



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO FARMACEUTICO

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA**

**SISTEMI GASTRORETENTIVI OTTENUTI
MEDIANTE ASSEMBLAGGIO DI MODULI DI
RILASCIO DI FARMACO PER IL
TRATTAMENTO DI PATOLOGIE ACIDO-
CORRELATE**

Tutore:

Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Relatore:

Chiar.mo Prof. CARMELO SCARPIGNATO

Coordinatore

Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Dottoranda:

CHIARA CONTI

XIII CICLO 2008-2010

Alla mia famiglia

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 Anatomia e fisiologia dello stomaco e del duodeno	4
1.2 Helicobacter Pylori e trattamento farmacologico	10
1.2.1 Patogenesi dell'Helicobacter Pylori	12
1.2.2 Terapia farmacologica	14
1.3 Forme farmaceutiche a rilascio modificato	22
1.3.1 Tecnologia Dome Matrix®	29
2. Scopo della Ricerca	36
3. Materiali e Metodi	39
3.1 Materiali	39
3.2 Metodi	42
3.2.1 Preparazione del granulato	42
3.2.2 Determinazione dell'Umidità Residua del Granulato	43
3.2.3 Allestimento delle Miscele	43
3.2.4 Preparazione dei Moduli di Rilascio per Compressione	43
3.2.5 Assemblaggio dei Moduli	45
3.2.6 Controlli Tecnologici sulle Compresse	45
3.2.6.1 Resistenza alla rottura delle Compresse	45
3.2.6.2 Friabilità delle Compresse	45

3.2.6.3 Resistenza agli Urti degli Assemblati	46
3.2.7 Determinazione del Titolo di Amoxicillina in UV-Visibile	46
3.2.8 Determinazione del Titolo di Amoxicillina in HPLC	47
3.2.9 Determinazione del Titolo di Claritromicina	47
3.2.10 Determinazione del Titolo di Omeprazolo	48
3.2.11 Test di Disgregazione	49
3.2.12 Test di Dissoluzione	50
3.2.13 Determinazione quantitativa di Amoxicillina in UV-Visibile	52
3.2.14 Determinazione quantitativa di Amoxicillina in HPLC	53
3.2.15 Determinazione quantitativa di Claritromicina in HPLC	54
3.2.16 Determinazione quantitativa di Omeprazolo in HPLC	55
3.2.17 Calcolo della costante di Dissoluzione	55
3.2.18 Simulazione della quantità di farmaco presente a livello gastrico	56
3.2.19 Analisi dei dati di dissoluzione	58
3.2.20 Studi di galleggiamento	59
3.2.21 Studi in vivo	62
3.2.22 Determinazione quantitativa di Amoxicillina e Claritromicina in plasma	64

4.	Risultati e Discussione	67
4.1	Claritromicina	67
4.1.1	Moduli e assemblato di claritromicina	67
4.1.1.1	Profilo di dissoluzione della formulazione contenente 50% di HPMC K100M	69
4.1.1.2	Profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 10%, 30%, 40% di HPMC K100M	72
4.1.1.3	Profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 10%, 20% e 40% di HPMC K15M	78
4.1.1.4	Confronto tra i profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 10% di HPMC	81
4.1.1.5	Profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 500 mg di claritromicina	83
4.1.2	Simulazione della concentrazione gastrica di Claritromicina	92
4.2	Amoxicillina	100
4.2.1	Moduli e assemblato di Amoxicillina	100
4.2.1.1	Profilo di dissoluzione della formulazione A1	103
4.2.1.2	Profilo di dissoluzione della formulazione A2	104
4.2.1.3	Profilo di dissoluzione della formulazione A3	105
4.2.1.4	Profilo di dissoluzione dei moduli da 11 mm	106
4.2.1.5	Simulazione del contenuto gastrico di Amoxicillina	107
4.3	Assemblaggio dei moduli di claritromicina e amoxicillina	110

4.4	Studi di galleggiamento	115
4.5	Studi in vivo	118
4.6	Omeprazolo	123
4.6.1	Modulo di Omeprazolo	123
5.	Conclusioni	128
6.	Bibliografia	131

1. INTRODUZIONE

Le malattie gastrointestinali rappresentano un importante campo di indagine farmacologica, e tra queste, l'ulcera peptica occupa un ruolo di primaria importanza.

L'ulcera peptica è una patologia dell'apparato gastrointestinale che può interessare lo stomaco (ulcera gastrica) o il duodeno (ulcera duodenale). Si tratta di una lesione della mucosa gastrica o duodenale provocata dall'azione dell'acido e della pepsina. La lesione può essere di tipo superficiale o può estendersi anche agli strati sottostanti, danneggiando i vasi sanguigni con conseguenti perdite ematiche gravi. In alcuni casi tale lesione può addirittura dare origine a un'ulcera perforata che si estende nell'intera parete del tubo digerente con conseguente passaggio di materiale alimentare, secrezioni e germi in cavità peritoneale e può avere conseguenze letali.

L'ulcera peptica rappresenta una malattia di notevole rilevanza sociale dato che nei paesi occidentali circa il 2% della popolazione presenta un'ulcera attiva e il 6-15% ha manifestato nel corso della vita sintomi compatibili con quelli caratteristici della patologia [1, 2].

Generalmente, in soggetti sani, la mucosa dello stomaco e dell'intestino non può essere intaccata dagli acidi digestivi. Normalmente la mucosa gastrica è ricoperta dal muco secreto dalle cellule mucose superficiali. Questo muco svolge un'azione protettiva, mantenendo a livello della mucosa un pH più elevato rispetto a quello del secreto gastrico; in questo modo costituisce una

barriera che impedisce all'acido di ledere la mucosa e la sottomucosa. Lo sviluppo di ulcere si manifesta quando si verifica uno squilibrio tra i fattori protettivi e i fattori irritanti/aggressivi dell'apparato gastrointestinale [1, 2].

L'equazione acido/pepsina \rightleftharpoons muco può essere alterata da diversi fattori, quali:

- Stress, durante il quale si evidenzia sia un calo della secrezione di acido gastrico sia un calo della produzione di muco e bicarbonato oltre che una diminuzione dell'apporto di sangue al tratto gastrointestinale. Quest'ultimo aspetto può causare una riduzione dello spessore della barriera mucosa, favorendo l'insorgenza di ulcere [3].
- FANS, il cui consumo ripetuto e prolungato determina un assottigliamento della barriera mucosa a causa del loro meccanismo d'azione che blocca la sintesi di prostaglandine, stimolo fondamentale per la sintesi del muco [4, 5].
- Farmaci cortisonici che, analogamente ai FANS, inibiscono la sintesi di prostaglandine e di conseguenza danneggiano la mucosa protettiva [4].
- Alcool, il cui consumo prolungato causa necrosi delle cellule mucose dello stomaco [3, 6].
- Predisposizione genetica.
- Predisposizione costituzionale [6].
- Fumo di sigaretta che, sia per l'effetto del monossido di carbonio che riduce l'ossigenazione delle cellule, sia per l'effetto della nicotina che stimola la secrezione acida, rallenta lo svuotamento gastrico, diminuisce

l'apporto di sangue e la sintesi di prostaglandine [7].

- Infezione da *Helicobacter Pylori*.

Sul trattamento di quest'ultimo fattore si è concentrata questa ricerca di dottorato. Recentemente è stato infatti evidenziato che l'infezione da *Helicobacter Pylori* rappresenta la principale causa di gastriti, ulcere gastroduodenali e cancro allo stomaco e può quindi a tutto diritto essere considerata uno dei principali problemi sanitari attuali. E' una delle infezioni batteriche più diffuse in quanto interessa più della metà della popolazione mondiale e la sua incidenza dipende dall'età, dalle condizioni socioeconomiche e dal paese di origine.

L'infezione da *Helicobacter Pylori* si manifesta nel 20% dei soggetti di età inferiore ai 30 anni, ma la sua prevalenza aumenta fino al 40-60% negli individui oltre i 60 anni di età, compresi i soggetti asintomatici. Inoltre l'incidenza dell'infezione ha una particolare distribuzione geografica. In molti Paesi in via di sviluppo, più dell'80% della popolazione è positiva all'*Helicobacter Pylori* già in giovane età. Al contrario, nei paesi industrializzati la prevalenza dell'*Helicobacter Pylori* si mantiene al di sotto del 40% e si concentra negli adulti. Le condizioni socioeconomiche quali il basso livello di studio, la povertà, il sovraffollamento, lo scarso livello di igiene e il consumo di acqua inquinata condiziona fortemente la diffusione dell'infezione [8, 9, 10].

1.1 Anatomia e fisiologia dello stomaco e del duodeno

Lo stomaco è situato nella parte superiore della cavità addominale, sotto il fegato e il diaframma, con circa cinque sesti della sua massa a sinistra del piano sagittale mediano. Comunque, la sua posizione si modifica frequentemente, ad esempio durante gli atti inspiratori o dopo un pasto abbondante. Lo stomaco si suddivide in tre parti: il fondo, il corpo e il piloro. Il fondo è la porzione a sinistra al di sopra dello sbocco dell'esofago, il corpo è la parte centrale e il piloro quella terminale (**Figura 1**) [11, 12].

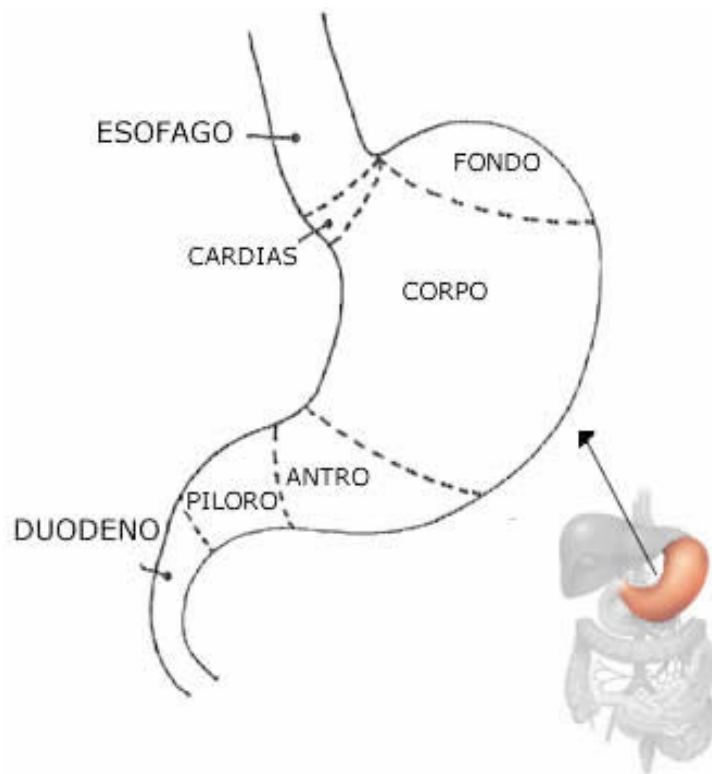


Figura 1: *Visione schematizzata dello stomaco e delle sue parti anatomiche.*

La curva della superficie superiore destra dello stomaco è nota come piccola curvatura; la curva della superficie inferiore sinistra è nota come grande curvatura. Gli sfinteri controllano entrambe le aperture dello stomaco. Lo

sfintere del cardias controlla l'apertura di sbocco dell'esofago nello stomaco, mentre lo sfintere pilorico controlla l'apertura tra il piloro e il duodeno, il primo segmento dell'intestino tenue.

Il duodeno è un canale lungo circa 25-30 cm in posizione epigastrica. E' ripiegato a C con concavità verso sinistra e in alto. Inizia con una porzione dilatata, il bulbo duodenale, che piega verso il basso (porzione discendente) e quindi ancora verso sinistra (porzione traversa) e infine verso l'alto (porzione ascendente) per terminare con la fessura duodeno-digiunale che lo fa continuare con l'intestino tenue (digiuno). Nella parte discendente del duodeno riversano i loro secreti due ghiandole: fegato e pancreas esocrino.

La struttura base della parete gastrointestinale è simile in stomaco e intestino.

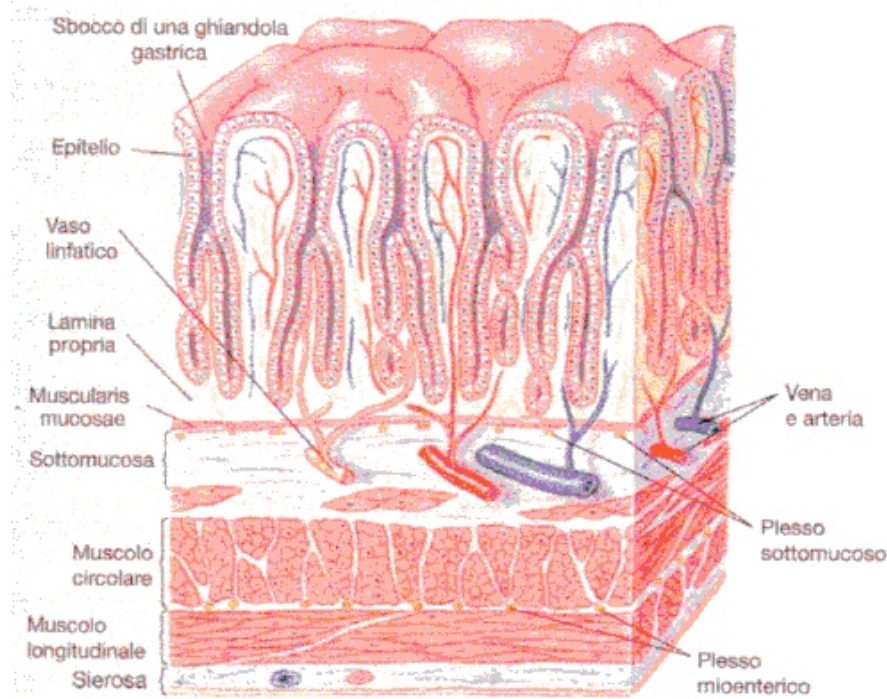


Figura 2: Immagine ingrandita e schematizzata degli strati della parete gastrica.

La parete gastrointestinale è costituita da quattro strati: quello più interno definito **mucosa**, uno strato intermedio di natura connettivale definito **sottomucosa**, una sezione più esterna composta da uno strato di muscolo liscio, la **tonaca muscolare**, ricoperto da un tessuto connettivo ed epiteliale che rappresenta l'ultimo strato, la **tonaca sierosa** (**Figura 2**) [13].

La **MUCOSA** è il rivestimento interno del tratto gastrointestinale ed è costituita da un singolo strato di cellule epiteliali, un tessuto connettivo sottoepiteliale (lamina propria) e un sottile strato di muscolo liscio (muscularis mucosae). Per incrementare la superficie disponibile utile all'assorbimento, la parete si ripiega a formare le *rughe* (nello stomaco) e le *pliche* (nell'intestino). Inoltre la mucosa intestinale proietta nel lume piccole estroflessioni, i villi, la cui superficie è incrementata dalla presenza dei microvilli. La superficie è inoltre aumentata anche da invaginazioni tubulari della mucosa (ghiandole gastriche o cripte) che possono dare origine a ghiandole sottomucose secernenti (es: ghiandole tubulari secernenti del Brunner).

