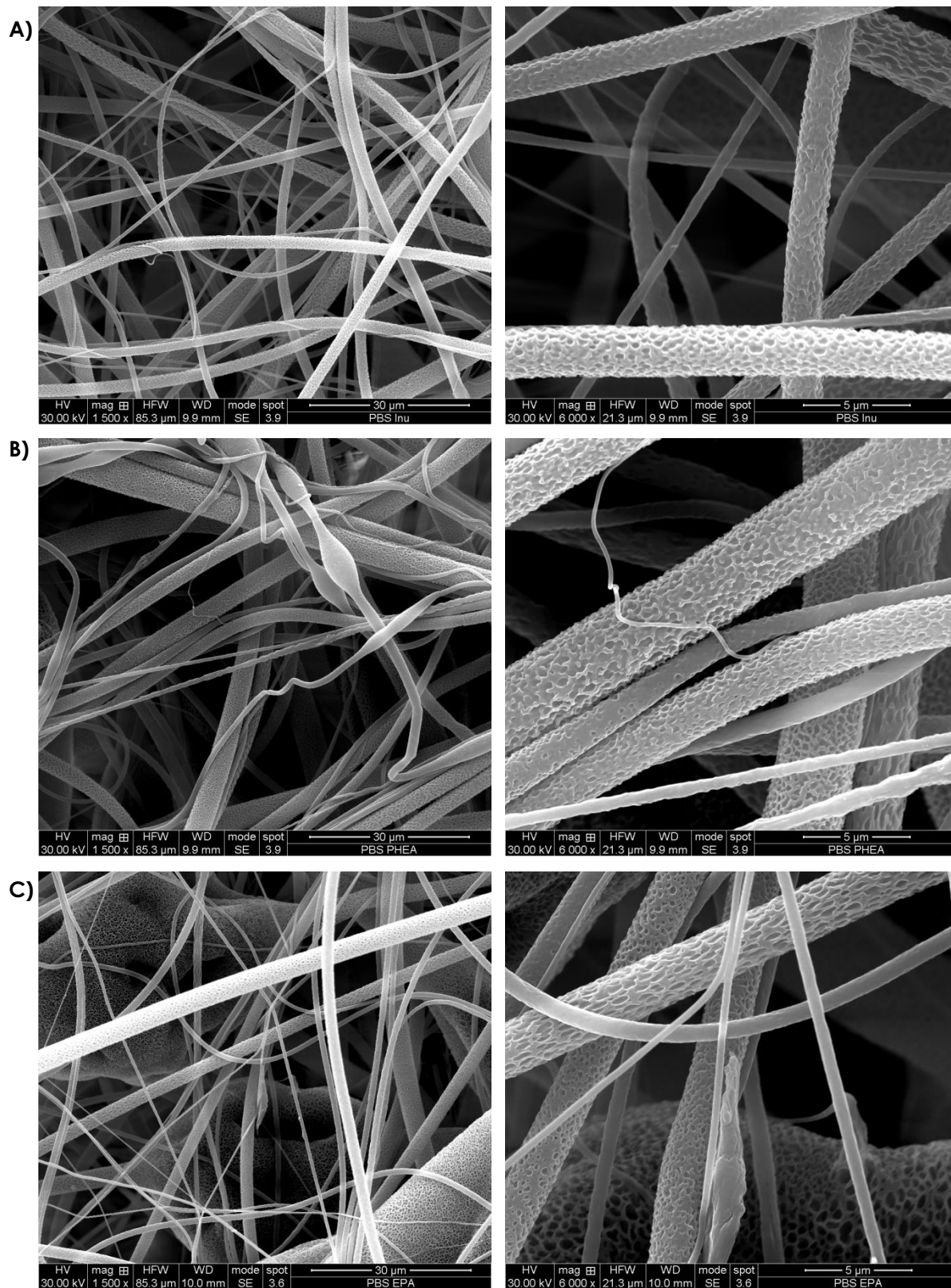


**Figura 87.**  $^{13}\text{C}$ -NMR del PBS-p-EPA

Tutti gli scaffold sono stati, quindi, sottoposti ad analisi SEM al fine di osservare non solo la morfologia delle fibre ma anche se il trattamento al plasma e la successiva funzionalizzazione comportassero alterazioni. In tal senso è stata analizzata anche una porzione di solo PBS trattata al plasma ma non funzionalizzata.

Come illustrano le immagini SEM in **Fig. 88** tutti gli scaffold mostrano fibre e perle di simile morfologia e non risultano alterazioni legate al trattamento con plasma di  $\text{N}_2$  ed alla funzionalizzazione chimica. Agli ingrandimenti riportati non è possibile vedere bene la morfologia delle sfere che, comunque, in alcune immagini sono intuibili.

Contestualmente all'acquisizione delle immagini SEM i campioni sono stati sottoposti ad analisi elementare. I risultati riportati in **Tabella 14** mostrano le percentuali in peso di C, O ed N ritrovate nelle porzioni di scaffold analizzate. Come è possibile osservare, all'analisi elementare è possibile osservare l'azoto solo per gli scaffold che hanno subito attivazione al plasma e successiva funzionalizzazione, confermando ulteriormente l'ottenimento dei prodotti di reazione desiderati.



**Figura 88. Immagini SEM di A) PBS-p-INU, B) PBS-p-PHEA e C) PBS-p-EPA**

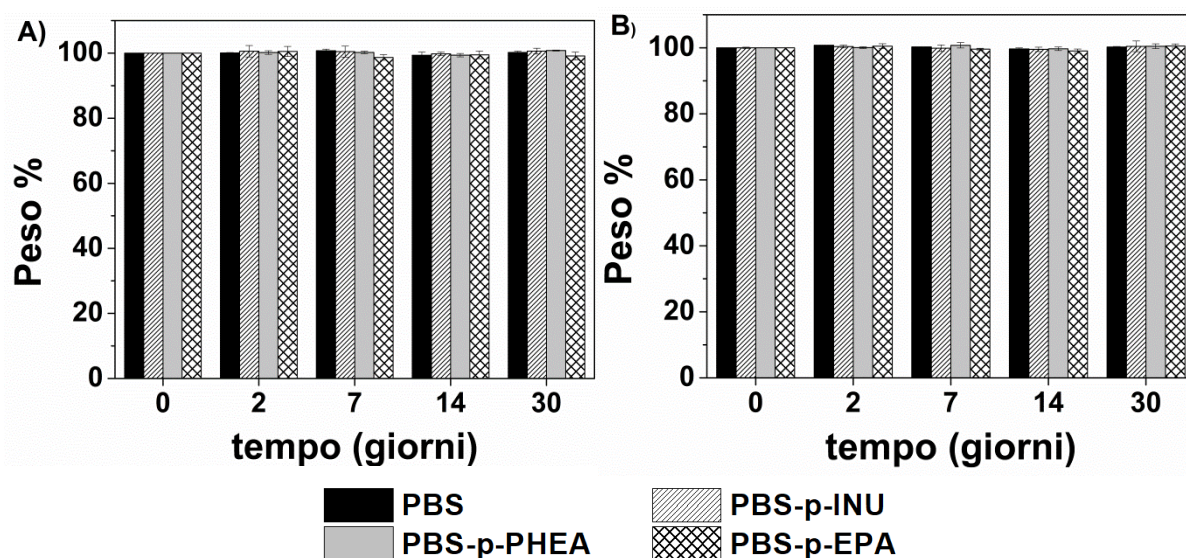
**Tabella 14. Percentuale in peso di C, O ed N misurata attraverso analisi elementare per i 4 scaffold**

	Peso % C	Peso % O	Peso % N
<b>PBS</b>	<b>67.47</b>	<b>32.53</b>	<b>-</b>
<b>PBS-p-INU</b>	<b>65.12</b>	<b>29.75</b>	<b>5.12</b>
<b>PBS-p-PHEA</b>	<b>65.47</b>	<b>30.45</b>	<b>4.07</b>
<b>PBS-p-EPA</b>	<b>66.76</b>	<b>30.84</b>	<b>2.40</b>

I successivi step di caratterizzazione degli scaffold ottenuti sono consistiti nella valutazione della degradazione e del grado di swelling a pH fisiologico sia in DPBS pH 7.4 (mimante i fluidi fisiologici) che in HEPES pH 7.4 (mimante i fluidi oculari) nonché nella valutazione del carattere mucoadesivo.