Le cellule epiteliali che rivestono il lume si differenziano in:

- Cellule epiteliali di trasporto, che riversano acqua e ioni nel lume e assorbono ioni, acqua e nutrienti;
- Cellule secernenti, che rilasciano enzimi e muco nel lume mentre secernono ormoni e sostanze paracrine verso la tonaca sierosa;
- Cellule staminali, che producono in modo continuo nuovo epitelio.

La lamina propria contiene fibre nervose, vasi sanguigni e linfatici e cellule immunitarie vaganti che difendono l'organismo da agenti estranei. La *muscularis mucosae*, invece, separa la mucosa dalla sottomucosa.

La **SOTTOMUCOSA** è costituita da tessuto connettivo e vasi sanguigni/linfatici più grandi. Inoltre contiene il plesso sottomucoso, una delle principali reti nervose del sistema nervoso enterico.

La **TONACA MUSCOLARE** è costituita da due strati di muscolo liscio, uno più interno circolare e uno più esterno longitudinale. Lo stomaco ha un terzo strato di muscolo obliquo. Tra i due strati circolari si trova la seconda rete nervosa: il plesso mioenterico. Quella **SIEROSA** rappresenta un'estensione della membrana peritoneale che riveste la cavità addominale [12, 14].

Lo stomaco secerne una grande varietà di sostanze. Le **cellule parietali**, poste in profondità delle ghiandole gastriche, secernono acido cloridrico. La secrezione acida dello stomaco corrisponde in media a 1-3 litri al giorno e può determinare un pH luminale prossimo a 1. E' stato calcolato che nel lume la concentrazione di idrogenioni è fino a 2,5 milioni di volte maggiore rispetto a quella citoplasmatica. Queste cellule parietali secernono anche il *fattore intrinseco* che complessa la vitamina B₁₂ ed è fondamentale per il suo assorbimento.

Le **cellule principali** delle ghiandole gastriche secernono *pepsinogeno*, che è scisso in pepsina attiva nel lume per azione degli ioni idrogeno.

Le **cellule D** secernono *somatostatina*, le **cellule simil-enterocromaffini** l'*istamina* e le **cellule G** secernono *gastrina* quando stimolate dalla presenza di aminoacidi e peptidi nello stomaco, da riflessi nervosi o dalla distensione addominale.

Le **cellule mucose** secernono sostanze che creano una barriera protettiva; il *muco* forma una barriera fisica, il *bicarbonato* invece crea un tampone chimico sottostante il muco (**Figura 3**) [15].

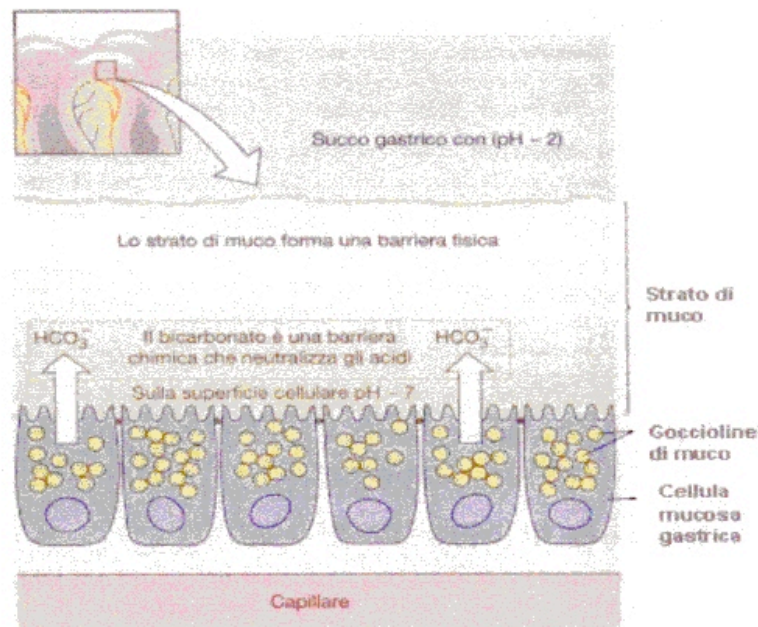


Figura 3: La barriera di muco-bicarbonato della mucosa gastrica. Lo strato alcalino di gel di muco ed altri fattori proteggono la mucosa gastrica dagli effetti dannosi dell'acido e della pepsina.

La secrezione di HCl utilizza idrogenioni (H^+) prodotti dalla dissociazione dell'acido carbonico (H_2CO_3), prodotto a sua volta dalla reazione intracellulare tra l'acqua e l'anidride carbonica. Il cloruro (Cl^-) deriva invece dallo scambio di ioni cloro e ioni bicarbonato (HCO_3^-) prodotti dalla dissociazione precedente. Gli ioni cloro passano in questo modo dal sangue al citoplasma cellulare ed escono poi nel lume con un meccanismo di co-trasporto assieme agli ioni potassio (K^+). Esiste un gradiente di concentrazione che favorisce l'uscita di ioni potassio, in quanto la loro concentrazione è maggiore all'interno della cellula. Questo gradiente, che consente perciò anche l'uscita di ioni cloro, è mantenuto costante dal rientro immediato nella cellula di ioni K^+ . La pompa protonica K^+/H^+ ATPasi situata sulla membrana apicale, scambia gli ioni potassio presenti nel dotto ghiandolare con idrogenioni. Così ioni idrogeno e cloruro si combinano nel lume per formare HCl (**Figura 4**) [16].

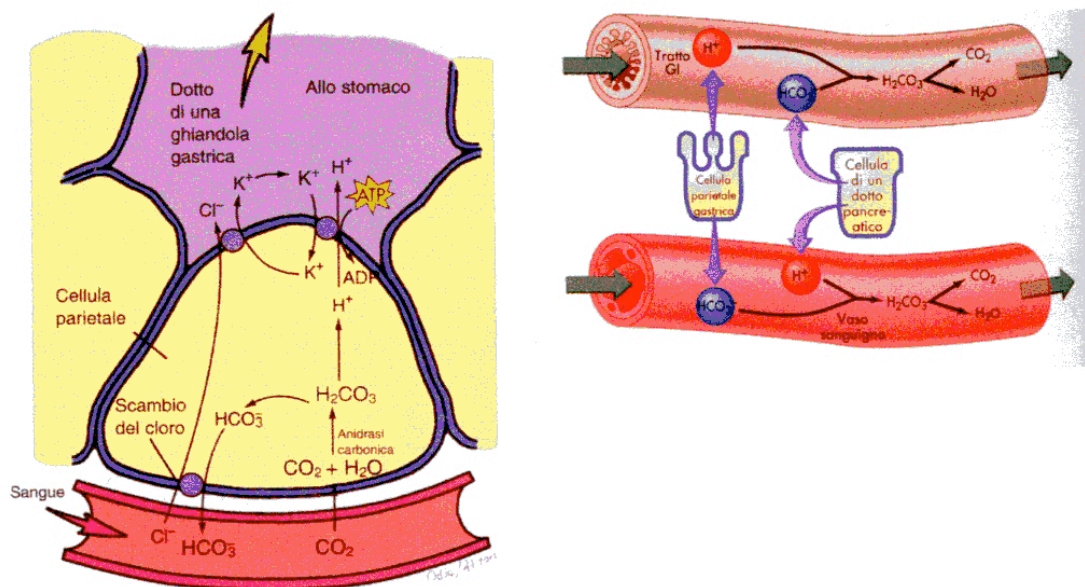


Figura 4: *Equilibrio del pH in relazione al tratto digestivo.*

La stimolazione della secrezione gastrica è controllata da tre fasi:

1. Fase cefalica: l'odore, la vista, il gusto stimolano impulsi vagali che favoriscono la produzione di gastrina, responsabile della stimolazione della secrezione gastrica;
2. Fase gastrica: la distensione delle pareti dello stomaco e la presenza di prodotti della digestione proteica degli alimenti stimolano la produzione di gastrina;
3. Fase intestinale: quando il chimo, contenente grassi, carboidrati e acido, raggiunge il duodeno, viene inibita la secrezione gastrica [15].

1.2 Helicobacter Pylori e trattamento farmacologico

Come già detto in precedenza, l'infezione da *Helicobacter Pylori* rappresenta una delle principali cause della comparsa di gastriti e ulcere peptiche [8,10].

La scoperta dell'*Helicobacter Pylori* si deve ad un evento casuale: nel 1983 gli scienziati Robin Warren e Barry Marshall dimenticarono nell'armadietto del loro laboratorio delle piastre contenenti succhi gastrici. Fino a quel momento si era sempre ritenuto che lo stomaco fosse un ambiente sterile grazie all'elevata concentrazione di acido; invece dopo circa una settimana i due notarono la formazione di una patina sulla superficie delle piastre: erano colonie batteriche di *Campylobacter pylori*. Qualche anno dopo (1989) fu coniato un genere autonomo, l'*Helicobacter Pylori*, così chiamato per la sua tipica forma ad elica [8, 17].

L'*Helicobacter Pylori* è un batterio Gram negativo lungo tra 2,5-5 μm e largo 0,5 μm , a struttura spiraliforme. La sua superficie è liscia, dotata di flagelli unipolari e capsulati, in numero variabile da 1 a 7 che gli permettono il movimento in ambiente liquido (**Figura 5**) [18].

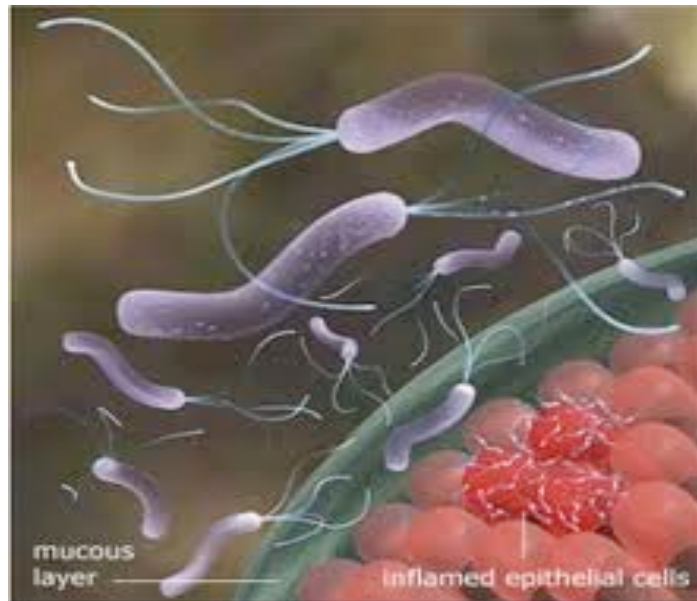
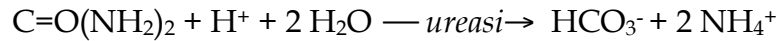


Figura 5: *Illustrazione dell'Helicobacter Pylori che attacca le cellule della mucosa gastrica.*

È un batterio microaerofilo che necessita solo del 5% di ossigeno per crescere. Generalmente il suo sviluppo è ottimale in un ambiente con il 5% di ossigeno, 10% di anidride carbonica, 85% di azoto e un elevato grado di umidità (95-100%).

È l'unico batterio in grado di colonizzare l'ambiente acido dello stomaco grazie alla sua capacità di produrre ureasi la quale, idrolizzando l'urea, libera ioni ammonio che abbassano l'acidità dello stomaco neutralizzando l'acido cloridrico secreto dalle cellule parietali.



Inoltre secerne alcuni enzimi come lipasi e proteasi che provocano la morte cellulare [19].

1.2.1 Patogenesi dell'*Helicobacter Pylori*

L'*Helicobacter Pylori* risiede principalmente nella mucosa gastrica o all'interfaccia tra lo strato mucoso e le cellule epiteliali della regione antrale dello stomaco. Solo occasionalmente aderisce alle cellule epiteliali, mentre in gran parte rimane immerso nel gel di muco che ricopre la mucosa dello stomaco, all'interno del quale si insinua spostandosi velocemente con movimento elicoidale (**Figura 6**) [20].

Il batterio non è in grado di oltrepassare l'epitelio, né di penetrare la lamina propria della mucosa. Il suo danno si esplica mediante l'induzione costante di una reazione infiammatoria che coinvolge tutto lo spessore della mucosa; l'insieme dei fenomeni lesivi della mucosa (attività citotossica, infiammazione, necrosi, autoimmunità, etc.) e le conseguenti reazioni dell'organismo ospite, portano ad un'alterata funzionalità della mucosa gastrica che si traduce in un'aumentata produzione di gastrina, in un aumento reattivo della massa cellulare della parete gastrica ed in un'aumentata produzione di acido. Di conseguenza l'aumentata produzione di acido può indurre la metaplasia delle cellule della mucosa duodenale, la cronicizzazione dell'infezione e la formazione della lesione ulcerosa. È stato inoltre dimostrato un significativo rapporto epidemiologico tra l'evoluzione dell'infezione da *Helicobacter Pylori*

in gastrite cronica atrofica nonché un più elevato rischio di insorgenza di carcinoma gastrico o di linfoma ad insorgenza dai tessuti linfoide associati alla mucosa (MALT, *mucose associated lymphoid tissue*) [19].

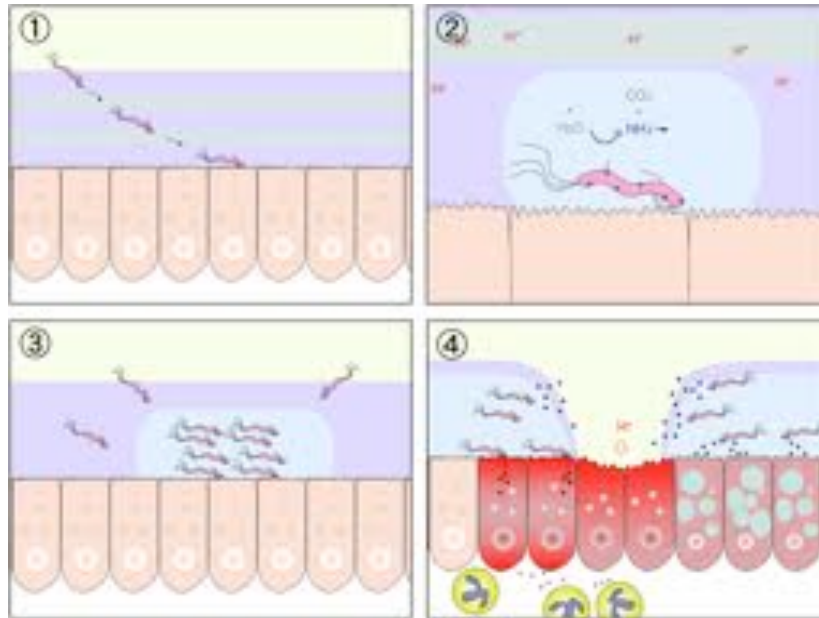


Figura 6: Meccanismo patogeno dell'*Helicobacter pylori*. (1) i batteri si localizzano all'interno dello strato di muco; (2) i batteri producono ammoniaca neutralizzando l'ambiente acido; (3) il batterio prolifera e forma una colonia batterica; (4) i batteri producono un'inflammatione a seguito della produzione di enzimi che provocano la morte cellulare.

I fattori di virulenza importanti per l'instaurarsi dell'infezione sono:

- **Motilità**, che permette al batterio di penetrare lo strato di muco;
- **Produzione di ureasi**, che neutralizza in parte l'acidità dello stomaco;
- **Adesine di superficie**, che consentono una salda adesione del batterio;
- **Produzione di enzimi** (mucinasasi, fosfolipasasi) che degradano il muco o che lo proteggono dalla fagocitosi (catalasi);

- **Produzione di citotossine (VacA)** che inducono lesioni delle cellule epiteliali.