Questi 3 parametri risultano molto importanti nella caratterizzazione di un inserto oftalmico in quanto:

- ☉ Dalla stabilità nei confronti dell'idrolisi chimica dipenderà la classificazione in inserti biodegradabili (es. Lacrisert) o non biodegradabili (es. Ocusert). Questo è particolarmente vero in ambiente oculare e non necessita di essere supportato da ulteriori prove di degradazione enzimatica in quanto la concentrazione di esterasi nel fluido lacrimale è estremamente bassa,
- ☉ Dal grado di swelling dipende il comfort della formulazione. Infatti, inserire nel sacco congiuntivale un inserto che richiama molta acqua rigonfiando causa fastidio al paziente, riducendone la compliance,
- ☉ Per un inserto oftalmico, che deve rimanere in loco per tempi protratti, la mucoadesione non solo è un parametro fondamentale, ma addirittura essenziale.



**Figura 89. Profili di degradazione chimica dei 4 scaffold in  
A) DPBS pH 7.4 e B) HEPES pH 7.4 fino a 30 giorni**

Come mostrano i grafici in **Fig. 89**, tutti e 4 gli scaffold non subiscono idrolisi nei due sistemi tamponi considerati fino a 30 giorni.

I risultati dei test di swelling, illustrati in **Tabella 15**, sono stati calcolati applicando la seguente equazione:

$$Sw \% = \frac{Ws - Wd}{Wd}$$

dove Sw % è la percentuale di swelling, Ws è il peso del campione swellato e Wd è il peso del campione del secco.

Come è possibile osservare dai dati riportati in **Tabella 15**, tutti gli scaffold, di fatto, non vanno incontro a fenomeni di swelling ( $Sw\% < 0.1\%$  sempre).

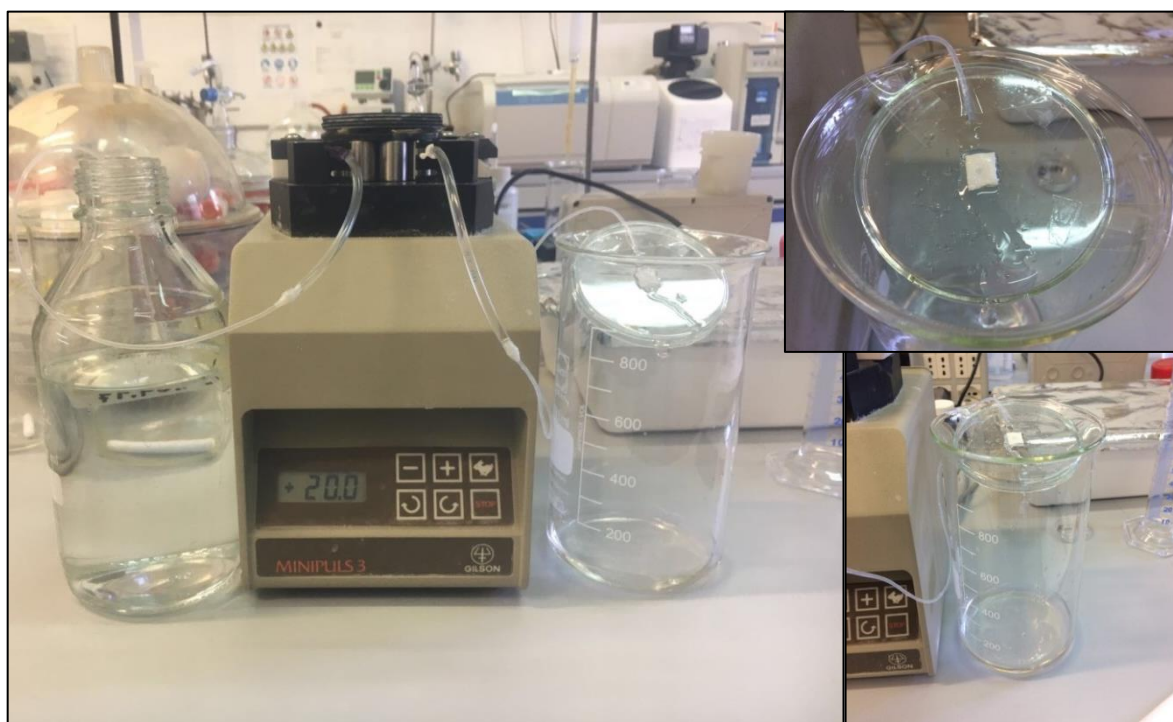
**Tabella 15. Swelling % calcolato per tutti gli scaffold dopo 2 h, 2 giorni, 7 giorni e 15 giorni di incubazione in tampone HEPES pH 7.4**

	Sw % (2 h)	Sw % (2 gg)	Sw % (7 gg)	Sw % (15 gg)
PBS	0.0419 ± 0.0038	0.0186 ± 0.0081	0.0984 ± 0.0020	0.0620 ± 0.0051
PBS-p-INU	0.0396 ± 0.0026	0.0133 ± 0.0019	0.0083 ± 0.0024	0.0049 ± 0.0018
PBS-p-PHEA	0.0291 ± 0.0014	0.0133 ± 0.0007	0.0155 ± 0.0018	0.0033 ± 0.0013
PBS-p-EPA	0.0073 ± 0.0020	0.0083 ± 0.0019	0.0242 ± 0.0015	0.0072 ± 0.0015



Per quanto riguarda i test di mucoadesione sono stati condotti degli studi utilizzando una tecnica nota in letteratura che è stata opportunamente modificata (Licciardi M et al. 2012).

A tal fine sono stati analizzati dei quadratini di scaffold di circa 1x1 cm, accuratamente pesati (**Peso A, Fig. 91**) e, quindi, immersi in una soluzione di mucina allo 0.1% per 2 h a 37°C. Trascorso tale tempo gli scaffold sono stati prelevati e seccati sotto vuoto, quindi nuovamente pesati (**Peso B, Fig. 91**). Il primo dato ottenuto in termini di differenza di peso indica l'attitudine degli scaffold a interagire con la mucina. Gli scaffold imbibiti di mucina sono stati lavati con flusso continuo di DPBS pH 7.4 10 ml/min per 5 minuti (mimante fino a circa 50 giorni di lacrimazione), utilizzando il sistema illustrato in **Fig. 90**. Al termine del trattamento gli scaffold sono stati nuovamente seccati e, quindi, pesati (**Peso C, Fig. 91**).

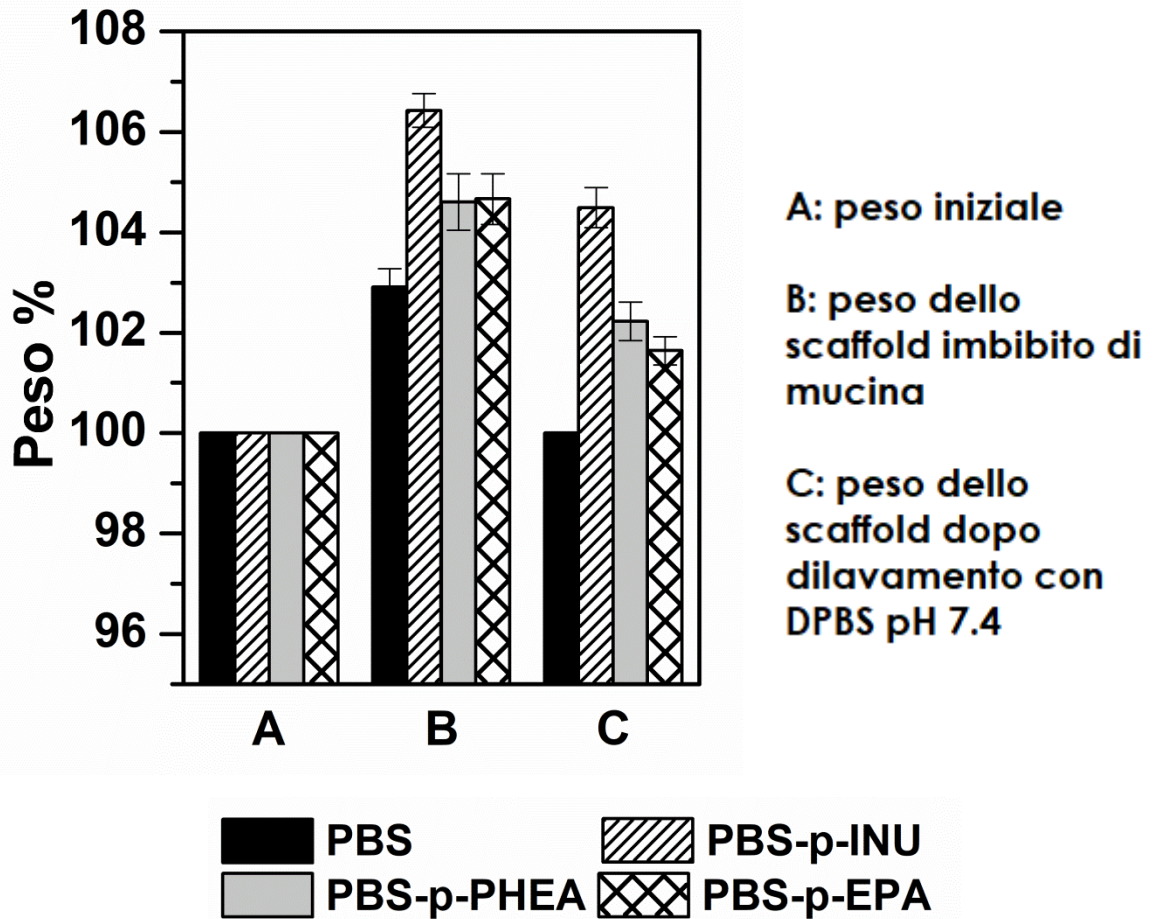


**Figura 90. Set up del sistema di dilavamento in continuo degli scaffold durante il test di mucoadesione**

I risultati (**Fig. 91**) sono espressi in termini di variazioni percentuali in peso rispetto al peso originario della porzione di scaffold analizzata.