Inoltre l'infezione scatena una risposta infiammatoria da parte dell'organismo che non è in grado di risolvere l'infezione ma che esercita, a lungo andare, un effetto patologico sulla mucosa e comporta la liberazione di radicali liberi. Questi producono danni al DNA delle cellule epiteliali favorendo così l'insorgenza di mutazioni che, accumulandosi, possono portare all'insorgenza di neoplasie [21, 22, 23].

1.2.2 Terapia farmacologica

La terapia farmacologica attualmente in uso per la cura di questa patologia prevede una triplice terapia che associa claritromicina (500 mg due volte al giorno), amoxicillina (1 g due volte al giorno) o metronidazolo (500 mg due volte al giorno) e un inibitore di pompa protonica (PPI) come l'omeprazolo (20 mg due volte al giorno) e deve essere somministrata per 7-14 giorni [24, 25].

La terapia risulta tuttavia inefficace nel 30% dei casi e i pazienti rimangono positivi all'*Helicobacter Pylori*. Il fallimento della terapia non è imputabile soltanto alla comparsa di ceppi resistenti, ma anche alla scarsa compliance del paziente e alla concomitante presenza di altre patologie oltre al fatto che il farmaco riesce difficilmente ad arrivare a diretto contatto con l'agente patogeno data la sua posizione.

Nel caso in cui la terapia fallisca, si adotta una quadruplica terapia composta da tetracicline (500 mg quattro volte al giorno), metronidazolo (500 mg tre volte al

giorno), sale di bismuto (120 mg due volte al giorno) e un inibitore di pompa protonica (20 mg due volte al giorno). Anche in questo caso la terapia ha una durata di 7-14 giorni. Tuttavia, a causa dell'elevato numero di somministrazioni, degli effetti collaterali e della durata del trattamento, l'efficacia di questo tipo di terapia è compromessa dalla scarsa compliance del paziente [9, 21, 23, 26].

La necessità di utilizzare un'associazione di farmaci per la cura dell'*Helicobacter Pylori* è dovuta all'incapacità di un unico antibiotico di risolvere l'infezione. Le cause principali di questo insuccesso sono:

- La posizione del batterio che si localizza sotto la mucosa gastrica, barriera che il farmaco non riesce ad oltrepassare;
- L'ambiente fortemente acido in cui si trova il batterio che causa la degradazione e l'inattivazione dei farmaci utilizzati;
- La scarsa permanenza del farmaco a livello gastrico a causa del continuo svuotamento [23, 26]

L'impiego di un inibitore della pompa protonica (es. omeprazolo) nella terapia di eradicazione dell'*Helicobacter Pylori* è fondamentale in quanto:

- Permette di incrementare la stabilità degli antibiotici in ambiente acido;
- Aumenta la permanenza dei farmaci all'interno dello stomaco e facilita la loro permeazione attraverso la mucosa;
- Rende i batteri più sensibili agli antibiotici;
- Svolge un'attività battericida [9, 27-30].

In conclusione è fondamentale utilizzare un'associazione di farmaci che permettano contemporaneamente l'azione battericida con diverso meccanismo d'azione (claritromicina e amoxicillina), una conseguente diminuzione della possibilità di insorgenza di resistenze e una maggiore stabilità dopo somministrazione tramite innalzamento del pH gastrico (omeprazolo).

La claritromicina (**Figura 7**) [31] presenta un tasso di eradicazione dell'*Helicobacter Pylori* di circa il 40% ed è somministrata due volte al giorno per 10-14 giorni [23].

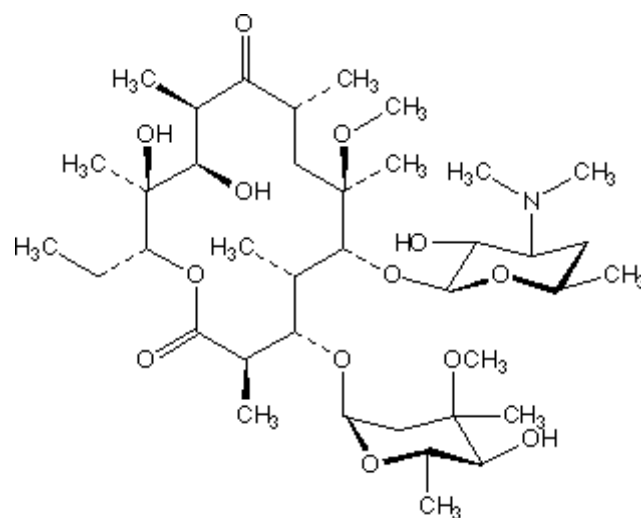


Figura 7: *Struttura della Claritromicina.*

E' un antibatterico semisintetico derivato dell'eritromicina appartenente al gruppo dei macrolidi che agisce inibendo la sintesi proteica a livello ribosomiale.

Il farmaco è assorbito rapidamente nel tratto gastrointestinale dopo somministrazione orale ma la sua biodisponibilità è ridotta al 50% a causa del metabolismo di primo passaggio. È escreto sia per via renale che biliare.

È praticamente insolubile in acqua ma è solubile in metanolo e acetone. In ambiente acido è solubile ma si degrada [32, 33].

L'amoxicillina (**Figura 8**) [31] è un antimicrobico semisintetico appartenente al gruppo delle penicilline che agisce inibendo la sintesi del peptidoglicano. È abbastanza stabile in ambiente acido ed è somministrata per via orale [32, 33].

È assorbita rapidamente nel tratto gastrointestinale, si lega per il 20% alle proteine plasmatiche ed è escreta nelle urine. È abbastanza solubile in acqua e molto solubile in etanolo.

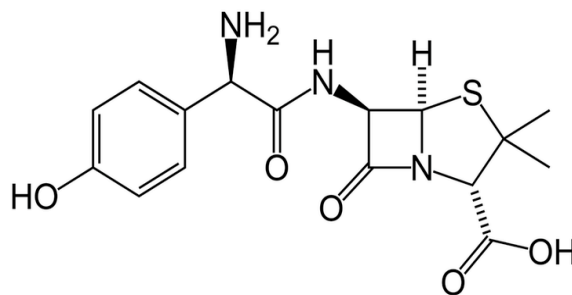


Figura 8: *Struttura dell'Amoxicillina.*

L'omeprazolo (**Figura 9**) [31] appartiene alla famiglia degli inibitori della pompa protonica (K^+/H^+ ATPasi), i farmaci più efficaci per la soppressione della secrezione acido gastrica.

È un profarmaco che si attiva ad acido solfenico grazie ad un processo catalizzato dai protoni nell'ambiente acido dei canalicoli secretori delle cellule

parietali gastriche. Questa forma attivata si lega in modo covalente al gruppo sulfidrilico di una cisteina nel dominio extracellulare della pompa protonica inibendone il funzionamento. La secrezione acida risulta così diminuita del 95% [32, 33].

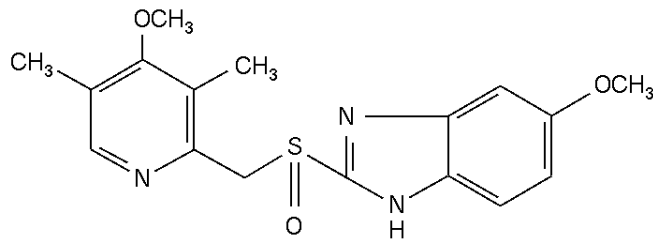


Figura 9: *Struttura dell'omeprazolo*

Siccome l'omeprazolo si degrada a pH acido, esso viene somministrato per via orale sottoforma di compresse gastroresistenti in modo che il farmaco sia rilasciato a livello intestinale dove il pH è basico. Dopo essere stato assorbito nella circolazione sistemica diffonde nelle cellule parietali gastriche e si accumula nei canalicoli secretori dove viene attivato [28].

L'omeprazolo si lega fortemente alle proteine plasmatiche, viene metabolizzato a livello epatico dal citocromo P450 ed è escreto sia a livello renale che epatico. È poco solubile in acqua, abbastanza solubile in etanolo e metanolo e solubile in cloruro di metilene [32].

Come già detto in precedenza, i fattori che contribuiscono al fallimento della terapia farmacologica sono:

- Resistenza agli antibiotici;
- Scarsa compliance da parte dei pazienti. Questo è un fattore cruciale nella terapia farmacologica per avere buoni risultati. Nel caso della triplice

terapia il paziente si ritrova a dover assumere farmaci diversi in più somministrazioni giornaliere con il rischio sempre maggiore di una posologia errata. Inoltre gli effetti collaterali tipici di una terapia antibiotica (disturbi gastrointestinali che si manifestano con nausea, diarrea, o reazioni allergiche con eritemi cutanei), che portano spesso alla sospensione anche temporanea della terapia, contribuiscono ad una minore compliance;

- Entità della patologia. La gravità delle patologie associate ad *Helicobacter Pylori* ne influenzano l'eradicazione. Pazienti con ulcera peptica tendono a rispondere meglio alla terapia rispetto a pazienti con dispepsie di natura non ulcerosa.
- Fattori farmacocinetici dovuti alla via di somministrazione e al sito d'azione del farmaco [23].

La biodisponibilità del farmaco nel sito d'azione è fondamentale per l'efficacia di una terapia farmacologica. Uno dei fattori critici è il tempo di residenza del farmaco nel sito d'azione. Nel caso dell'*Helicobacter Pylori* il sito d'azione è la mucosa gastrica: importante è quindi il tempo in cui il farmaco permane nello stomaco, poiché l'assorbimento è influenzato da tempi di transito troppo brevi [34].

Il processo di svuotamento gastrico avviene sia nello stato di digiuno che in seguito ad un pasto; nei due stati il tipo di motilità e contrazione muscolare sono differenti. Nei periodi interprandiali si ha una serie di eventi interdigestivi di tipo elettrico con intervalli di 2-3 h che interessano stomaco e piccolo

intestino. In questa fase i residui alimentari vengono allontanati e riversati nel duodeno. Il processo viene definito come *Complesso Motorio Migrante Interdigestivo* (IMMC), caratterizzato da periodiche contrazioni, distinte in tre fasi ad intervalli regolari di circa 90 minuti [35].

Nel periodo post-prandiale prevale invece la componente meccanica, il complesso IMMC viene rallentato e di conseguenza il processo di svuotamento gastrico ritardato (**Figura 10**).

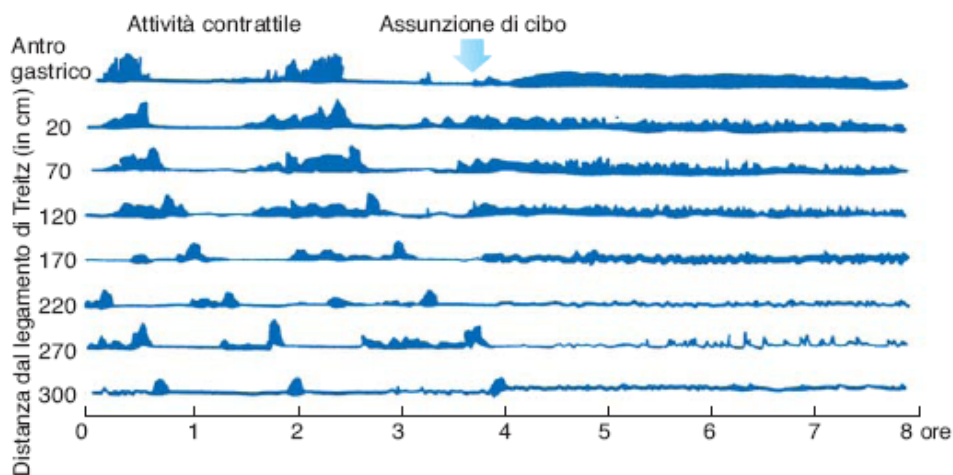


Figura 10: *Variazione dell'attività contrattile gastrica in diverse regioni dello stomaco.*

Studi di scintigrafia, condotti monitorando lo svuotamento gastrico in soggetti sani, hanno evidenziato come una forma farmaceutica orale a rilascio controllato sia soggetta a due principali eventi fisiologici: il breve tempo di ritenzione gastrica (GRT, Gastric Retention Time) della forma farmaceutica e il tempo di svuotamento gastrico (GET, Gastric Emptying Time), difficilmente prevedibile, anche se generalmente l'assunzione della maggior parte dei

farmaci avviene dopo i pasti quando cioè lo svuotamento gastrico è ritardato (3-4 h per un pasto completo) [36].

Per questi motivi sarebbe opportuno utilizzare una forma farmaceutica a rilascio controllato che permanga a lungo nello stomaco e abbia un profilo di rilascio controllato il più possibile indipendente dalle variabili riguardanti il singolo paziente (età, sesso, presenza di patologie, etc.).

In letteratura sono riportati diversi meccanismi che permettono di controllare il rilascio del principio attivo da un punto di vista spaziale [37-40] quali la mucoadesione e l'utilizzo di sistemi gastroflottanti [41-43].

Ad esempio sono stati già condotti alcuni studi [44, 45] nei quali sono state prese in considerazione forme gastroflottanti di amoxicillina [46-52] e di claritromicina [53-57] per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter Pylori* e per i quali sono stati anche condotti sia studi in vitro che studi in vivo su animali. In entrambi i casi le formulazioni si sono dimostrate efficaci e hanno incrementato l'efficienza di eradicazione dell'agente patogeno, anche se sarebbe necessario condurre ulteriori studi soprattutto su soggetti umani.

Una migliore eradicazione dell'agente patogeno e una migliore efficacia della terapia antibiotica potrebbe essere ottenuta con una terapia locale, cioè con un sistema farmacologico che permetta un maggior contatto tra l'agente patogeno e l'agente farmacologico.

In questo modo sarebbe possibile sia una maggior efficacia terapeutica che un'eventuale riduzione della dose utilizzata.

1.3 Forme Farmaceutiche a Rilascio Modificato

Le forme farmaceutiche a rilascio modificato, progettate per la somministrazione orale, hanno la forma e l'aspetto di compresse, ma permettono di controllare sia la velocità di liberazione del principio attivo (che può essere ritardato, prolungato, pulsatile o veloce) che il sito di rilascio. In tal modo si può controllare il livello ematico di farmaco modificandone l'emivita, evitando fenomeni di sotto o sovradosaggio e diminuendo il numero e la frequenza delle somministrazioni [58, 59].

Tra le diverse forme farmaceutiche a rilascio modificato progettate per la via orale, la più diffusa è quella costituita da sistemi a matrice rigonfiabili composti dal principio attivo disciolto o disperso all'interno di un polimero idrofilo rigonfiabile in grado di rigonfiare e dissolvere a contatto con un solvente acquoso [34, 38, 60-64].

La scelta del tipo di polimero da utilizzare determina il controllo del rilascio. Il polimero agisce da elemento di controllo del rilascio e deve possedere alcuni requisiti quali la biocompatibilità, la resistenza meccanica e la permeabilità al farmaco [65].

Il polimero principalmente utilizzato per la produzione di matrici rigonfiabili è l'idrossipropilmetilcellulosa (HPMC, **Figura 11**) [31] grazie alle sue caratteristiche tecnologiche, alla facile reperibilità, maneggevolezza, facilità d'uso, ridotta tossicità e costo contenuto [65].

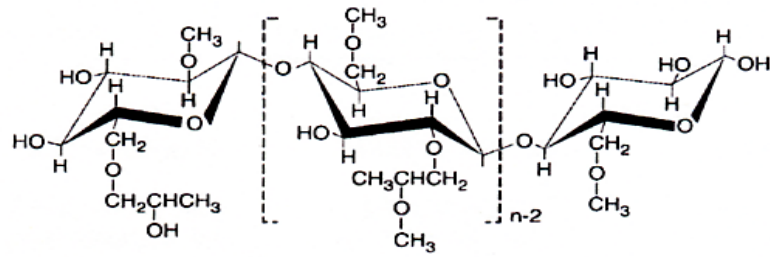


Figura 11: *Struttura dell'idrossipropilmetilcellulosa.*

L'HPMC è un polimero idrofilo in grado di assorbire grandi quantità di acqua. Le caratteristiche del polimero influenzano fortemente il rilascio del farmaco dalla matrice.

In particolare bisogna considerare:

- Il grado di viscosità,
- La quantità,
- La grandezza delle particelle,
- La solubilità [66].

La diversa viscosità dell'HPMC dipende dal grado di sostituzione con gruppi metilici e idrossipropilici che influenzano l'interazione delle catene del polimero con l'acqua e quindi l'idratazione della matrice. Se il polimero ha un'elevata viscosità si ha un'idratazione più rapida e si forma velocemente uno strato di gel denso e sottile all'inizio che diminuisce l'entrata di acqua e quindi il rilascio del farmaco [35, 36].

Quando il contenuto di HPMC nella matrice raggiunge percentuali elevate (30%-40%), il grado di sostituzione diventa meno influente sulla cinetica di rilascio del farmaco.

Un elevato contenuto di polimero provoca la formazione di uno strato di gel che erode lentamente controllando il rilascio del farmaco; una piccola quantità di polimero invece permette una maggior penetrazione di acqua nella matrice e un conseguente aumento della velocità di rilascio del farmaco.

Anche le dimensioni delle particelle di polimero influiscono sulla velocità d'idratazione del polimero stesso modificando il rilascio di farmaco: piccole particelle di polimero portano alla formazione di matrici dense a causa dei legami tra le particelle; particelle grandi portano ad una elevata porosità e quindi ad un rilascio veloce del farmaco a causa di una lenta idratazione delle particelle e della formazione di un gel irregolare che porta alla disgregazione della matrice impedendo il controllo del rilascio.

Il rigonfiamento della matrice avviene quando il sistema è posto a contatto con un solvente acquoso, come per esempio un fluido biologico, ed è influenzato dalla penetrazione del solvente all'interno del polimero che permette la transizione dallo stato vetroso allo stato gommoso a seguito del rilassamento delle catene polimeriche [67-69].

La transizione da stato vetroso a gommoso è accompagnata, oltre che dal rigonfiamento, anche dalla formazione di uno strato di gel sulla superficie esterna della matrice che ostacola contemporaneamente l'entrata dell'acqua e l'uscita del farmaco.

Il rigonfiamento di queste matrici può essere descritto dalla posizione dei fronti, cioè da posizioni all'interno della matrice in cui cambia lo stato fisico del polimero o del farmaco (**Figura 12**) [70].

Si possono distinguere tre fronti:

- Fronte di **swelling**: separa il nucleo vetroso dallo strato di matrice rigonfiato,
- Fronte di **diffusione**: separa il farmaco non disciolto dal farmaco in soluzione (a volte questo fronte coincide col precedente),
- Fronte di **erosione**: separa la matrice dal solvente.

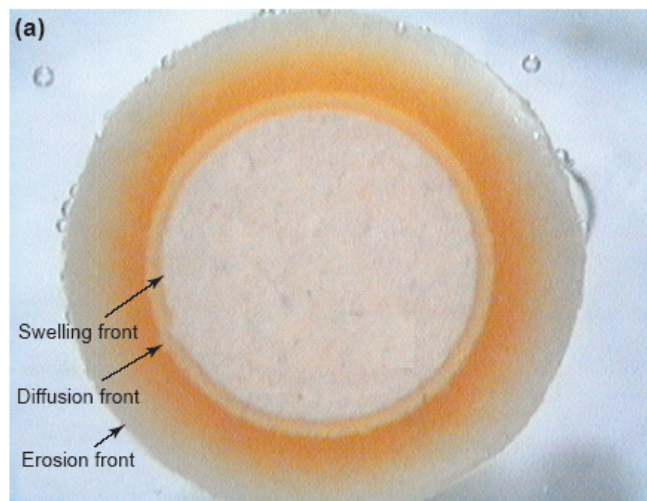


Figura 12: Base superiore di una matrice cilindrica di HPMC contenente Buflomedilpiridossalfosfato dopo un'ora di rigonfiamento.

I fronti sono continuamente in movimento e ciò è associato ai fenomeni fisici che si susseguono all'interno della matrice:

- Il movimento del fronte di **swelling** dipende dalla velocità con cui l'acqua entra nella matrice,
- Il fronte di **diffusione** cambia posizione in base alla velocità di dissoluzione del farmaco,

- Il fronte di **erosione** si sposta a seguito della dissoluzione del polimero; quando le catene polimeriche sono distanti tra loro e circondate dal solvente esse si sciolgono.

Durante il processo d'idratazione, lo spessore dello strato di gel (definito come la distanza tra il fronte di swelling e il fronte di erosione) inizialmente aumenta. L'aumento dello spessore dipende dalla penetrazione dell'acqua, dal rigonfiamento del polimero, dalla solubilità del polimero e del farmaco. Successivamente lo spessore dello strato di gel può restare costante allorché i due fronti che lo delimitano si muovono in modo sincronizzato. In seguito il fronte di erosione comincia a dissolversi e lo spessore dello strato di gel diminuisce.

La durata della sincronizzazione dei fronti dipende dalle caratteristiche del polimero, in particolare dal suo peso molecolare e dalla sua solubilità.

Il farmaco all'interno delle matrici rigonfiabili non può diffondere quando il polimero è allo stato secco, cioè vetroso. Quando il polimero si idrata, rigonfia e si forma lo strato di gel, il farmaco disciolto viene rilasciato tanto più lentamente quanto più spesso è lo strato di gel, in quanto il cammino di diffusione che deve percorrere è più lungo.

Oltre alle caratteristiche del polimero e del farmaco, i fattori che influenzano il rilascio di farmaco dalla matrice includono:

- La solubilità degli eccipienti,

- La dimensione e la forma della matrice,
- Il rapporto tra area superficiale e volume della matrice.

Il rilascio del farmaco dalla matrice è controllato dall'interazione tra acqua, polimero e farmaco [71]:

- Il **polimero** è il principale responsabile della cinetica di rilascio del farmaco in quanto le sue caratteristiche influenzano la velocità del rigonfiamento della matrice e la viscosità dello strato di gel che il farmaco deve attraversare.
- Le caratteristiche del **farmaco** che influenzano il rilascio sono la solubilità e la grandezza delle particelle: più il farmaco è solubile, più veloce sarà il rilascio.

La cinetica di rilascio del farmaco dipende dal gradiente della concentrazione di farmaco nello strato di gel e può essere descritta dall'equazione di Peppas (**eq. 1**) secondo la quale la quantità di farmaco liberata è direttamente proporzionale al tempo di rilascio elevato ad un esponente n [65, 72]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{eq. 1})$$

dove M_t rappresenta il farmaco rilasciato al tempo t , M_∞ è la quantità di farmaco rilasciato all'infinito, k è la costante cinetica e n è l'esponente diffusionale che assume valori compresi tra 0,5 e 1. Quando $n=0,5$ il rilascio del farmaco è di tipo fickiano; quando $n=1$ il farmaco segue una cinetica lineare; nel caso in cui n

assuma un valore compreso tra 0,5 e 1, la cinetica di rilascio del farmaco sarà di tipo anomalo-fickiano.

Quando il fronte di swelling e il fronte di erosione si muovono in modo sincronizzato, lo strato di gel ha spessore costante, perciò il farmaco segue una cinetica di rilascio lineare ($n=1$).

Successivamente è stata proposta un'ulteriore equazione (**eq. 2**) capace di distinguere il contributo diffusivo da quello convettivo considerandoli comunque additivi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (\text{eq. 2})$$

dove M_t/M_∞ è la frazione di farmaco rilasciata al tempo t , k_1 è la costante legata al contributo diffusionale, k_2 è una costante legata al rilassamento delle catene polimeriche, m è l'esponente diffusionale legato alla geometria del sistema.

1.3.1 Tecnologia Dome Matrix®

Recentemente nei Laboratori del Dipartimento Farmaceutico dell'Università di Parma è stata sviluppata una nuova strategia per la produzione di forme farmaceutiche a rilascio modificato definita "assemblaggio di moduli". Questa tecnologia consiste nella costruzione di un sistema di rilascio ottenuto dall'assemblaggio di due o più moduli [73-75].

Un modulo è una matrice idrofila a forma di disco avente una base concava ed una convessa. A causa della forma della sezione assiale del modulo che assomiglia ad una cupola, prende il nome di Dome Matrix® (**Figura 13**).

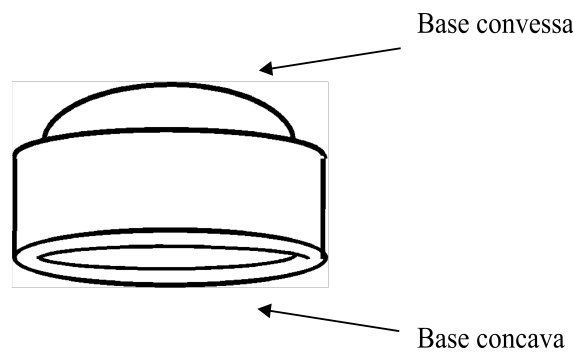


Figura 13: Rappresentazione schematica della forma di una Dome Matrix®.

La tecnologia Dome Matrix® consente di assemblare diversi moduli in modo da costruire un unico sistema a rilascio modificato. Il vantaggio di questa tecnologia innovativa risiede proprio nell'approccio modulare.

Inizialmente l'assemblaggio era ottenuto per saldatura ad ultrasuoni. Solo successivamente, la modifica dei moduli [75] ha permesso di ottenere un assemblaggio mediante semplice incastro meccanico. Infatti la nuova configurazione dei moduli (**Figura 14**) presenta un particolare gradino sulla

faccia convessa che gli permette di incastrarsi mediante un “click” nella faccia concava dei moduli femmina.

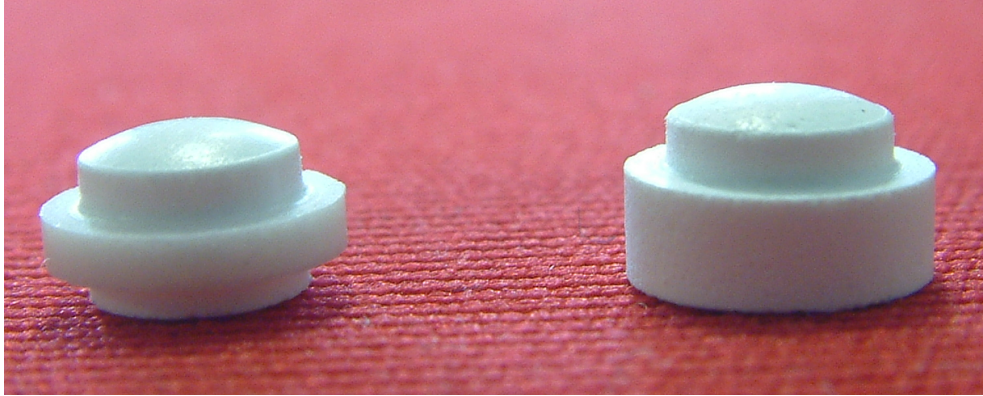


Figura 14: *Moduli Dome Matrix® di “seconda generazione” che presentano un gradino sulla faccia convessa.*

Ogni modulo viene prodotto per compressione in modo indipendente consentendo così anche l’assemblaggio di moduli di composizione diversa, che rilasciano il farmaco con cinetiche differenti e moduli contenenti principi attivi diversi, superando così limiti di incompatibilità tra sostanze con diverse proprietà chimico-fisiche o farmacodinamiche.

Grazie alla notevole versatilità nell’assemblaggio dei moduli, questa tecnologia offre la possibilità di ridurre il numero e la frequenza delle somministrazioni, fondamentale per aumentare la compliance del paziente soprattutto nelle terapie multiple, come nel caso della triplice terapia prevista per l’eradicazione dell’*Helicobacter Pylori*.

Inoltre tale tecnologia permette di controllare non solo la cinetica di rilascio del farmaco ma anche il sito d’azione, avendo così in un unico sistema un controllo spazio-temporale del rilascio di farmaco [75].

I moduli Dome Matrix® possono presentarsi con due diverse geometrie, definite come modulo “maschio” e modulo “femmina”.

- *Modulo “maschio”*

Il modulo maschio è caratterizzato da una protrusione ad anello sulla base concava (Figura 15).

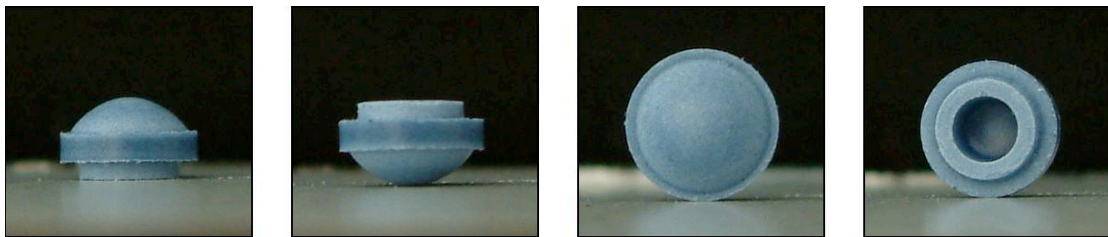


Figura 15: Modulo Dome Matrix® “maschio”.

- *Modulo “femmina”*

Il modulo femmina (Figura 16) è caratterizzato da una base concava che permette l’inserimento della protrusione anulare del modulo maschio, come anche l’inserimento della base convessa di un altro modulo maschio o femmina.

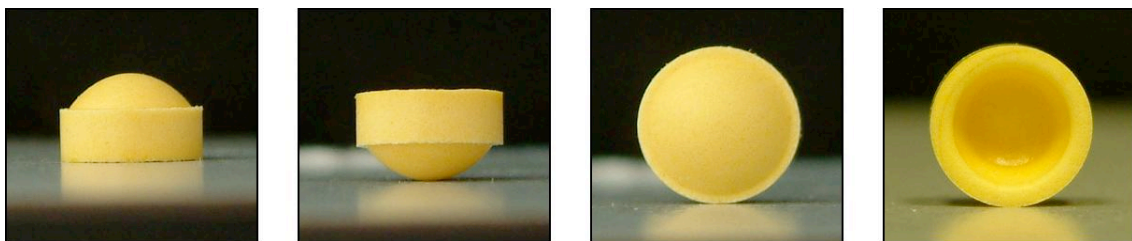


Figura 16: Modulo Dome Matrix® “femmina”.