Come possiamo osservare, tutti gli scaffold dopo imbibizione trattengono una certa quantità di mucina, tuttavia a seguito del dilavamento gli scaffold di solo PBS ritornano al

loro peso originale in quanto non sono in grado di intraprendere interazioni salde e durature con le catene di mucina.



**Figura 91. Variazioni percentuali del peso degli scaffold nel test di mucoadesione**

Gli scaffold funzionalizzati con INU, PHEA ed EPA, invece, sono in grado, seppure con differente entità ed importanza, di trattenere parte della mucina anche a seguito del dilavamento dimostrando, quindi, il loro carattere mucoadesivo. In particolare, in tal senso, lo scaffold PBS-p-INU sembra il migliore non solo perché già dopo l’imbibizione è in grado di trattenere maggiori quantità di mucina, ma anche e soprattutto perché riesce a trattenerla efficacemente dopo il dilavamento.

I risultati finora ottenuti in termini di caratterizzazione del materiale di partenza sono, quindi, estremamente promettenti, in quanto:

- ☉ L'assenza di degradazione chimica degli scaffold nei tamponi scelti potrebbe essere indice di una più controllabile e protratta cinetica di rilascio di un eventuale farmaco in essi incorporato,
- ☉ L'assenza di rilevanti fenomeno di swelling comporta un potenziale aumento della compliance del paziente in quanto, a seguito dell'inserimento dell'inserto nel fornice congiuntivale lo stesso non rigonfia, cosa che creerebbe discomfort,
- ☉ L'esistenza di una interazione mucoadesiva è essenziale sia in termini di compliance che di efficacia terapeutica poiché consentirà all'inserto di rimanere saldamente ancorato al sito di somministrazione senza spostarsi (cosa che potrebbe causare alterazioni della visione) o essere perso.

In seguito, con l'ausilio di un cutter, sono stati ricavati dischetti di tutti gli scaffold (**Fig. 92**) impiegati per il caricamento con il triamcinolone acetone e per gli studi successivi.

La quantità di farmaco incorporata è stata determinata mediante estrazione in solvente organico e successiva analisi HPLC ed espressa sia in termini di quantità di farmaco (mg) per unità di superficie (cm<sup>2</sup>) che in termini di drug loading % ossia come quantità di farmaco (mg) incorporata all'interno di 100 mg di scaffold carico (**Tabella 16**). Tuttavia, è chiaro che in termini di DL% ci siano maggiori differenze in quanto dischetti di scaffold aventi lo stesso diametro non hanno necessariamente lo stesso peso (quelli funzionalizzati ovviamente peseranno di più di quello non funzionalizzato, ma non in maniera uguale tra di loro).



**Figura 92. Ottenimento dei dischetti di scaffold con l'ausilio di un cutter**

Tutti gli scaffold prodotti risultano comunque, in grado di incorporare buone quantità di TA.

**Tabella 16. Quantità di TA incorporata negli scaffold ed espressa in termini di mg/cm<sup>2</sup> e DL%**

	mg/cm <sup>2</sup>	DL% (p/p)
<b>PBS/TA</b>	<b>2.113 ± 0.099</b>	<b>10.13 ± 0.85</b>
<b>PBS-p-EPA/TA</b>	<b>2.104 ± 0.478</b>	<b>8.66 ± 0.36</b>
<b>PBS-p-INU/TA</b>	<b>2.242 ± 0.123</b>	<b>8.78 ± 0.32</b>
<b>PBS-p-PHEA/TA</b>	<b>2.276 ± 0.038</b>	<b>8.85 ± 0.40</b>

È stato, quindi, valutato il profilo di rilascio del TA da tutti gli scaffold carichi. A tal fine dischetti di scaffold carichi di farmaco sono stati immersi in HEPES pH 7.4 le cui aliquote sono state analizzate ai tempi prestabiliti al fine di quantificare il TA rilasciato.

I risultati sono mostrati in **Fig. 93**, fino a 30 giorni (**pannello A**) con i dettagli fino a 15 giorni (**pannello B**), 7 giorni (**pannello C**) e le prime 8 ore (**pannello D**). Possiamo osservare che il TA è efficacemente rilasciato da tutti i sistemi, ma, ovviamente, la cinetica di rilascio è più lenta per lo scaffold PBS/TA in quanto tale scaffold, non essendo stato funzionalizzato, rimane più idrofobico e, quindi, maggiormente affine per il farmaco. I profili di rilascio osserva per gli scaffold PBS-p-INU/TA e PBS-p-EPA/TA sono analoghi e mostrano un raggiungimento del plateau dopo 7 giorni di esperimento, mentre per lo scaffold PBS-p-PHEA/TA questo si raggiunge al decimo giorno.

Va considerato che, presumibilmente, la velocità di rilascio è legata fortemente alla solubilità del TA nel mezzo esterno acquoso che, come già detto, è molto bassa. Per questo esperimento, però, il rilascio è stato promosso ed in qualche modo forzato ponendo lo scaffold in un grande volume di mezzo esterno e facendo numerosi prelievi immediatamente rimpiazzati da tampone fresco per mantenere le condizioni sink del sistema. È probabile che, quindi, se lo scaffold fosse somministrato in vivo, a causa del piccolo volume del film lacrimale il rilascio sia ancora più lento e protratto.

Questa supposizione è stata confermata da uno dei dati ricavati dai test di permeazione transcorneale *ex vivo* con celle di Franz e cornee bovine. Per gli esperimenti di permeazione, infatti, si è proceduto ponendo nel compartimento donatore un dischetto di scaffold carico di TA e bagnandolo con un piccolo volume di HEPES pH 7.4. Al termine del test, oltre a prelevare la cornea al fine di estrarne il farmaco intrappolato, sono stati anche prelevati lo scaffold (rimasto, ovviamente, perfettamente integro) e il piccolo volume di HEPES pH 7.4 che bagnava lo scaffold mimando il fluido lacrimale oculare.

Quest'ultimo è stato analizzato al fine di calcolare la concentrazione di TA. È stato osservato che la concentrazione reale di TA nel sistema alle 6 h è, in realtà, inferiore rispetto a quella teorica calcolata utilizzando il dato di rilascio percentuale a 6 h. Inoltre, sommando questa quantità di TA in soluzione nel tampone HEPES pH 7.4 alla quantità di TA residua nello scaffold più la quantità di farmaco permeata e quella rimasta intrappolata a livello corneale il totale è risultato pari alla quantità inizialmente caricata nello scaffold. Per il calcolo di  $K_p$  e  $K_a$ , quindi, è stata impiegata la concentrazione di farmaco effettiva alle 6 h in quanto di semplice valutazione.