L'assemblaggio dei moduli prodotti può avvenire in due configurazioni sulla base delle caratteristiche dei due diversi tipi di moduli: Configurazione Impilata (a) e Configurazione a Camera Vuota (b).

a. Configurazione Impilata

Questo tipo di configurazione (**Figura 17**) si ottiene inserendo la base convessa di un modulo sulla base concava dell'altro. In questo modo è possibile assemblare più moduli controllando la velocità di rilascio del farmaco sulla base del rapporto volume/superficie esposta al mezzo di dissoluzione.

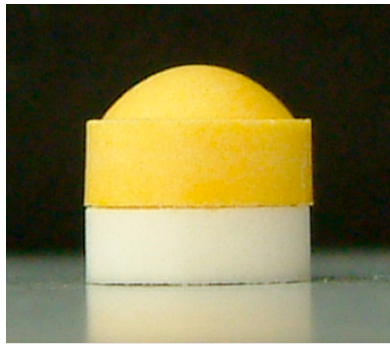


Figura 17: *Moduli Dome Matrix® assemblati in Configurazione Impilata.*

b. Configurazione "a Camera Vuota"

La configurazione a camera vuota è ottenuta inserendo la protrusione anulare del modulo maschio nella base concava del modulo femmina si ottiene una configurazione denominata "a camera vuota". (**Figura 18.a**)

L'incastro delle basi concave dei due moduli determina la formazione di una camera d'aria all'interno del sistema che gli conferisce proprietà di galleggiamento. (Figura 18.b)

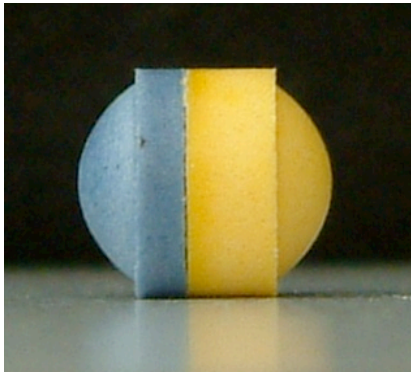


Figura: 18.a

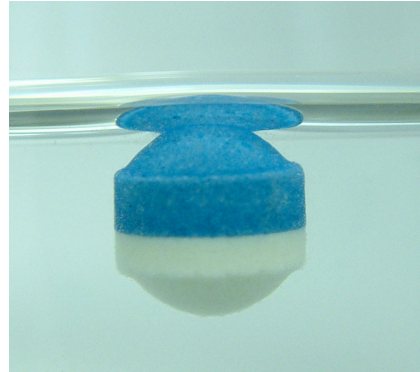


Figura: 18.b

Figura 18: a) *Moduli Dome Matrix® assemblati in configurazione "a camera vuota"*
b) *Galleggiamento della configurazione "a camera vuota"*

Una configurazione di questo tipo può essere utile nel caso di farmaci con finestra di assorbimento e sito d'azione nel tratto gastrico. Infatti, la capacità di galleggiamento del sistema permette una maggiore permanenza della forma farmaceutica nello stomaco, controllandone anche il rilascio.

In particolare, la tecnologia Dome Matrix® e la configurazione "a camera vuota" possono essere sfruttate nello sviluppo di forme farmaceutiche orali per la terapia di patologie causate da *Helicobacter Pylori*. I principi attivi, somministrati contemporaneamente, sarebbero così a diretto contatto con l'agente patogeno per un periodo di tempo superiore rispetto alle normali forme farmaceutiche orali, senza dover attendere che il farmaco venga prima

assorbito a livello intestinale e poi secreto a livello gastrico tramite la circolazione sanguigna [22, 75].

Ovviamente anche per queste forme farmaceutiche gastroretentive bisogna tener conto dello svuotamento gastrico. I fattori che influenzano lo svuotamento gastrico (e quindi il tempo di ritenzione) di forme farmaceutiche orali sono la densità, la forma e le dimensioni della forma farmaceutica stessa, la contemporanea assunzione di cibo o di farmaci come agenti anti-colinesterasici, oppiacei e agenti pro cinetici, oltre che i fattori biologici quali età, sesso, razza, indice di massa corporea e presenza di stati patologici [76, 77].

Nello sviluppo di queste particolari forme farmaceutiche gastroretentive occorre valutarne le *dimensioni* e la *densità*. Il diametro dello sfintere pilorico nell'uomo è di 12 ± 7 mm, quindi per queste forme farmaceutiche è importante che il diametro sia superiore ai 15 mm perché il sistema non venga evacuato direttamente, ma subisca le onde peristaltiche del processo definito Complesso Motorio Migrante Interdigestivo [78].

La densità invece determina la posizione che il sistema occuperà nello stomaco. Generalmente, perché un sistema galleggi nello stomaco è importante che la sua densità sia inferiore rispetto alla densità del fluido gastrico. In letteratura è riportato un valore indicativo di densità pari a 1,0 g/ml [76].

Sistemi con una densità maggiore si posizioneranno sul fondo dello stomaco.

Recenti studi di fisiologia hanno dimostrato come formulazioni monolitiche non disintegranti rimangono nello stomaco fino alla fine della digestione (fed

phase) e vengono poi espulse durante la fase III del complesso motorio migrante [79].

2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questa ricerca di dottorato è stato quello di applicare la tecnologia Dome Matrix® per lo sviluppo di un unico sistema di rilascio per somministrare i farmaci in combinazione necessari nella cura dell'*Helicobacter Pylori*. Come già descritto precedentemente nell'introduzione, i principali limiti della terapia attualmente utilizzata consistono in una sempre più elevata resistenza del batterio agli antibiotici in uso e in una scarsa compliance del paziente a causa dell'elevato numero di prodotti da assumere più volte al giorno. Le dimenticanze dei pazienti, unite ad un uso a volte sconsiderato degli antibiotici, comportano un incremento sempre maggiore della resistenza batterica e la necessità di somministrare dosi sempre maggiori di antibiotico e/o di associare un numero sempre maggiore di farmaci.

La configurazione denominata "a camera vuota" della tecnologia Dome Matrix®, ottenuta unendo la faccia concava di un modulo con la faccia concava di un altro modulo creando così una cavità interna, è in grado di galleggiare nel fluido gastrico. Si è perciò pensato di applicare questo vantaggio della tecnologia Dome Matrix® per la somministrazione dei due antibiotici (claritromicina e amoxicillina) che devono agire a livello dello stomaco. Un rilascio dei farmaci a diretto contatto con l'agente patogeno (che risiede nello stomaco) potrebbe aumentarne l'efficacia, riducendo la dose somministrata e il rischio di comparsa di ceppi resistenti. Il diretto contatto tra farmaco e batterio potrebbe consentire di raggiungere la MIC con dosi di farmaco molto più basse. Questo potrebbe rappresentare un vantaggio non solo perché consentirebbe di

ridurre la quantità di antibiotico somministrato, ma soprattutto perché riducendo le dosi necessarie permetterebbe di co-somministrare i due farmaci in un'unica forma farmaceutica. Infatti sarebbe possibile sfruttare un altro vantaggio della tecnologia Dome Matrix®, che permette di somministrare contemporaneamente più moduli incastrati tra loro, contenenti principi attivi diversi liberati con cinetiche di rilascio differenti.

Inoltre proprio quest'ultimo aspetto della politerapia, potrebbe essere sfruttato per inserire sul sistema anche un modulo contenente il terzo farmaco della terapia, l'omeprazolo.

In questo modo si potrebbe ottenere in un'unica forma farmaceutica somministrata, la politerapia necessaria all'eradicazione dell'*Helicobacter Pylori*. Si avrebbe così una maggiore compliance del paziente, che dovrebbe assumere una sola forma farmaceutica, e una riduzione delle dosi di antibiotico, riuscendo così a superare i limiti critici che attualmente presenta la terapia utilizzata per l'eradicazione dell'*Helicobacter Pylori*.

La strategia formulativa si è così sviluppata:

- Produzione di assemblati contenenti le dosi consigliate per la terapia (500 mg di claritromicina e 1000 mg di amoxicillina). Possono essere utilizzati sia sistemi void di diametro 7,4 mm sui quali dovevano essere impilati più moduli, sia sistemi di dimensioni maggiori (11 mm) che consentono di caricare più farmaco.

- Possibilità di ridurre le dosi e quindi il numero dei moduli dei singoli antibiotici, sfruttando la capacità degli assemblati di galleggiare nello stomaco e di rilasciare la dose a diretto contatto con l'agente patogeno
- Associazione dei due farmaci e unione di un ulteriore modulo di omeprazolo per ottenere un'unica forma farmaceutica da somministrare ai pazienti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

- Amoxicillina Triidrato (lotto AMX 08692 e lotto n. R0800449, Farmalabor, Milano, Italia);
- Amoxicillina Triidrato per compressione diretta (lotto N. B8800344, Sandoz GmbH, Kundl, Austria);
- Claritromicina (lotto n. CLA 123-M, Special Product's Line, Pomezia, Roma, Italia);
- Omeprazolo (lotto n. 13500810011, Doppel, Cortemaggiore, Piacenza, Italia);
- Idrossipropilmetilcellulosa (METHOCEL® K100 Premium e K15M Premium CR EP, Colocorn Limited, Orpington, Kent, Gran Bretagna);
- Polivinilpirrolidone (KOLLIDON K30 e KOLLIDON CL, BASF, Dortmund, Germania);
- Cellulosa microcristallina (lotto n. 7349, Avicel pH102, FMC Biopolymer, Wallingstown, Little Island, Cork, Irlanda);
- Polietilenglicole (PEG 6000, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, CH-9417 Buchs, Germania);

- Magnesio Ossido Pesante (lotto n. 470982600, Giusto Favelli, Milano, Italia);
- Sodio Croscarmellosso (AC-Di-Sol, type SD-711, lotto n. TO646C, FMC, Italia);
- Gliceril Beenato (Compritol 888, lotto n. 104561, Gattefossè, Francia);
- Eritromicina (Sigma Aldrich)
- Oxacillina (Sigma Aldrich).

Inoltre sono stati utilizzati:

- Carbonato di sodio
- Talco;
- Magnesio Stearato;
- Cloruro di sodio;
- Potassio fosfato monobasico;
- Sodio fosfato monobasico;
- Sodio fosfato dibasico;
- Sodio Borato decaidrato;
- Sodio edetato;
- Idrossido di sodio
- Acido cloridrico 37%;

- Acetonitrile;
- Metanolo;
- Etanolo;
- Acido fosforico 85%;
- Bario Solfato;
- Acido Formico.

Tutti i materiali utilizzati sono di grado analitico secondo F.U.I. XII ed.

3.2 Metodi

3.2.1 Preparazione del Granulato

- **A secco**

La miscela di polveri, costituita da principio attivo ed eccipienti, utilizzata per la preparazione del granulato a secco, è stata miscelata in Turbula (WAB, Basilea, Svizzera) per 20-25 minuti. La miscela così ottenuta è stata compressa tramite comprimitrice alternativa (KORSCH, Mod. 9341-72, Berlino, Germania) allestita con punzoni rialzati da 20 mm di diametro in modo da ottenere slabs sottili e non eccessivamente resistenti alla rottura. Questi slabs sono stati frantumati grossolanamente in mortaio e successivamente granulati con granulatore a braccio oscillante (ERWEKA AR400 D, Dusseldorf, Germania), prima con rete avente apertura di maglia da 1 mm per ridurre le dimensioni dei frammenti e in seguito con una rete di apertura di maglia da 0.8 mm per ottenere il granulato finale.

- **A umido**

La miscela di polveri, costituita da principio attivo ed eccipienti, utilizzata per la preparazione del granulato a umido, è stata miscelata in Turbula (WAB, Basilea, Svizzera) per 20-25 minuti. In seguito alla miscela di polveri è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione legante composta da:

- Acqua/EtanoLO (50/50)
- PVP K30 5% w/w
- PEG 6000 5% w/w.

L'impasto ottenuto è stato granulato con granulatore a braccio oscillante (ERWEKA AR400 D, Dusseldorf, Germania) allestito con rete di apertura di maglia da 0.8 mm. Il granulato umido è stato essiccato in stufa per 5 ore a circa 45 °C.

3.2.2 Determinazione dell'Umidità Residua del Granulato

Il contenuto di umidità residua del granulato essiccato in stufa è stato determinato mediante lo strumento TitroMatic Karl Fischer (CRISON INSTRUMENTS, S.A., Barcellona, Spagna). Lo strumento esegue una titolazione volumetrica sulla quantità di acqua contenuta nel campione mediante l'utilizzo di una soluzione titolante HYDRANAL[®]-Composite 5 (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Svizzera).

3.2.3 Allestimento delle Miscele

Le miscele fisiche per la compressione dei moduli sono state preparate miscelando i vari componenti in Turbula (WAB, Basilea, Svizzera) per circa 20-25 minuti.

3.2.4 Preparazione dei Moduli di Rilascio per Compressione

Per la compressione si è utilizzata una comprimitrice alternativa (EKO Korsh, Berlin, Germania) allestita con appositi punzoni per Dome Matrix[®]. Possono essere prodotti moduli Dome Matrix[®] di due diametri differenti: 7,4 mm oppure 11 mm.

In funzione del tipo di modulo che si deve ottenere (un modulo “maschio” o “femmina”) la comprimitrice è allestita con punzoni superiori diversi. Nel caso del modulo “maschio”, il punzone superiore è caratterizzato da una particolare conformazione “ad incastro” in grado di inserirsi in una particolare base concava che caratterizza il punzone superiore “femmina”.

Se si vogliono ottenere moduli ad incastro per costruire sistemi impilati, il punzone inferiore ha una base concava particolare che ne permette l’incastro nella base convessa di un modulo femmina. Se invece si vogliono ottenere moduli finali di un sistema impilato, il punzone inferiore ha una concavità più semplice e tondeggiante. Il punzone inferiore da 11 mm esiste solo nella conformazione tondeggiante, perciò è possibile produrre solo sistemi “a camera vuota” sui quali non è possibile impilare nessun modulo. Al contrario i punzoni inferiori da 7,4 mm esistono in entrambe le conformazioni, dando origine a più possibili assemblati.

Prima di procedere alla compressione si calcola il peso che dovrebbe avere ogni compressa tenendo conto della sua composizione.

I moduli compressi sono stati pesati e sono stati scartati quelli che differivano dal peso calcolato per valori superiori o inferiori al 5%, secondo quanto riportato in F.U.I. XII ed.

3.2.5 Assemblaggio dei Moduli

La speciale geometria dei moduli di rilascio è stata progettata per consentire ai moduli di essere assemblati in differenti configurazioni con la possibilità di creare vari sistemi di rilascio del farmaco. L'assemblaggio dei moduli di rilascio è stato effettuato mediante incastro.

3.2.6 Controlli Tecnologici sulle Compresse

3.2.6.1 Resistenza alla rottura delle compresse

La misura della resistenza alla rottura delle compresse è stata effettuata secondo il metodo riportato in F.U.I. XII ed. Sono stati testati 10 moduli femmina e 10 moduli maschio utilizzando l'apparecchio Monsanto. La compressa è tenuta saldamente tra due supporti, uno fisso e uno mobile. Il supporto mobile è collegato ad una molla tramite la quale viene esercitata una pressione mediante una vite girevole.

I risultati sono stati espressi come media dei valori delle forze applicate in Kg.

3.2.6.2 Friabilità delle compresse

La misura della friabilità delle compresse è stata effettuata secondo il metodo riportato in F.U.I. XII ed.

10 moduli femmina e 10 moduli maschio, preventivamente pesati, sono stati testati mediante il friabilometro Roche (Erweka® GmbH, Düsseldorf, Germania) costituito da un tamburo rotante avente diametro di 30 cm e spessore di 4 cm, girevole su un supporto a cuscinetti a sfera.

Il saggio ha una durata di 4 minuti durante i quali vengono effettuati 25 giri per minuto. All'interno del tamburo di plexiglas è fissato un setto ricurvo che trascina le compresse dal basso verso l'alto ad ogni giro. Le compresse sono sottoposte ad abrasione per rotolamento e ad urti dovuti alle cadute libere.

Alla fine del saggio i moduli sono stati pesati: la perdita di peso, espressa in percentuale, è indice della friabilità delle compresse.

Secondo la F.U.I. XII ed. la perdita massima non deve essere superiore all'1% del peso delle compresse.

3.2.6.3 Resistenza agli urti degli assemblati

Il test con il friabilometro è stato adattato per valutare la capacità dei sistemi ad incastro di restare assemblati. A tale scopo sono stati testati 20 assemblati. Tali assemblati sono stati posti nel friabilometro e fatti rotolare a 25 rpm per 4 minuti. È stata determinata la percentuale di assemblati rimasti chiusi.

3.2.7 Determinazione del titolo di amoxicillina in UV-Visibile

La determinazione del titolo di amoxicillina mediante spettrofotometro UV-Visibile è stata eseguita frantumando preventivamente 10 moduli in un mortaio. Dalla polvere ottenuta sono stati pesati 3 campioni corrispondenti ciascuno al peso medio di una compressa. Ogni campione è stato sciolto in un volume appropriato di tampone fosfato pH 7,4.

Lo standard è stato preparato sciogliendo 18 mg di amoxicillina con tampone fosfato pH 7,4 in un matraccio da 100 ml. La lettura dei campioni viene

effettuata, dopo aver filtrato con filtro a chiocciola da 0,45 mm, ad una lunghezza d'onda di 272,81 nm, come descritto in sezione 3.2.13.

3.2.8 Determinazione del titolo di amoxicillina in HPLC

Per il titolo dei moduli di amoxicillina mediante HPLC sono stati pesati e frantumati in mortaio quattro moduli. Dalla polvere ottenuta sono stati pesati 3 campioni corrispondenti ciascuno al peso medio di una compressa, trasferiti in un matraccio tarato da 1L e disciolti in tampone fosfato a pH 7.4. Lo standard è stato preparato sciogliendo 20 mg di amoxicillina in tampone fosfato a pH 7.4 in un matraccio tarato da 100 ml. I campioni sono stati poi analizzati in HPLC con il metodo descritto in sezione 3.2.14.

3.2.9 Determinazione del titolo di claritromicina

Il titolo dei moduli prodotti è stato ottenuto secondo le indicazioni riportate nella monografia della USP XXXI ed.

Sono stati pesati un numero di moduli tali da contenere almeno 2 g di principio attivo. Le compresse sono state frantumate in un mortaio e la polvere ottenuta è stata trasferita in un matraccio tarato da 500 ml, in cui sono stati aggiunti circa 350 ml di metanolo. La sospensione è stata sonicata per 30 minuti e lasciata riposare per 16 ore. Successivamente si è portato a volume con metanolo.

3 ml del surnatante sono stati trasferiti in un matraccio tarato da 100 ml e portati a volume con la fase mobile descritta nella sezione 3.2.9.

La soluzione standard è stata preparata secondo le indicazioni riportate su USP XXXI ed. Sono stati pesati circa 30 mg di claritromicina che sono stati sciolti in 50 ml di metanolo. 10 ml di soluzione sono stati trasferiti in un altro matraccio tarato da 50 ml e portati a volume con la fase mobile descritta nella sezione 3.2.15. I campioni così preparati sono stati poi analizzati in HPLC con il metodo descritto in sezione 3.2.15.

3.2.10 Determinazione del titolo di omeprazolo

Il titolo dei moduli di omeprazolo è stato determinato seguendo le indicazioni contenute nella monografia della USP XXXI ed.

Sono stati pesati 20 moduli e frantumati in mortaio. Sono stati pesati 3 campioni di polvere corrispondenti alla quantità di principio attivo presente in ogni compressa (20 mg). Ciascun campione è stato trasferito in un matraccio tarato da 100 ml e addizionato con 50 ml di diluente, preparato come descritto in sezione 3.2.16. I matracci sono stati sonicati per circa 15 minuti e poi portati a volume con diluente. I campioni sono stati filtrati con filtro a chiocciola 0,45 mm prima di essere analizzati in HPLC con il metodo descritto in sezione 3.2.12.

3.2.11 Test di Disgregazione

Il test di disgregazione è stato effettuato sui moduli a rilascio immediato. La misura del tempo di disgregazione è stata determinata secondo la procedura riportata in F.U.I. XII Ed., utilizzando come mezzo il fluido gastrico simulato pH 1,2 (preparato secondo la monografia della F.U.I. XII Ed.). L'apparecchio (Diesseinstrument, Milano, Italia) utilizzato per la misura del tempo di disgregazione ha come componente essenziale un cestello in plexiglas con all'interno 6 tubi di vetro aperti. I tubi di vetro sono tenuti insieme in posizione verticale da 2 dischi di plastica, ciascuno di 90 mm di diametro e di 6 mm di spessore, recanti 6 fori.

Sotto al disco inferiore è fissata una rete a maglie di acciaio inossidabile con apertura da 2 mm. Ogni tubo è provvisto di un disco cilindrico di materiale plastico trasparente.

Il cestello è alzato ed abbassato, con movimento meccanico, dentro un becker contenente il mezzo di disgregazione, termostato a 37°C.

In ciascuno dei 6 tubi è inserita una compressa appoggiandole sopra un dischetto; il cestello è immerso nel becker e si accende l'apparecchio programmando per 15 minuti il movimento meccanico del cestello. Per ogni compressa si considera il tempo di completa disgregazione, ovvero quando nessun residuo rimane nel cestello. Il tempo di disgregazione viene effettuato su 6 compresse di cui si calcola il valore medio.

Il limite imposto dalla F.U.I. XII Ed., entro il quale tutte le compresse devono disgregare, è 15 minuti.

3.2.12 Test di Dissoluzione

I test di dissoluzione sono stati condotti utilizzando due apparati differenti a seconda dei moduli analizzati.

Apparatus II

Nel caso dei moduli di amoxicillina e claritromicina, e nel caso dei sistemi assemblati, i test di rilascio in vitro sono stati eseguiti mediante dissoluzione nell'Apparato II (U.S.P. XXXI ed.). Il dissolutore (ERWEKA DT6R, Dusseldorf, Germania) è dotato di agitatore a paletta (paddle) azionato alla velocità di 75 rpm. I test di dissoluzione sono stati effettuati in fluido gastrico simulato (senza enzimi) a pH 1,2 (F.U.I. XII Ed.) termostato a 37 °C. Il fluido gastrico simulato pH 1,2 è stato preparato aggiungendo 2g di NaCl e 7 ml di HCl 37% per ogni litro di acqua deionizzata e degasata. In ogni vessel contenente 900 ml di fluido gastrico simulato sono stati introdotti i sistemi Dome Matrix® da testare. Un ulteriore vessel (due nel caso di dissoluzione del sistema contenente sia amoxicillina che claritromicina) è stato riempito con 880 ml di fluido gastrico simulato in cui è stata aggiunta una quantità nota di claritromicina o amoxicillina preventivamente disciolte rispettivamente in 20 ml di metanolo o di fluido gastrico simulato. Ad intervalli di tempo predefiniti sono stati prelevati alcuni ml di soluzione da ogni vessel, filtrati attraverso filtro idrofilo a chiocciola 0,45 mm e successivamente analizzati mediante spettrofotometria UV o HPLC a seconda del tipo di principio attivo analizzato (come descritto nella sezione 3.2.13, 3.2.14 e 3.2.15). In ogni vessel la quantità di soluzione prelevata è

stata immediatamente reintegrata con fluido gastrico simulato per mantenere il volume di dissoluzione costante.

I tempi del test di dissoluzione variano a seconda del tipo di sistema preso in esame:

- Sistema modulare di claritromicina: lo studio è stato eseguito in un intervallo di tempo di 8 h effettuando prelievi a: 15', 30', 45', 60', 90', 120', 180', 240', 300', 360', 420', 480';
- Sistema modulare di amoxicillina: lo studio è stato eseguito in un intervallo di tempo di 24 h, per avere la completa dissoluzione dei moduli, effettuando prelievi a: 15', 30', 45', 60', 90', 120', 180', 240', 300', 360', 420', 480', 1440';
- Sistema modulare contenente entrambi i principi attivi: lo studio è stato eseguito in un intervallo di tempo di 24 h con gli stessi tempi di prelievo precedentemente descritti.

Apparatus IV

Nel caso dei moduli di omeprazolo, siccome la quantità di principio attivo contenuta è molto bassa, è stato utilizzato il dissolutore a flusso continuo (Apparato IV, U.S.P. XXXI ed.). Il dissolutore (Sotax CH-4008, Basel, Svizzera, pompa Sotax CY-7, Basel, Svizzera) è stato equipaggiato con la cella di piccole dimensioni e la velocità di flusso è stata settata a 10 ml/min. I test di dissoluzione sono stati effettuati in fluido gastrico simulato (senza enzimi) a pH 1,2 termostato a 37 °C. Tutte le parti del sistema (cella e tubicini) sono stati

ricoperti con carta di alluminio per proteggere il principio attivo che in soluzione è fotosensibile. Dopo aver condizionato il sistema, un modulo di omeprazolo è stato inserito nella cella. I prelievi sono stati effettuati ogni minuto fino a completa dissoluzione del modulo. Siccome l'omeprazolo è molto sensibile all'ambiente acido e si degrada molto rapidamente, è necessario bloccare la degradazione del principio attivo nel campione prelevato. I 10 ml prelevati sono stati sgocciolati in una provetta graduata contenente tampone pH 11 allo scopo di aumentare il pH della soluzione bloccando la degradazione. Il tampone pH 11 è stato preparato secondo U.S.P. XXI ed. dissolvendo 7,6 g di sodio borato deca idrato e 1 g di edetato disodico in 800 ml di acqua. Il pH della soluzione è stato aggiustato a pH 11 utilizzando una soluzione di soda al 50%. Infine sono stati aggiunti 400 ml di etanolo e la soluzione è stata portata a volume (2000 ml) con acqua.

La determinazione quantitativa del principio attivo è stata effettuata mediante HPLC come indicato in sezione 3.2.16.

3.2.13 Determinazione quantitativa di amoxicillina in UV-Visibile

Per determinare il contenuto di amoxicillina nei campioni prelevati durante la dissoluzione è stata effettuata un'analisi con spettrofotometro UV-Visibile. Le letture sono state effettuate ad una lunghezza d'onda di 272,81 nm.

3.2.14 Determinazione quantitativa di amoxicillina in HPLC

Per determinare il contenuto di amoxicillina nei campioni prelevati durante la dissoluzione, è stata effettuata un'analisi HPLC (High performance liquid chromatography).

L'analisi è stata effettuata utilizzando un cromatografo SCHIMADZU provvisto di una pompa isocratica (LC-10AS), di un rivelatore spettrofotometrico UV-Visibile (SPD-10 A) e di un integratore (C-R6A).

Il metodo cromatografico utilizzato ha previsto le seguenti condizioni:

- Colonna Hypersil MOS (Hp Hewlett Packard, Germania), di lunghezza 4,6 mm e diametro 100 mm, impaccata con gel di silice (5 μ m);
- Temperatura ambiente;
- Fase mobile, ad un flusso di 1,0 ml/min, preparata miscelando Acetonitrile e Tampone fosfato a pH 5 in rapporto 10:90;
- Spettrofotometro impostato a lunghezza d'onda di 230 nm;
- Volume di iniezione 20 μ l;
- Il tempo di durata dell'analisi è di 5 minuti.

3.2.15 Determinazione quantitativa di claritromicina in HPLC

La determinazione quantitativa di claritromicina contenuta nei campioni prelevati durante il test di dissoluzione è stata eseguita mediante HPLC (High performance liquid chromatography) utilizzando la metodica riportata in F.U.I. XII ed.

E' stato utilizzato un cromatografo SCHIMADZU provvisto di una pompa isocratica (LC-10AS), di un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile (SPD-10^o) e di un integratore (C-R6A).

Il metodo cromatografico prevedeva le seguenti condizioni:

- Colonna Supercosil LC18 (Supelco, Sigma Aldrich, Bellefonte, USA) di lunghezza 150 mm e con diametro interno 4,6 mm, impaccata con gel di silice ottadecilsilicato per cromatografia (5 µm), e termostatata a 50°C;
- Fase mobile, ad un flusso di 1 ml/min, preparata miscelando 1,3 L di metanolo, 700 ml di acqua distillata degasata e 6,4 g di KH₂PO₄. Il pH della fase mobile è stato portato a 4 con l'aggiunta di qualche goccia di acido fosforico 85% dopo averla filtrata su filtro lipofilo;
- Spettrofotometro impostato a lunghezza d'onda di 210 nm;
- Volume d'iniezione 50 µl;
- Il tempo di durata dell'analisi è di 8 minuti.

3.2.16 Determinazione quantitativa di omeprazolo in HPLC

La determinazione quantitativa di omeprazolo contenuto nei campioni prelevati durante il test di dissoluzione in flusso continuo è stata effettuata mediante HPLC (High performance liquid chromatography) utilizzando la metodica indicata in U.S.P. XXXI ed. E' stato utilizzato un cromatografo SCHIMADZU provvisto di una pompa isocratica (LC-10AS), di un rivelatore spettrofotometrico UV-Visibile (SPD-10 A) e di un integratore (C-R6A).

Il metodo cromatografico utilizzato ha previsto le seguenti condizioni:

- Colonna Supelcosil LC-8 (Supelco, Sigma-Aldrich, Germania), 4,6 X 150 mm, impaccata con gel di silice (5 μ m);
- Temperatura ambiente;
- Fase mobile, ad un flusso di 0,8 ml/min, preparata miscelando Acetonitrile e Tampone fosfato pH 7,6 in rapporto 25:75;
- Spettrofotometro impostato a lunghezza d'onda di 280 nm;
- Volume di iniezione 20 μ l;
- Il tempo di durata dell'analisi è di 9 minuti.

3.2.17 Calcolo della costante di dissoluzione

Il calcolo della costante di dissoluzione K_{diss} è stato eseguito riportando in grafico la quantità di farmaco rilasciato in funzione del tempo, espresso in ore. Sono state ottenute in tutti i casi degli andamenti lineari, evidenza di una cinetica lineare di ordine zero. Dalla retta di interpolazione dei dati di

dissoluzione si ottiene un'equazione il cui coefficiente angolare corrisponde alla K_{diss} .

3.2.18 Simulazione della quantità di farmaco presente a livello gastrico

E' possibile simulare la quantità di principio attivo presente a livello gastrico utilizzando il programma di simulazione STELLA (ISEE SYSTEMS INC. LEBANON, NH, USA) [80]. Per spiegare la logica che il programma utilizza per la simulazione, si può sfruttare l'analogia con l'idraulica, in cui comparti si riempiono e si svuotano secondo flussi, determinati dai volumi dei liquidi contenuti e dalla velocità di svuotamento [81].