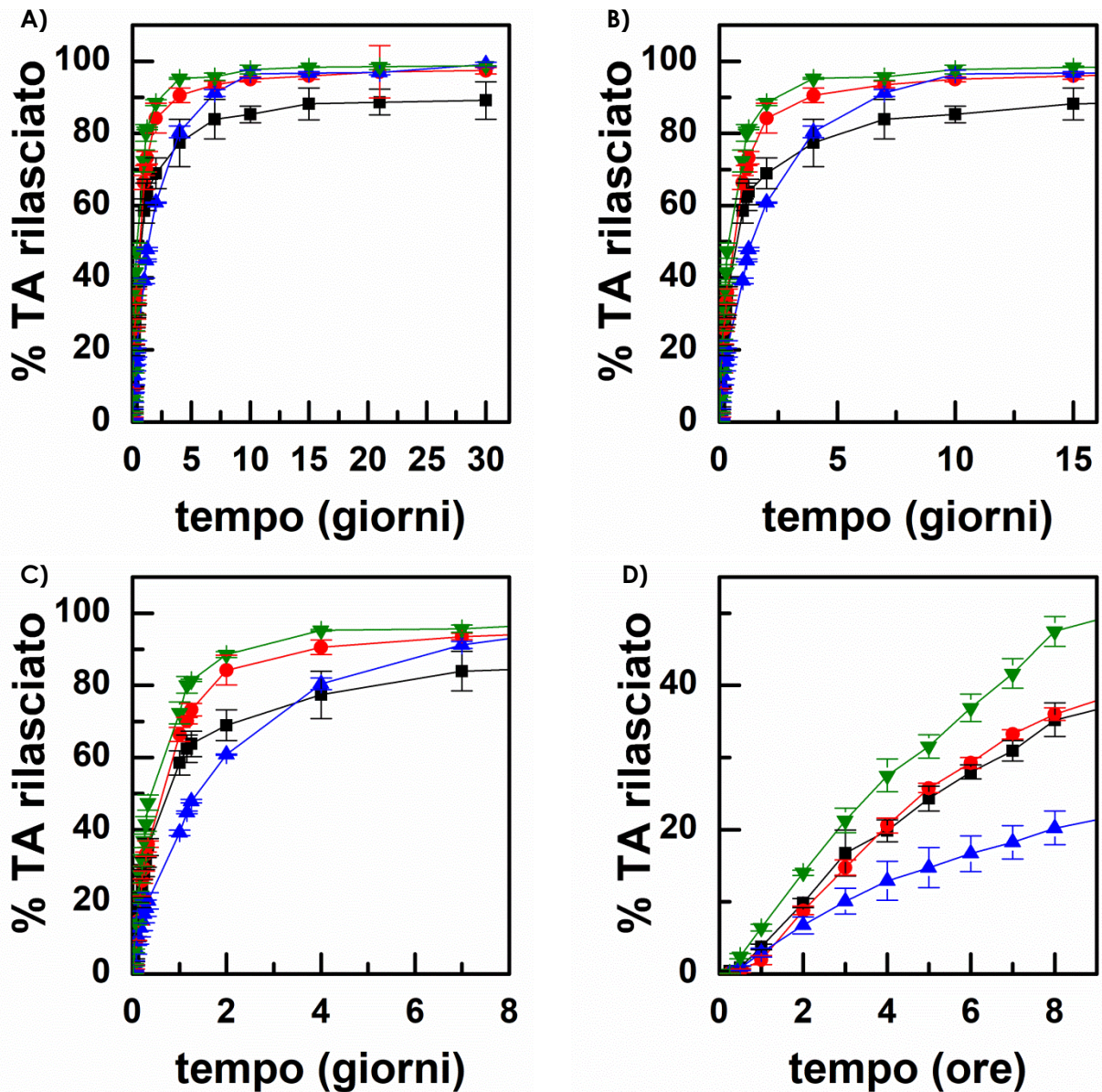
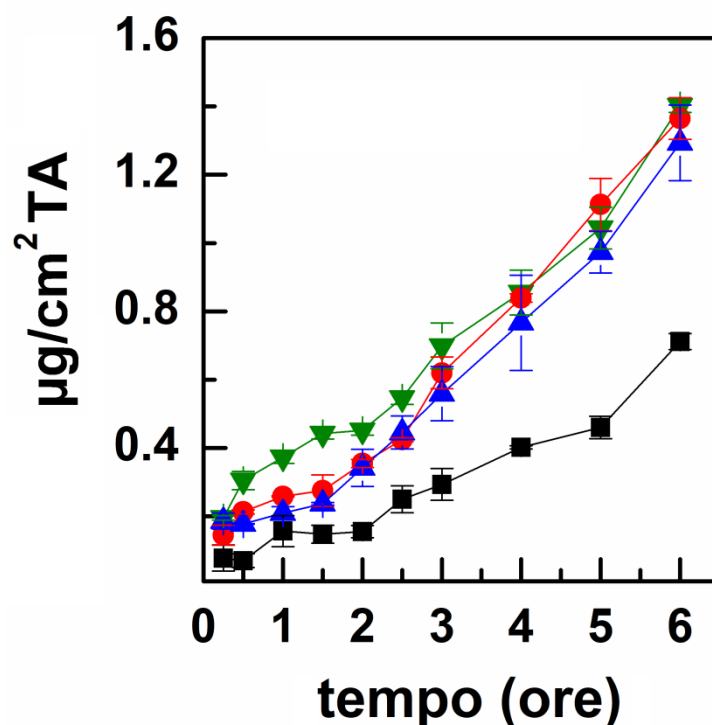


Figura 93. Profilo di rilascio percentuale del TA da PBS/TA (nero), PBS-p-INU/TA (rosso), PBS-p-PHEA/TA (blu) e PBS-p-EPA/TA (verde) in funzione del tempo fino a A) 30 giorni, B) 15 giorni, C) 7 giorni e D) 8 h

I dati di permeazione sono riportati nel grafico in Fig. 94 e mostrano come non ci siano grosse differenze nel profilo di permeazione del TA dopo somministrazione degli scaffold funzionalizzati PBS-p-INU/TA, PBS-p-PHEA/TA e PBA-P-EPA/TA che comportano, in tutti i casi, una permeazione migliore di quella osservata dopo somministrazione dello scaffold non funzionalizzato PBS/TA.



**Figura 94.** Studi di permeazione transcorneale *ex vivo*:  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di TA permeato in funzione del tempo (fino a 6 h) dopo somministrazione di PBS/TA (nero), PBS-p-INU/TA (rosso), PBS-p-PHEA/TA (blu) e PBS-p-EPA/TA (verde)

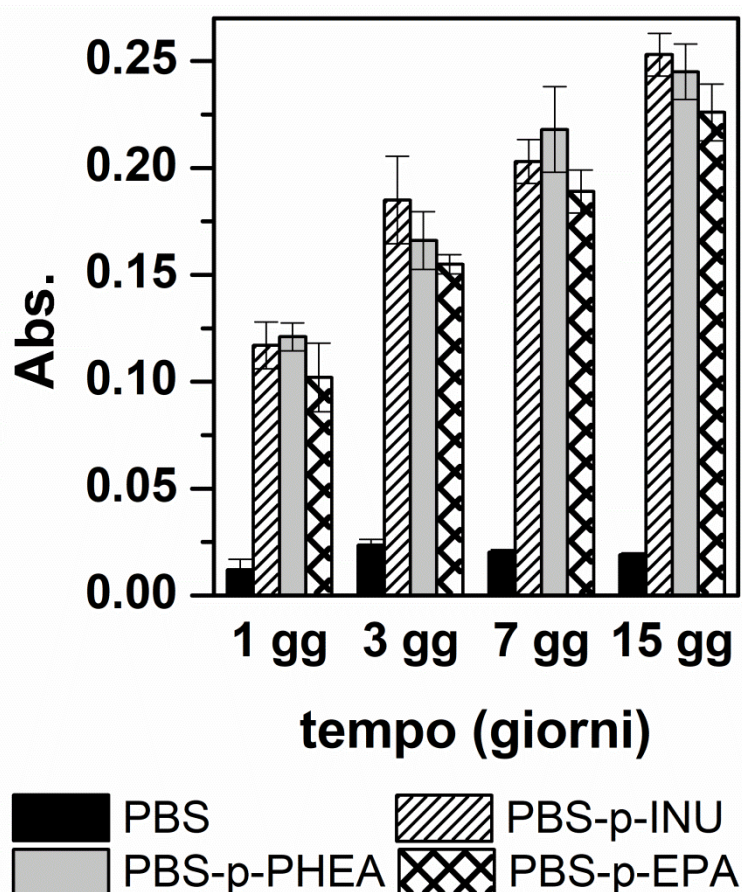
L'elaborazione matematica dei risultati ottenuti ha permesso di calcolare i valori riportati in **Tabella 17** i quali hanno evidenziato come tutti gli scaffold risultino in grado di aumentare notevolmente (più di un ordine di grandezza) i valori sia di  $K_a$  che di  $K_p$ . Inoltre, è evidente che la funzionalizzazione con biopolimeri quali l'INU, il PHEA e l'EPA incrementi ulteriormente ed in maniera importante l'efficacia *enhancer*.