La modellizzazione dei sistemi dinamici può essere eseguita mediante equazioni matematiche che descrivono i cambiamenti delle variabili in funzione del tempo. Il sistema si costituisce di una serie di equazioni che vengono risolte in funzione del tempo ed hanno un'unica soluzione. I valori assunti dalle variabili cambiano in tempo reale seguendo l'evoluzione del sistema. Queste equazioni però non rappresentano in modo accurato il sistema reale poiché vengono apportate delle semplificazioni.

La prima funzione del programma STELLA è quella di fornire un metodo mediante il quale l'utilizzatore sia in grado di descrivere il sistema e costruire equazioni di velocità senza l'impiego di un linguaggio matematico.

In **Figura 19** è riportato il modello utilizzato in questo studio per simulare il contenuto gastrico dei principi attivi.

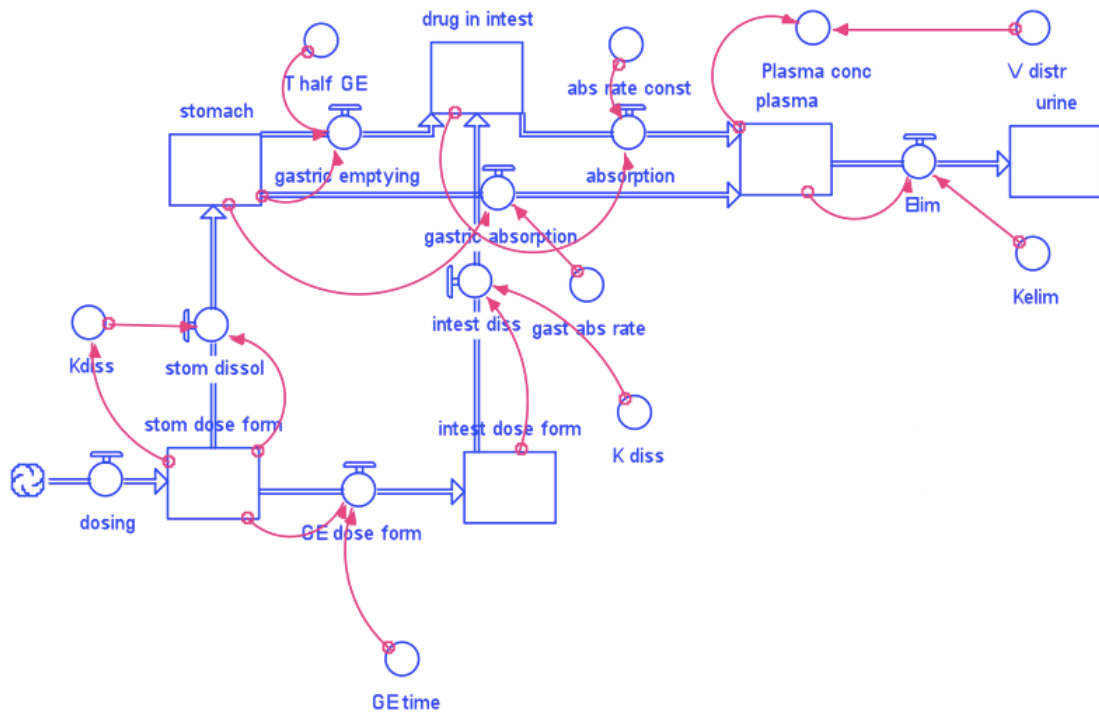


Figura 19: Schema del modello di simulazione del contenuto di farmaco nell'organismo

Il metodo dell'analisi numerica lavora nel modo seguente:

- Determinazione delle variabili e delle equazioni che le costituiscono;
- Determinazione esatta delle condizioni iniziali del sistema;
- Elaborazione da parte del programma.

L'elaborazione da parte del programma consiste nell'incremento di piccoli intervalli di tempo chiamati "step time" o "time increment". Il programma calcola, utilizzando le equazioni di velocità, quanto ciascuna variabile cambia in tale tempo e se le altre variabili restano costanti. Ed è proprio questo il punto critico del metodo di calcolo. Nella realtà tutte le variabili cambiano simultaneamente e per questo motivo i metodi di calcolo basati sulla pura

matematica incontrano difficoltà. Nel metodo di analisi numerica si può scegliere un intervallo di tempo così corto in modo che nessuna variabile cambi significativamente e calcolare il nuovo valore di ciascuna variabile sulla base del precedente valore ottenuto. In questo modo si ottiene un set di nuovi valori per tutte le variabili che differiscono dallo stato iniziale. Si procede in questo modo sino ad ottenere un comportamento tempo dipendente del sistema.

3.2.19 Analisi dei dati di dissoluzione

I profili di dissoluzione delle diverse formulazioni sono stati confrontati mediante il calcolo del fattore di similarità f_2 (eq. 3).

$$f_2 = 50 * \log \left(\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right) \quad (\text{eq.3})$$

dove n rappresenta il numero dei punti di confronto tra le due curve, $R(t)$ è la media della percentuale di farmaco rilasciato da una formulazione e $T(t)$ è la media della percentuale di farmaco rilasciato da un'altra formulazione. Se f_2 assume valori compresi tra 50 e 100 significa che le due curve di dissoluzione sono simili, se f_2 risulta minore di 50 le curve si considerano diverse.

3.2.20 Studi di Galleggiamento

La misura della forza di galleggiamento è un parametro essenziale per la caratterizzazione di un sistema gastroflottante. Nel 1993 Timmermans e Moes costruirono un apparato in grado di misurare le variazioni della forza di galleggiamento nel tempo sottoforma di *resultant weight* [79]. Questa forza, per un oggetto posto in un fluido a densità nota, è definita come la differenza tra la forza peso e la forza di galleggiamento (**Figura 20**) (**eq. 4**).

$$F_{\text{result}} = F_{\text{buoyant}} - F_{\text{gravity}} \quad (\text{eq. 4})$$

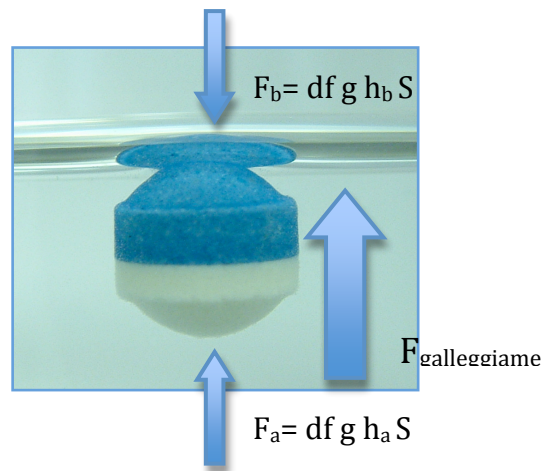


Figura 20 Schema delle forze che agiscono su un oggetto posto in un fluido.

Per convenzione si attribuisce una *resultant weight* positiva ad un sistema galleggiante e una *resultant weight* negativa ad un sistema che tende a non emergere dal fluido in cui è immerso. In particolare, la capacità di galleggiamento di un oggetto è funzione della sua densità e del suo volume.

Esprimendo le forze dell'**eq. 4** in funzione di densità e volume si ottiene:

$$F_{rw} = (df - ds) gV \quad (\text{eq. 5})$$

dove df è la densità del fluido, g l'accelerazione di gravità, ds la densità dell'oggetto immerso nel fluido e V il volume dell'oggetto. Lo strumento messo a punto da Timmermann e Moes per misurare F_{rw} è schematicamente rappresentato in **Figura 21**.

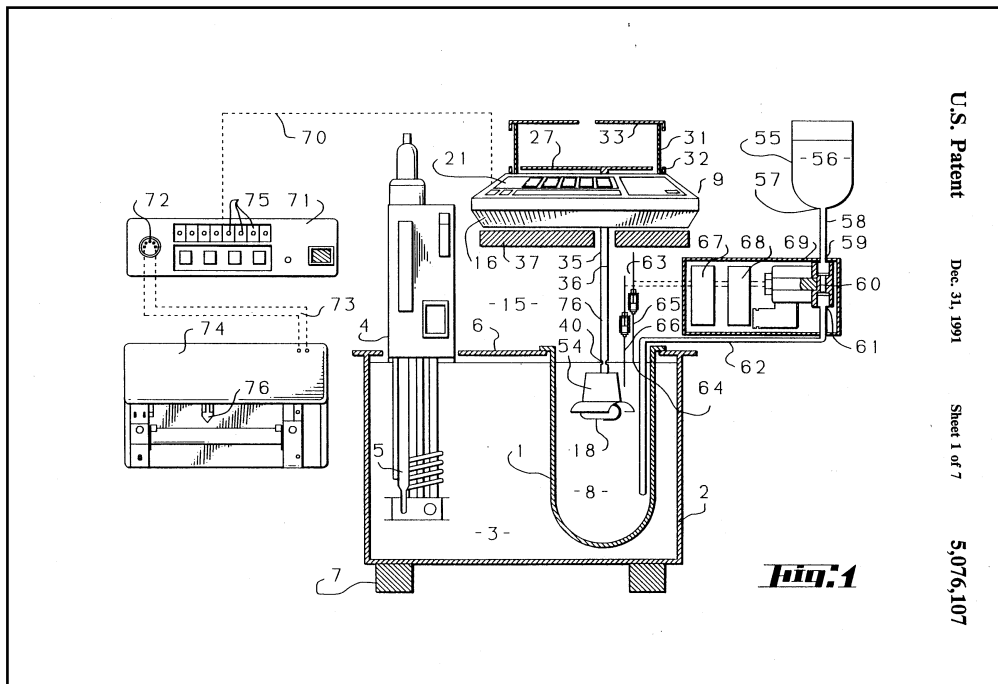


Figura 21: Dispositivo utilizzato per la misurazione della resultant weight (Riprodotta da Patent 5, 076, 107 Dec. 31, 1991).

L'apparato utilizzato durante questo lavoro di tesi (**Figura 22**) è stato realizzato sulla base di quello di Timmermann e Moes.

Ad una bilancia Mettler Toledo mod. DeltaRange AE260 (1) con sensibilità 0.0001 g è stato collegato un force transmitter device (2) che consta di un corpo cilindrico e di un disco in ottone. Il corpo, lungo 10 cm e spesso 2 mm, è stato

collegato in maniera solidale alla cella di carico della bilancia; il piattino presentava un diametro di 9 mm ed è stato saldato perpendicolarmente al corpo del cilindro. Il force transmitter device è stato immerso, ad una profondità di 1 cm dalla superficie, in 2L di fluido gastrico simulato realizzato secondo F.U.I XII ed. Il medium contenuto nel cristallizzatore (3) è stato termostato ad una temperatura di $37\text{ °C} \pm 0.1$ grazie alla serpentina in rame smaltato (4) collegata ad un termostato. La temperatura del bagno è stata monitorata tramite una termocoppia digitale. L'evaporazione del medium è stata evidenziata mediante l'uso di una bilancia Mettler Toledo mod. College B3001 (5) con sensibilità 0.1 g ed il reintegro avviene manualmente.

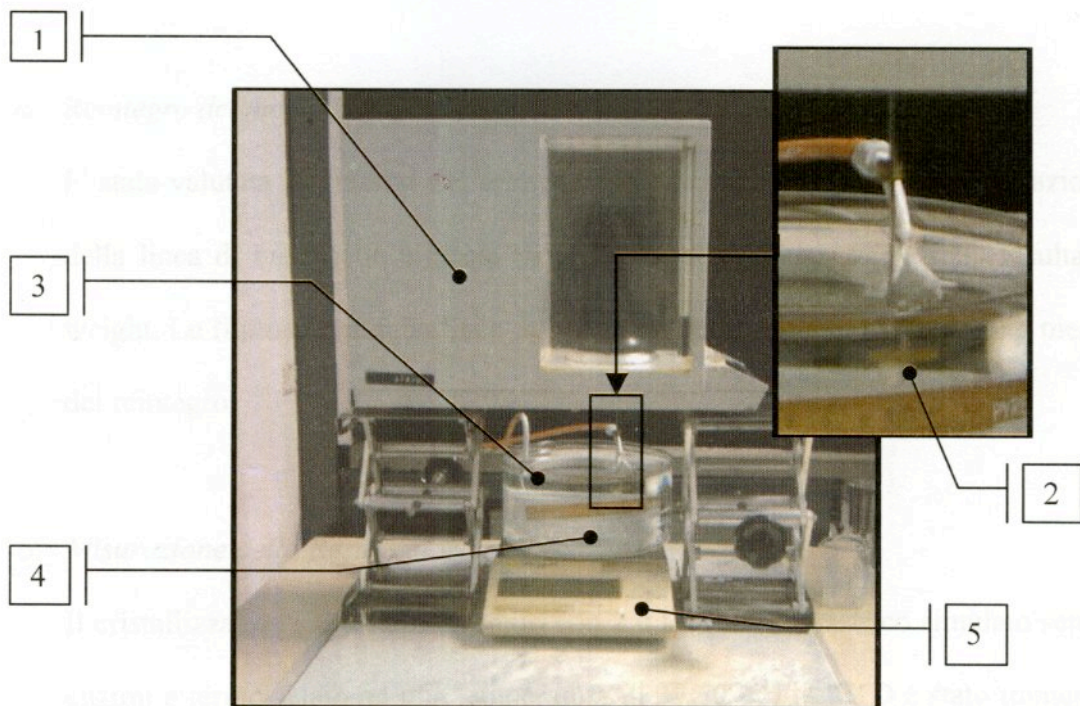


Figura 22: Dispositivo utilizzato per la misurazione della Resultant Weight.

Misurazione della *Resultant weight*

Il cristallizzatore (3) è stato riempito con 2,0 L di fluido gastrico simulato e termostato ad una temperatura di 37°C. Il Force transmitter device è stato immerso per un centimetro all'interno del medium. Dopo aver misurato il peso dei moduli essi sono stati assemblati nelle configurazioni da testare e gli assemblati ottenuti sono stati posti sotto il Force transmitter device per la misurazione. Ad intervalli di 5 minuti sono stati registrati i valori di *resultant weight* e contemporaneamente è stata scattata una fotografia del sistema immerso per avere un riscontro visivo del cambiamento del sistema.

3.2.21 Studi in vivo

Gli studi in vivo sono stati condotti durante il periodo svolto in Portogallo presso la Faculdade de Farmacia dell'Università di Porto. Gli studi in vivo sono stati condotti su 6 cani di razza beagles di peso compreso tra i 15 e i 20 Kg ai quali sono stati somministrati gli assemblati costituiti da amoxicillina e claritromicina. L'esperimento si è svolto su 2 giorni.

Il primo giorno (giorno zero) i sei cani sono stati acclimatati e un veterinario ha effettuato un controllo generale per valutarne lo stato di salute. I cani sono stati pesati ed è stato loro effettuato un prelievo di sangue per le analisi biochimiche convenzionali.