**Tabella 17.** Valori di  $J_s$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $K_p$  (cm/h),  $D_e$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e  $K_a$  (cm)  $\pm$  SD ottenuti dai test di permeazione transcorneale *ex vivo* per il TA, somministrato caricato all'interno degli scaffold

	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ )	$K_p$ (cm/h)	$D_e$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$K_a$ (cm)
TA (soluzione)	$0.033 \pm 0.002$	$0.0013 \pm 0.0001$	$2.285 \pm 0.220$	$0.0457 \pm 0.0014$
PBS/TA	$0.124 \pm 0.012$	$0.0109 \pm 0.0011$	$2.933 \pm 0.152$	$0.2568 \pm 0.0025$
PBS-p-EPA/TA	$0.225 \pm 0.015$	$0.0188 \pm 0.0012$	$4.478 \pm 0.241$	$0.3951 \pm 0.0036$
PBS-p-INU/TA	$0.257 \pm 0.013$	$0.0158 \pm 0.0010$	$4.533 \pm 0.208$	$0.2778 \pm 0.0029$
PBS-p-PHEA/TA	$0.231 \pm 0.016$	$0.0194 \pm 0.0018$	$2.826 \pm 0.163$	$0.2374 \pm 0.0023$

Questo importante risultato va chiaramente integrato con i dati ottenuti precedentemente. È chiaro, infatti che a causa della sua scarsa mucoadesività, il sistema PBS/TA in vivo potrebbe risultare molto meno efficiente anche in termini di permeazione in quanto non sarebbe in grado di rimanere in loco per tutto il tempo necessario al trattamento. Nell'esperimento condotto, invece, il sistema donatore è statico e, anche se si osserva una leggera flottazione dello scaffold PBS/TA, non c'è il rischio che lo scaffold di stacchi completamente dal sistema modello.

I dati ottenuti in termini di aumento della permeazione e penetrazione di farmaco sono ottimali ed anche notevolmente migliori di quelli, già di per sé buoni, ottenuti per le micelle polimeriche. Questo è probabilmente legato al fatto che gli scaffold funzionalizzati sono in grado di aderire immediatamente, completamente e saldamente alla cornea rilasciando il farmaco direttamente vicino alla stessa e promuovendone, di conseguenza la penetrazione e permeazione.



**Figura 95.** Valori di assorbanza misurati a seguito del saggio MTS dopo il trattamento con i 4 scaffold per differenti tempi di incubazione, fino a 15 giorni



L'ultima, importantissima, analisi condotta è consistita nella valutazione della capacità di attecchimento delle HCEpiC sugli scaffold e nella valutazione, quindi, della loro citocompatibilità. Gli esperimenti sono stati condotti seminando le cellule sugli scaffold precedentemente sterilizzati ed imbibiti con mezzo di coltura cellulare e coprendoli, poi, completamente con lo specifico mezzo di coltura cellulare.

A differenti tempi, quindi, è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS. Nel grafico in **Fig. 95** sono riportati i valori di assorbanza misurati dopo il saggio MTS in funzione del tempo di trattamento delle cellule con gli scaffold.

Come si evince, i corneociti umani riescono ad attecchire e, poi, a crescere solo sugli scaffold funzionalizzati PBS-p-INU, PBS-p-PHEA e PBS-p-EPA mentre i risultati degli studi condotti con gli scaffold di PBS non funzionalizzati non sono soddisfacenti e confermano l'iniziale ipotesi che sia necessario funzionalizzare opportunamente lo scaffold di partenza per renderlo migliore (es. conferirgli proprietà mucoadesive) nonché per renderlo citocompatibile. Ancora una volta, lo scaffold funzionalizzato che mostra le migliori caratteristiche è il PBS-p-INU.

In definitiva gli scaffold proposti come inserti oftalmici risultano semplici da preparare e riproducibili. Hanno, inoltre, un opportuno profilo di stabilità in tampone pH 7.4, scarsissimo swelling e ottimale mucoadesione e citocompatibilità. Gli scaffold carichi riescono ad incorporare grosse quantità di TA e a rilasciarlo in un arco abbastanza lungo di tempo *in vitro* che, presumibilmente, potrebbe anche aumentare in vivo. Inoltre sono in grado di aumentare notevolmente sia il  $K_p$  che il  $K_a$  del farmaco scelto attraverso la barriera corneale mostrandosi così potenzialmente utili ed efficaci.



## 5. CONCLUSIONI

*“Solo coloro che possono vedere  
l'invisibile, possono compiere  
l'impossibile!”*

*- Patrick Snow*

Il lavoro di ricerca svolto durante il percorso di dottorato ha portato, in generale, alla preparazione di numerosi sistemi carrier (micelle polimeriche o inserti oftalmici) che sono risultati idonei allo sviluppo di formulazioni oftalmiche somministrabili per via topica.

Il lavoro di ricerca svolto è suddivisibile in 4 macroaree per le quali, adesso, trarremo singolarmente le dovute conclusioni:

- ☉ Micelle polimeriche a base di inulina per la veicolazione di corticosteroidi,
- ☉ Confronto tra micelle polimeriche a base di inulina o PHEA cariche di imatinib,
- ☉ Valutazione della permeazione di micelle polimeriche a base di inulina in presenza di differenti *enhancer* legati chimicamente o in soluzione,
- ☉ Inserti oftalmici polimerici non bioerodibili per il rilascio protratto di triamcinolone acetoneide.

Il punto di partenza del presente lavoro di dottorato è stato il polisaccaride naturale inulina. Sono stati, inizialmente, opportunamente progettati e sintetizzati due nuovi derivati anfifilici dell'inulina utilizzando, come agente idrofobizzante l'acido retinoico, forma attiva della vitamina A e componente endogeno dell'occhio. Inoltre, uno dei due derivati polimerici è stato opportunamente PEG-ylato. I derivati polimerici ottenuti sono stati ampiamente caratterizzati mediante analisi spettroscopica (UV-VIS, ATRFT-IR, <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR) e hanno dimostrato ottime proprietà di self-assembling in ambiente acquoso. Sono stati quindi utilizzati per la realizzazione di micelle polimeriche cariche di desametasone, triamcinolone e triamcinolone acetoneide. Le micelle preparate sono risultate ottimi candidati per la realizzazione di colliri nella terapia oftalmica in quanto dotate di

tutte le caratteristiche necessarie per un *ocular drug delivery system* di successo. Infatti, i sistemi micellari preparati hanno mostrato dimensioni nanometriche idonee alla via di somministrazione scelta, ottimali valori di potenziale zeta, rilevanti proprietà mucoadesive, egregia stabilità alla conservazione sia sotto forma di polvere liofilizzata che in dispersione in opportuno sistema tampone, ottima citocompatibilità nei confronti di linee cellulari dell'epitelio corneale e dell'epitelio pigmentato retinico sia umano che murino nonché ottimale capacità di interazione ed internalizzazione all'interno delle stesse cellule di interesse. Inoltre le micelle polimeriche sono risultate in grado di incorporare importanti quantità di corticosteroidi e di renderli solubili a concentrazione altrimenti irraggiungibili aumentando, quindi, l'effettiva quota di farmaco disponibile per i fenomeni di assorbimento. Le già ottime caratteristiche dei sistemi prodotti sono inoltre notevolmente incrementate dalla loro capacità di agire da *enhancer* di permeazione e penetrazione transcorneale, come dimostrato sia dagli studi *in vitro* che *ex vivo*. Le micelle di per sé, infatti, sono in grado di attraversare sia un monolayer di cellule dell'epitelio corneale che l'intera struttura cornale. I risultati ottenuti dai test *in vitro* hanno permesso di mettere in evidenza come la presenza delle micelle modifichi il pathway di permeazione dei farmaci scelti impedendone la ritenzione all'interno dei corneociti e favorendone invece l'attraversamento. Tuttavia gli studi *in vitro* si sono dimostrati fallaci nell'evidenziare le differenze tra i sistemi PEG-ylato e non, differenze notevoli che, invece, sono state messe in luce dagli studi di permeazione transcorneale *ex vivo*. Questi hanno consentito definitivamente di affermare l'efficacia *enhancer* dei sistemi proposti che, di conseguenza, risultato a tutti gli effetti ottimi candidati per lo sviluppo di opportuni colliri, confermato, così, la potenzialità dell'inulina come polimero da sfruttare per la formulazione di *ocular drug delivery systems*. Inoltre è stata confermata la superiorità del sistema PEG-ylato, sotto differenti punti di vista.

In seconda battuta, alla luce dei risultati così promettenti ottenuti per i sistemi a struttura polisaccaridica a base di inulina, sono stati progettati analoghi sistemi micellari a partire da un polimero a struttura poliamminoacidica: il PHEA. I derivati anfifilici del PHEA sono stati opportunamente progettati e sintetizzati in modo da ottenere polimeri con le stesse proprietà di self-assembling dei corrispondenti derivati dell'inulina. I 4 derivati polimerici oggetto dello studio sono stati impiegati per la preparazione di micelle polimeriche cariche di imatinib. Anche in questo caso tutti i sistemi micellari prodotti sono risultati idonei alla somministrazione oculare topica sotto forma di collirio. Le caratteristiche generali di un

*ocular drug delivery system* sono già state discusse quindi analizzeremo nel dettaglio solo le principali differenze osservate tra i sistemi a base di INU e quelli a base di PHEA. Innanzi tutto, sebbene le micelle a base di PHEA o di INU abbiano particle size analogo e compatibile con la via di somministrazione per le quali sono proposte, i valori di potenziale zeta delle micelle a base di PHEA risultano maggiori e da questo consegue la notevolmente aumentata mucoadesività delle stesse rispetto a quelle a base di INU. Le micelle a base di INU, invece, risultano capaci di incorporare maggiori quantità di imatinib all'interno del loro core. Infine, in termini di permeazione *in vitro*, nuovamente non è stato possibile discriminare l'efficacia dei differenti sistemi che invece esiste ed è evidente dai test di permeazione *ex vivo*. Infatti, le micelle a base di INU risultano in un importante effetto *enhancer* che è, invece, molto meno marcato per le micelle a base di PHEA. La differenza più significativa, inoltre, è che per le micelle a base di INU la PEG-ylazione apporta visibilmente importanti variazioni al sistema ed in particolare migliorie (aumento stabilità, mucoadesività ed efficacia *enhancer*). Al contrario, le micelle a base di PHEA si comportano in maniera del tutto analoga siano esse PEG-ylate o no. L'unica differenza tra i sistemi PEG-ylato e non PEG-ylato sta nei valori di CAC e nella capacità di incorporazione dell'imatinib, ma, per il resto, i due sistemi micellari sono quasi identici.

Le micelle a base di INU, in definitiva, sono emerse come migliori sistemi micellari tra quelli progettati e proposti. È per questo che sono state scelte come protagoniste per la fase finale di ottimizzazione del carrier micellare stesso. L'ultimo step è, infatti, consistito nell'ottimizzazione dell'efficacia *enhancer* valutando differenti molecole potenzialmente in grado di promuovere l'assorbimento transcorneale mediante vari meccanismi. Dai primi studi, infatti, è emerso come la funzionalizzazione chimica del polimero anfifilico costituente le micelle con una molecola ad azione *enhancer* (nella fattispecie il PEG) sia in grado di incrementare le proprietà *enhancer* del sistema stesso. Gli ulteriori *enhancer* selezionati sono stati appositamente scelti in quanto in grado di interagire con i propri specifici trasportatori presenti al livello dell'epitelio corneale umano. Per valutare nel complesso la loro azione *enhancer* lo studio è stato condotto in maniera duplice: in primis sono stati valutati gli *enhancer* liberi in soluzione e questi sono stati confrontati con l'efficacia dei sistemi portanti gli *enhancer* legati chimicamente. In tal senso sono stati opportunamente progettati nuovi derivati del copolimero anfifilico di INU selezionato per lo studio. Le micelle polimeriche prodotte hanno mostrato tutte ottime proprietà, ideali per il *delivery* oftalmico topico e sono state caricate in maniera adeguata con il desametasone.

Il punto cruciale di questo studio è consistito nella valutazione della permeazione transcorneale che è stata studiata esclusivamente *ex vivo* in quanto, come visto, i test *in vitro* non sono in grado di far emergere la differente efficacia di diversi sistemi carrier. I risultati ottenuti sono molto complessi e mostrano come, in generale, la presenza dell'*enhancer* sia in grado di aumentare sia la permeazione che la penetrazione di farmaco rispetto ai dati osservati per le micelle semplici senza *enhancer*. Tuttavia il comportamento dell'*enhancer* varia al variare dell'*enhancer* stesso ed è quasi impossibile dare un commento univoco. In particolare in termini di permeazione, il PEG si dimostra maggiormente efficace quando legato chimicamente al sistema micellare, la TAU si comporta in maniera analoga in entrambi i casi ed infine la CAR e la CRE sono più efficaci quando libere in soluzione. Inoltre si osserva come in tutti i casi l'*enhancer* risulti in grado di modificare l'assetto della struttura corneale aumentando notevolmente la penetrazione di farmaco all'interno della cornea in maniera non correlata all'aumento di permeazione osservato in 6 h. Gli *enhancer* lavorano quindi in maniera differente tra di loro, sfruttando interazioni e pathway differenti. I risultati ottenuti dimostrano come la funzionalizzazione chimica possa essere un efficace strategia per l'ottimizzazione della permeazione degli *ocular drug delivery systems*. Inoltre risulta promettente l'impiego di molecole dotate dei propri specifici trasportatori localizzati sulla membrana biologica di interesse, cosa che finora è stata maggiormente sfruttata per la sintesi di profarmaci piuttosto che per la progettazione di sistemi di *delivery* oftalmico. Potrebbe, inoltre, portare risultati interessanti la funzionalizzazione chimica del sistema micellare con la molecola *enhancer* tramite uno spacer che possa garantirgli una migliore esposizione superficiale potenziandone e promuovendone l'efficacia.

In generale tutti i sistemi micellari proposti potrebbero essere dei validi candidati per la realizzazione di opportuni colliri medicati. Questi potrebbero costituire strategie terapeutiche efficienti ed efficaci e nel contempo garantire una buona compliance del paziente in quando consentirebbero l'automedicazione e permetterebbero di evitare il ricorso alle iniezioni intravitreali o la somministrazione di sospensioni farmaceutiche che possono risultare meno confortevoli nonché meno efficienti. L'incremento del tempo di residenza in situ e della dose di farmaco disponibile e somministrabile potrebbe inoltre tradursi in una riduzione della frequenza di somministrazione necessaria mantenendo una buona efficacia terapeutica.

L'ulteriore campo di ricerca trattato, ha portato alla realizzazione di inserti oftalmici costituiti da uno scaffold fibrillare a base di un poliestere altamente idrofobico (PBS) e pertanto in grado di consentire un'efficace ed ingente incorporazione di farmaci altamente lipofili come il triamcinolone acetone. Alla luce dell'eccessiva lipofilia del polimero impiegato, la superficie dello scaffold è stata efficacemente decorata mediante funzionalizzazione plasma-assistita con biopolimeri quali INU, PHEA ed EPA portando alla realizzazione di inserti oftalmici idonei e dotati di tutte le caratteristiche opportune e desiderate. In particolare sono stati ottenuti inserti non bioerodibili, dotati di bassissimo grado di swelling, citocompatibili, carichi di ingenti quantità di TA ed estremamente mucoadesivi. Gli inserti sono, inoltre, in grado di rilasciare lentamente ed in maniera controllata il TA dopo aver aderito saldamente al tessuto corneale. Questo si traduce in un notevole incremento della permeazione e penetrazione transcorneale con aumento dei valori sia di  $K_p$  che di  $K_a$  di un ordine di grandezza. I risultati ottenuti sono risultati ancora più promettenti di quelli, già ottimi, misurati quando il TA è veicolato a mezzo di micelle polimeriche. Per di più gli inserti possono costituire un rimedio efficace in grado di aumentare la compliance del paziente riducendo la frequenza delle somministrazioni necessarie ed evitando l'ingresso pulsatile di farmaco nelle regioni più interne dell'occhio.

In generale tutti i sistemi preparati risultano estremamente promettenti per il trattamento delle patologie degenerative retiniche, oggetto dello studio, grazie alle caratteristiche già messe in evidenza ed anche grazie alla loro semplicità di somministrazione ed anche autosomministrazione che potrebbe risultare estremamente importante soprattutto se consideriamo il fatto che le patologie prese in considerazione hanno un carattere cronico e che le strategie farmacologiche attualmente attuabili non sono ancora totalmente risolutive, pertanto per mantenere gli effetti positivi della terapia in termini di acuità visiva e necessario un trattamento a vita.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Ali Y, Lehmuusaari K. “Industrial perspective in ocular drug delivery” *Advanced Drug Delivery Reviews* (2006); 58: 1258–1268.

Al-Zamil WM, Yassin SA. “Recent developments in age-related macular degeneration: a review” *Clin. Interv. Aging* (2017); 12: 1313-1330.

Annunziato L, Di Renzo G et al. “Trattato di Farmacologia” *Idelson-Gnocchi srl – editori dal 1908* (2010).

Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. “Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL- 60 cells” *Free Radic. Biol. Med.* (2001); 31: 367–373.

Aulton ME, Taylon KM. “Aulton. Tecnologie farmaceutiche. Progettazione e allestimento dei medicinali” *Edra, 4<sup>th</sup> ed.* (2015).

Awwad S, Mohamed Ahmed AHA, Sharma G et al. “Principles of pharmacology in the eye” *Br J Pharmacol.* (2017); 174: 4205-4223.

Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS et al. “Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: In vitro and pharmacokinetics studies” *International Journal of Pharmaceutics* (2012); 432: 105– 112.

Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, et al. “Functional aspects of the tear film lipid layer” *Exp. Eye Res.* (2004); 78: 347–360.

Carbone E, Cicirata F, Aicardi G et al. “Fisiologia: dalle molecole ai sistemi integrati” *EdiSeS s.r.l.* (2008).

Caruso F, Saladino ML, Spinella A et al. “Physico-Chemical Characterization Of The Acqualadrono Rostrum” *Archaeometry* (2011); 53: 547–562.

Chandran S, Roy A, Saha RN. “Effect of pH and formulation variables on in vitro transcorneal permeability of flurbiprofen: a technical note” *AAPS PharmSciTech* (2008); 9: 1031–1037.

Chantelau E, Frystyk. “Progression of diabetic retinopathy during improved metabolic control may be treated with reduced insulin dosage and/or somatostatin analogue administration – a case report” *Growth Horm. IGF Res.* (2005); 15: 130–135.

Chaudhuri A, Haldar S, Chattopadhyay A. “Organization and dynamics in micellar structural transition monitored by pyrene fluorescence” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009); 390: 728-732.

Cilley JC, Barfi K, Benson AB III et al. “Bevacizumab in the treatment of colorectal cancer” *Expert Opinion on Biological Therapy* (2007); 7: 739–749.

Civiale C, Licciardi M, Cavallaro G et al. “Polyhydroxyethylaspartamide-based micelles for ocular drug delivery” *International Journal of Pharmaceutics* (2009); 378: 177–186.

Craparo EF, Cavallaro G, Bondi ML et al. “Pegylated nanoparticles based on a polyaspartamide. Preparation, physico-chemical characterization, and intracellular uptake” *Biomacromolecules* (2006); 7: 3083–3092.

Dal Monte M, Ristori C, Cammalleri M et al. “Effects of somatostatin analogues on retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: involvement of the somatostatin receptor subtype 2” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2009); 50: 3596–3606.

De Caro V, Scaturro AL, Di Prima G et al. “Aloin delivery on buccal mucosa: ex vivo studies and design of a new locoregional dosing system” *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2015); 41: 1541–1547.

Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. “Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies” *JCI Insight.* (2017); 20: pii: 93751.

Duh EJ. “A novel mechanism for glucocorticoid-induced tightening of endothelial barriers” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2013); 54: 4016.



Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. “The biology of VEGF and its receptors” *Natural Medicine* (2003); 9: 669–676.

Fresta M, Fontana G, Bucolo C et al. “Ocular Tolerability and In Vivo Bioavailability of Poly(ethylene glycol) (PEG)-Coated Polyethyl-2-Cyanoacrylate Nanosphere-Encapsulated Acyclovir” *Journal Of Pharmaceutical Science* (2001); 90: 288-297.

Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP et al. “Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery” *J. Control. Release* (2005)5; 109: 169-188.

Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A et al. “Ocular Drug Delivery” *AAPS J* (2010); 12: 348-360.

Gaudreault J, Fei D, Rusit J et al. “Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2005); 46: 726–733.

Giammona G, Carlisi B, Palazzo S. “Reaction of  $\alpha,\beta$ -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide with derivatives of carboxylic acids” *Polymer Chemistry* (1987); 25: 2813–2818.

Graham RO, Peyman GA. “Intravitreal injection of dexamethasone. Treatment of experimentally induced endophthalmitis” *Archives of Ophthalmology* (1974); 92: 149–154.

Grant MB, Caballero S Jr. “The potential role of octreotide in the treatment of diabetic retinopathy” *Treat. Endocrinol.* (2005); 4: 199–203.

Gupta KC, Haider A, Choi YR et al. “Nanofibrous scaffolds in biomedical applications” *Biomater. Res.* (2014); 13: 18:25.

Hadjargyrou M, Chiu JB. “Enhanced composite electrospun nanofiber scaffolds for use in drug delivery” *Expert Opin. Drug Deliv.* (2008); 5: 1093-1106.

Holash J, Davis S, Papadopoulos N et al. “VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects” *PNAS USA* (2002); 99: 11393–11398.

Homsy J, Daud AI. “Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors” *Cancer Control* (2007); 14: 285-294.

Huang HY, Appel LJ, Croft KD et al. “Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial” *Am. J. Clin. Nutr.* (2002); 76: 549–555.

Husain D, Kim I, Gauthier D et al. “Safety and efficacy of intravitreal injection of ranibizumab in combination with verteporfin PDT on experimental choroidal neovascularization in the monkey” *Archives of Ophthalmology* (2005); 123: 509–516.

Inoue M, Takeda K, Morita K et al. “Vitreous concentrations of triamcinolone acetonide in human eyes after intravitreal or subtenon injection” *Am J. Ophthalmol.* (2004); 138: 1046–1048.

Jarvinen T, Jarvinen K. “Prodrugs for improved ocular drug delivery” *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1996); 19: 203–224.

Kaur IP, Batra A. “Ocular Penetration Enhancers” *Enhancement in Drug Delivery*. Touitou E, Barry BW (Eds). CRC Press, FL, USA, (2007): 527–547.

Kitagawa T, Yuzawa M. “Intravitreal pegaptanib sodium for myopic choroidal neovascularization: 1 year results of a prospective pilot study” *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* (2013); 117: 344–350.

Knop E, Knop N. “A functional unit for ocular surface immune defence formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system” *Adv. Exp. Med. Biol.* (2002); 506B: 635-644.

Kowluru RA, Chan PS. “Oxidative stress and diabetic retinopathy” *Exp. Diabetes Res.* (2007): 43603.

Kowluru RA, Tang J, Kern TS. “Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy” *Diabetes* (2001); 50: 1938–1942.

Kumar KPS, Bhowmik D, Harisk G et al. “Ocular inserts: a novel controlled drug delivery system” *The Pharma Innovation – Journal* (2013); 1: 1-16.

Kuwabara K, Gan Z, Nakamura T et al. “Molecular Mobility and Phase Structure of Biodegradable Poly(butylene succinate) and Poly(butylene succinate-co-butylene adipate)” *Biomacromolecules* (2002); 3: 1095-1100.

Leigh RJ, Zee DS. “The neurology of eye movement” 4th edition, *Oxford University Press* (2006).

Licciardi M, Campisi M, Cavallaro et al. “Synthesis and characterization of polyaminoacidic polycations for gene delivery” *Biomaterials* (2006); 27: 2066-2075.

Licciardi M, Di Stefano M, Craparo EF et al. “PHEA-graft-polybutylmethacrylate copolymer microparticles for delivery of hydrophobic drugs” *Int. J. Pharm.* (2012); 433: 16-24.

Licciardi M, Pitarresi G, Cavallaro G et al. “Nanoaggregates Based on New Poly-Hydroxyethyl-Aspartamide Copolymers for Oral Insulin Absorption” *Molecular Pharmaceutics* (2013); 10: 1644–1654.

Licciardi M, Scialabba C, Sardo C et al. “Amphiphilic inulin graft co-polymers as self-assembling micelles for doxorubicin delivery” *J. Mater. Chem.* (2014); 2: 4262–4271.

Mandracchia D, Tripodo G, Latrofa A et al. “Amphiphilic inulin-d- $\alpha$ -tocopherol succinate (invite) bioconjugates for biomedical applications” *Carbohydr. Polym.* (2014); 103: 46–54.

Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. “Anatomia umana” *EdiSeS s.r.l.*, 3<sup>rd</sup> ed. (2008).

McCulley JP, Shine W. “A compositional based model for tear the film lipid layer” *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* (1997); 95: 79–88.

Michels R, Michels S, Kaminski S. “Effect of combined topical heparin and steroid on corneal neovascularization in children” *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging* (2012); 43: 452-458.

Morrison PW, Khutoryanskiy VV. “Advances in ophthalmic drug delivery” *Ther. Deliv.* (2014); 5: 1297-1315.

Moshfeghi AA, Puliafito CA. “Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration” *Expert Opinion and Investigational Drugs* (2005); 14: 671–682.

Palumbo FS, Pitarresi G, Mandracchia D et al. “New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: synthesis and characterization” *Carbohydr. Polym.* (2006); 66: 379–385.

Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q et al. “Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab” *Angiogenesis* (2012); 15:171-185.

Pappa AM, Karagkiozaki V, Krol S et al. “Oxygen-plasma-modified biomimetic nanofibrous scaffolds for enhanced compatibility of cardiovascular implants” *Beilstein J. Nanotechnol.* (2015); 6: 254–262.

Patel A, Cholkar K, Agrahari V et al. “Ocular drug delivery systems: An overview” *World J Pharmacol.* (2013); 2: 47-64.

Pescina S, Govoni P, Potenza A et al. “Development of a Convenient ex vivo Model for the Study of the Transcorneal Permeation of Drugs: Histological and Permeability Evaluation” *Journal Of Pharmaceutical Sciences* (2015); 104: 63–71.

Pintea A, Rugina D, Pop R et al. “Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells” *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* (2011); 27: 315–321.

Pitarresi G, Triolo D, Giorgi M et al. “Inulin-based hydrogel for oral delivery of flutamide: praration, characterization, and in vivo release studies” *Macromol. Biosci.* (2012); 12: 770–778.

Pitarresi G, Tripodo G, Cavallaro G et al. “Inulin-iron complexes: a potential treatment of iron deficiency anaemia” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2008); 68: 267-276.

Raimondi C, Fantin A, Ruhrberg C. “Imatinib may be ABL to improve anti-angiogenic therapy” *Molecular And Cellular Oncology* (2015); 2: e968034.

Ravi DV, Varun K, Sulabh P et al. “Controlled Ocular Drug Delivery with Nanomicelles” *Wiley Interdisciplinary Reviews of Nanomedicine and Nanobiotechnologies* (2014); 6: 422–437.

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS et al. “Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration” *N. Engl. J. Med.* (2006); 355: 1419–1431.

Samarawickrama C, Chew S, Watson S. “Retinoic acid and the ocular surface” *Surv. Ophthalmol.* (2015); 60: 183-195.

Sarao V, Veritti D, Boscia F et al. “Intravitreal steroids for the treatment of retinal diseases” *Sci. World J.* (2014); 14: 1–14.

Schmidt-Erfurth U, Chong V, Loewenstein A et al. “Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA)” *British Journal of Ophthalmology* (2014); 98: 1144–1167.

Schmidt-Erfurth UM, Richard G, Augustin A et al. “Guidance for the treatment of neovascular age-related macular degeneration” *Acta Ophthalmologica Scandinavica* (2007); 85: 486–494.

Scialabba C, Rocco F, Licciardi M et al. “Amphiphilic polyaspartamide copolymer-based micelles for rivastigmine delivery to neuronal cells” *Drug delivery* (2012); 19: 307-316.

Shen J, Wang Y, Ping Q et al. “Mucoadhesive effect of thiolated PEG stearate and its modified NLC for ocular drug delivery” *Journal of Controlled Release* (2009); 137: 217-223.

Sheu SJ, Liu NC, Chen JL. “Resveratrol protects human retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced damage” *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* (2010); 26: 231–236.

Standring S “Anatomia del Gray” 40th edition, *Elsevier* (2012).

Stefanadis C, Synetos A, Tousoulis D et al. “Systemic administration of bevacizumab increases the risk of cardiovascular events in patients with metastatic cancer” *International Journal of Cardiology* (2012); 154: 341–344.

Stewart MW. “Corticosteroid use for diabetic macular edema: old fad or new trend?” *Curr. Diab. Rep.* (2012); 12: 364–375.

Tomida D, Nishiguchi KM, Kataoka K et al. “Suppression of choroidal neovascularization and quantitative and qualitative inhibition of VEGF and CCL2 by heparin” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2011); 52: 3193-3199.

van der Zee M, Stoutjesdijk JH, van der Heijden PAAW et al. “Structure-biodegradation relationships of polymeric materials. 1. Effect of degree of oxidation on biodegradability of carbohydrate polymers” *J. Environ. Polym. Degrad.* (1995); 3: 235–242.

Wang X, Fan Q, Chen Z et al. “Surface Modification of Graphene Oxides by Plasma Techniques and Their Application for Environmental Pollution Cleanup” *Chem. Rec.* (2016); 16: 295-318.

Washington N, Washington C, Wilson CG. “Ocular drug delivery” *Physiological Pharmaceutics: Barriers to Drug Absorption*, 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, FL, USA, (2001): 249–270.

Wilson CG, Semenova EM, Hughes PM et al. “Eye structure and physiological functions” *Enhancement in Drug Delivery*. Touitou E, Barry BW (Eds). CRC Press, FL, USA, (2007): 473–487.

Wilson CG, Zhu YP, Kumala P, et al. “Ophthalmic drug delivery” *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J (Eds). CRS Press, FL, USA, (2001): 329–353.

Yasukawa T, Tabata Y, Kimura H et al. “Recent advances in intraocular drug-delivery systems” *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* (2011); 5: 1–10.

Zayit-Soudry S, Zemel E, Loewenstein A et al. “Safety evaluation of repeated intravitreal injections of bevacizumab and ranibizumab in rabbit eyes” *Retina* (2010); 30: 671–681.

Zhang Q, Li Y, Lin ZYW et al. "Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications" *Drug Discov. Today* (2017); 22: 1351-1366.

## ***Finanziamenti***

Questo lavoro è stato finanziato dal Programma nazionale PON R&C 2007-2013: "Piattaforma scientifico-tecnologica finalizzata allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici nel trattamento delle principali malattie degenerative della retina", REACT (REtinopathies Advanced Care Therapies - PON01\_01434).

## ***Ringraziamenti***

Si ringraziano il Dr. Roberto Puleio dell'Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A. Mirri" di Palermo, ed il Dr. Gaspare Orlando del Dipartimento di Prevenzione Veterinaria (ASP-Palermo) per aver fornito i tessuti animali impiegati per gli studi *ex vivo*.

Si ringrazia il laboratorio di risonanza magnetica nucleare di *Aten Center* per le analisi  $^{13}\text{C}$ -NMR in fase solida degli scaffold.

Si ringrazia inoltre il Laboratorio Derivati Organici S.p.A. (LDO) – Prodotti Biologici Chimici e Farmaceutici, per aver fornito l'eparina sodica.



## ***Elenco Pubblicazioni Scientifiche, Poster e Comunicazioni a Congressi***

### *Pubblicazioni Scientifiche:*

- ☉ Bongiovì F, **Di Prima G**, Palumbo FS, Licciardi M, Pitarresi G, Giammona G, “Hyaluronic Acid-Based Micelles as Ocular Platform to Modulate the Loading, Release, and Corneal Permeation of Corticosteroids” *Macromolecular Bioscience* (2017), doi: 10.1002/mabi.201700261.
- ☉ **Di Prima G**, Saladino S, Bongiovì F, Adamo G, Ghersi G, Pitarresi G, Giammona G, “Novel inulin-based mucoadhesive micelles loaded with corticosteroids as potential transcorneal permeation enhancers” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 117 (2017) 385–399.
- ☉ Mauro N, Fiorica C, Varvarà P, **Di Prima G**, Giammona G, “A facile way to build up branched high functional polyaminoacids with tunable physicochemical and biological properties” *European Polymer Journal* 77 (2016) 124–138.

### *Poster:*

- ☉ Bongiovì F, **Di Prima G**, Palumbo FS, Licciardi M, Pitarresi G, Giammona G, “Hyaluronic Acid Derivative Micelles As Ocular Platforms To Drug Release And Corneal Permeation” (2016), Congresso Nazionale – 4° Meeting IBIM CNR-STEBICEF Biotecnologie: Ricerca di Base, Interdisciplinare e Traslazionale in Ambito Biomedico
- ☉ Bongiovì F\*, **Di Prima G\***, Pitarresi G, Giammona G, “Ex-Vivo model for the evaluation of drugs and micellar systems permeation across cornea” (2015), Congresso Nazionale - 3° Meeting IBIM CNR-STEBICEF Biotecnologie: Ricerca di Base, Interdisciplinare e Traslazionale in Ambito Biomedico  
(\* Coautori in ordine alfabetico)

*Comunicazioni a Congressi:*

- **Di Prima G**, Saladino S, Bongiovì F, Adamo G, Pitarresi G, Ghersi G, Giammona G, “Mucoadhesive micelles based on inulin derivative for ocular release of corticosteroids” (2016), Congresso Nazionale – 4° Meeting IBIM CNR-STEBICEF Biotecnologie: Ricerca di Base, Interdisciplinare e Traslazionale in Ambito Biomedico
- **Di Prima G**, Giammona G, “Micelle Polimeriche A Base Di Nuovi Derivati Anfifilici Dell’inulina Per La Somministrazione Oculare Topica Di Corticosteroidi Nel Trattamento Delle Patologie Degenerative Della Retina” (2016), Il Corso permanente di aggiornamento per i dottorandi del settore tecnologico-farmaceutico