Il secondo giorno (giorno uno), dopo una cena secondo la normale dieta del cane, a ciascun animale è stato somministrato un sistema Dome Matrix®. Il

sistema Dome Matrix® somministrato è stato precedentemente caricato con 1 mg di bario solfato, all'interno della camera d'aria, che ha permesso di seguire il percorso del nostro sistema utilizzando i raggi X. La quantità di bario da aggiungere è stata scelta tramite diverse prove, in modo tale che la quantità aggiunta permettesse di tracciare il sistema senza farlo affondare. Dal momento della somministrazione del farmaco in poi i cani non hanno più mangiato fino al termine dei prelievi, anche se hanno avuto accesso ad libitum all'acqua. I cani sono stati mantenuti per 24 ore nello stabulario climatizzato sempre sotto il controllo di un veterinario. A tempi predeterminati (1-2-4-8-12 ore) ad ogni cane sono stati prelevati 2 ml di plasma, centrifugati e refrigerati. Contemporaneamente ciascun cane è stato sottoposto ai raggi X. I raggi X sono stati interrotti quando si è verificato che la forma farmaceutica non era più presente nello stomaco.

Dopo una settimana di wash out, si sono ripetuti i procedimenti del **Giorno 0** e nel **Giorno 1** è stato somministrato il farmaco di riferimento e cioè la forma commerciale di claritromicina e amoxicillina a rilascio immediato. Prelievi di 2 ml di plasma sono stati effettuati agli stessi tempi predeterminati. Tutti i campioni di plasma sono refrigerati a -70 °C fino all'analisi in HPLC.

3.2.22 Determinazione quantitativa di amoxicillina e claritromicina in Plasma

Inizialmente si è provato a determinare quantitativamente i due principi attivi utilizzando una tecnica HPLC equipaggiata con uno spettrofotometro UV-Visibile. Siccome le quantità presenti nel plasma erano comunque molto basse e quindi difficili da determinare, si è pensato di sostituire la tecnica di rivelazione UV con la tecnica di rivelazione della massa [82].

I campioni sono stati preparati aggiungendo a 200 μ l di plasma circa 200 μ l di acetonitrile refrigerato contenente lo standard interno (50 μ l contenenti 100 ppm di Eritromicina e Oxacillina ciascuno). I campioni sono stati miscelati per 5 minuti e centrifugati a 16,000 X g per 10 minuti fino a completa precipitazione delle proteine plasmatiche.

200 μ l di sopranatante sono stati prelevati e messi in un vial. Il solvente è stato evaporato a 37° C in flusso di azoto e il residuo è stato ricostituito in acido formico acquoso allo 0,1% e lasciato a miscelare per 5 minuti. Quando ha iniziato a formarsi un precipitato si è centrifugato a 16,000 X g per 10 minuti. Il sopranatante è stato trasferito in un vial di polipropilene e conservato a 5°C fino all'analisi con **UPLC-MS/MS**.

L'analisi con **UPLC-MS/MS** ha previsto un sistema Waters Acquity UPLC accoppiato a Quattro Premier XE tandem-quadrupole mass spectrometer (Waters Corp., Milford, MA). È stata utilizzata una colonna Acquity UPLC BEH C18 2,1-mm by 50-mm con impaccamento di 1,7- μ m (Waters Ltd., Dublin,

Ireland) alla quale è stato aggiunto un filtro precolonna di 0,2 μm . La fase mobile ha previsto un gradiente di una soluzione A (0,1% di Acido formico in acqua) e di una soluzione B (0,1% di Acido formico in metanolo) con un'iniziale composizione di 10% di fase B. La composizione della fase mobile è poi cambiata linearmente passando da 10% di B a 1 minuto a 80% di B a 2 minuti e poi a 100% di B in 4 minuti. Successivamente si è tornati a 10% di B a 5 minuti che è stata mantenuta fino a 6 minuti. Il flusso è stato di 0,3 ml/min e la colonna è stata mantenuta alla temperatura di 40° C. Per ogni campione sono stati iniettati 10 μl . Gli analiti sono stati analizzati via MS. La **Tabella I** mostra il settaggio utilizzato per ogni farmaco per ottimizzare i risultati:

Tabella I: Q1, rapporto massa /carica dello ione precursore; Q3, rapporto massa/carica dei frammenti; CV, cone voltage; CE, energia di collisione; Rt, tempo di ritenzione.

Antibiotico	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CV (V)	CE (eV)	Rt (min)
Amoxicillina	366,62	349,52	18	10	2,89
Oxacillina	402,61	243,36	20	14	2,58
Claritromicina	748,89	558,78	30	30	2,67
Eritromicina	734,88	576,65	30	25	2,61

I parametri di acquisizione sono stati i seguenti:

- Voltaggio del capillare, 3.4 kV;
- Temperatura alla sorgente, 120 °C;
- Temperatura di desolvatazione, 300 °C;

- Flusso del gas di desolvatazione, 600 litri/h;
- Cone gas flow, 50 litri/h;
- Dwell time, 80 ms.

I dati sono stati analizzati mediante il software Masslynx V4.1.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Claritromicina

4.1.1. Moduli e assemblato di claritromicina

In **Tabella II** sono riportate le formulazioni di claritromicina utilizzate per la preparazione delle compresse a rilascio modificato. Per ogni formulazione è stata studiata la velocità di rilascio del principio attivo.

Tabella II: Formulazioni delle compresse di Claritromicina (%).

	#C1	#C2	#C3	#C4	#C5	#C6	#C7	#C8
Claritromicina	70,5	82,4	84	75,5	64	84	83,3	64,3
HPMC K100M	20,5						8,3	25,7
HPMC K15M		8,2	8,4	15,1	25,6	8,4		
PVP K30	2,5	2,7	1,8	2,7	3,2	1,8	2,2	3
PEG 6000	2,5	2,7	1,8	2,7	3,2	1,8	2,2	3
Talco	3	3	3	3	3	3	3	3
Magnesio stearato	1	1	1	1	1	1	1	1

I diversi profili di rilascio sono stati ottenuti variando il tipo e la percentuale di polimero rigonfiabile utilizzato.

Sono stati utilizzati due tipi di HPMC in percentuali diverse:

- HPMC K100M: 10%, 30% e 40% rispetto al peso del principio attivo,

- HPMC K15M: 10%, 20% e 40% rispetto al peso del principio attivo
(Tabella III).

I moduli di claritromicina sono stati ottenuti previa granulazione a umido del principio attivo con gli eccipienti, come descritto in sezione 3.2.1.

In tutte le formulazioni, il contenuto di talco (3%) e di magnesio stearato (1%) è stato mantenuto costante mentre è variata la quantità di legante utilizzato durante il processo di granulazione del principio attivo.

Tabella III. Contenuto di Claritromicina e HPMC per ogni modulo (mg).

	#C1	#C2	#C3	#C4	#C5	#C6	#C7	#C8
Claritromicina	100	100	100	100	100	250	100	100
HPMC K100M	30 (30%)						10 (10%)	40 (40%)
HPMC K15M		10 (10%)	10 (10%)	20 (20%)	40 (40%)	25 (10%)		

4.1.1.1 Profilo di dissoluzione della formulazione contenente 50% di HPMC K100M

Per la formulazione riportata in **Tabella IV** sono stati preparati moduli maschio e moduli femmina aventi un diametro di 7,4 mm.

Tabella IV. Composizione di un modulo della formulazione #C0.

	#C0 (mg)
Claritromicina	85
HPMC K100M	40
PVP K30	5
PEG 6000	5
Talco	4,05
Magnesio stearato	1,35
Umidità	2,8
Totale	143,2

I moduli sono stati assemblati in configurazione “a camera vuota”, cioè inserendo l’anello presente sulla base concava di un modulo maschio nella base concava di un modulo femmina. I sistemi Dome Matrix® così assemblati sono stati saggiati mediante test di dissoluzione in vitro.

Il test di dissoluzione è stato condotto come descritto nella sezione 3.2.12 e i campioni prelevati sono stati analizzati mediante HPLC come descritto nella

sezione 3.2.15. Il metodo analitico della claritromicina utilizzato è stato precedentemente validato per i valori di precisione, linearità e accuratezza.

Grazie alla presenza di una camera d'aria interna, i sistemi assemblati galleggiavano appena messi a contatto con il mezzo di dissoluzione e continuavano a galleggiare fino a completa dissoluzione. Dopo 8 ore le compresse erano completamente dissolte, quindi il test di dissoluzione è stato interrotto. Il profilo di rilascio ottenuto per questa formulazione è riportato in

Figura 23.

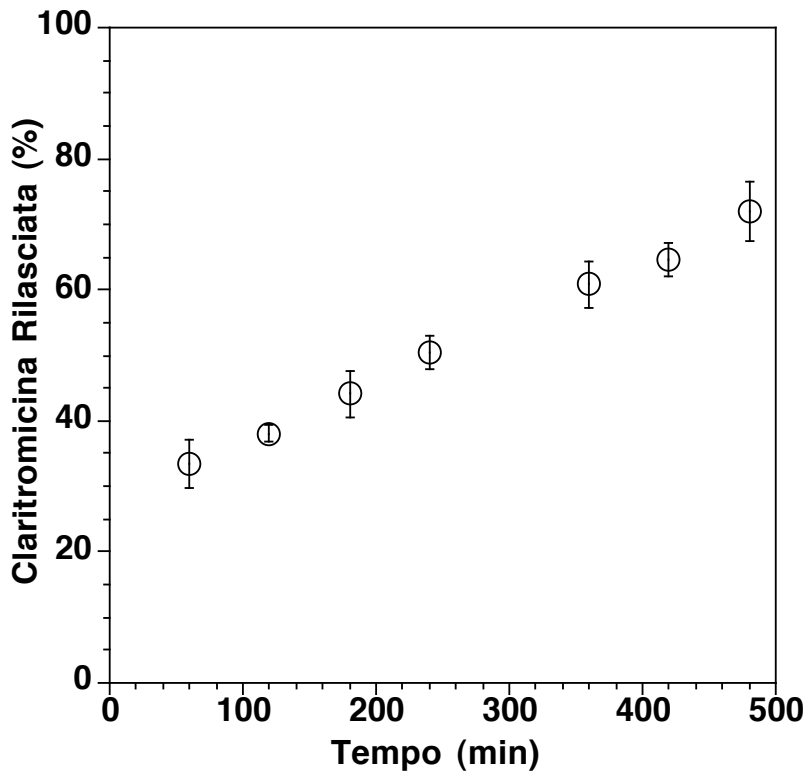


Figura 23. *Profilo di rilascio della formulazione #C0 in configurazione "a camera vuota" (n=6).*

I risultati ottenuti mostrano un rilascio di claritromicina attorno al 70% in 8 ore. Tale dato è in contraddizione con il fatto che le compresse erano completamente

dissolte dopo 8 ore e quindi il rilascio di farmaco avrebbe dovuto raggiungere il 100%.

E' stata analizzata la stabilità della Claritromicina nel fluido gastrico simulato a 37°C, nelle stesse condizioni in cui è stato effettuato il test di dissoluzione (Figura 24).

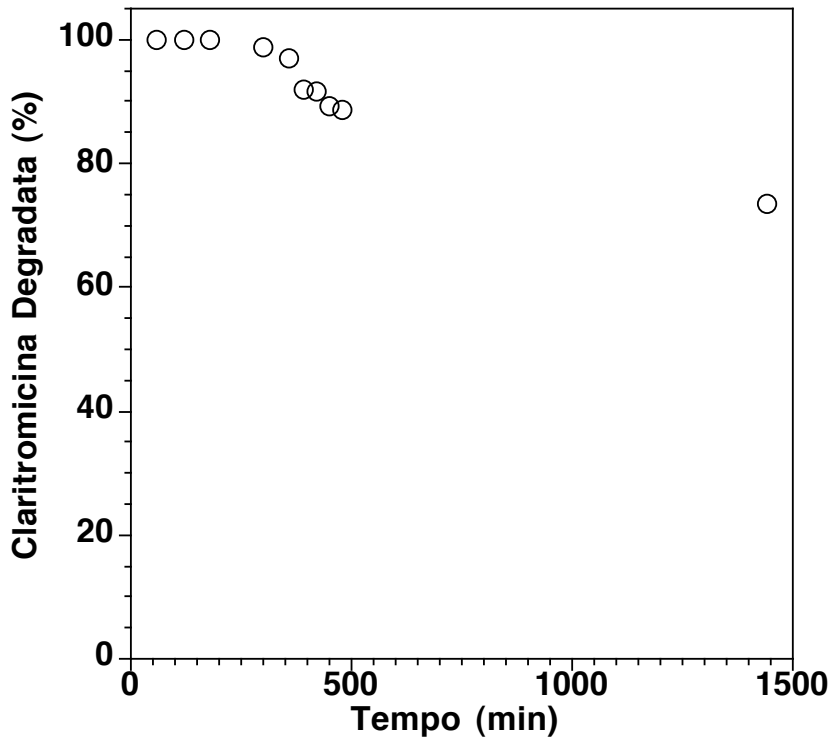


Figura 24. *Profilo di stabilità della claritromicina in fluido gastrico simulato a 37°C.*

Dal grafico riportato in Figura 24 si osserva che la claritromicina dopo 6 ore in soluzione acida iniziava a degradarsi. Per ovviare al problema di degradazione della claritromicina in fluido gastrico simulato nella determinazione della percentuale di farmaco rilasciato, è stato necessario dissolvere anche farmaco tal quale in un vessel contenente fluido gastrico simulato mantenuto a 37°C durante tutti i test di dissoluzione in modo tale da conoscere la quantità di

farmaco realmente presente dopo ogni prelievo e poterla utilizzare come confronto per determinare la quantità di farmaco rilasciata dai moduli.

La dissoluzione della formulazione #C0 è stata ripetuta e grazie a questo metodo si è ottenuto un rilascio di farmaco del 100% in seguito alla completa dissoluzione delle compresse (dato non mostrato). Questo metodo è stato adottato in tutte i test di dissoluzione successivi.

4.1.1.2. Profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 10%, 30% e 40% di HPMC K100M

Per queste 3 formulazioni (riportate in **Tabella V**) sono stati preparati moduli maschio e moduli femmina con un diametro di 7,4 mm.

Tabella V: Composizione di un modulo delle formulazioni #C1, #C7 e #C8.

	#C1(mg)	#C7(mg)	#C8(mg)
Claritromicina	100	100	100
HPMC K100M	30	10	40
PVP K30	3,5	2,67	4,67
PEG 6000	3,5	2,67	4,67
Talco	3,93	3,46	4,48
Magnesio stearato	1,31	1,15	1,49
Umidità	4,36	1,55	4,64
Totale	146,6	121,5	159,95

Per tutte e tre le formulazioni sono stati effettuati i saggi di resistenza alla rottura e friabilità come descritto nella sezione 3.2.6. In **Tabella VI** sono riportati i valori medi di resistenza alla rottura.

Tabella VI. Valori medi di resistenza alla rottura delle formulazioni #C1, #C7 e #C8.

	#C1	#C7	#C8
Resistenza alla rottura moduli femmina	6,56±0,42 Kg	2,91±0,51 Kg	8±1,05 Kg
Resistenza alla rottura moduli maschio	8,83±0,29 Kg	4,45±0,49 Kg	6,58±0,41 Kg

Per tutte e tre le formulazioni, il saggio di friabilità ha portato a una perdita in peso inferiore all'1%, quindi le compresse rientrano nei limiti imposti dalla F.U.I. XII ed.

Per tutte e tre le formulazioni, i moduli sono stati assemblati in configurazione "a camera vuota" tramite incastro. Per ciascuna formulazione i sistemi Dome Matrix® così assemblati sono stati sottoposti al test di dissoluzione descritto in sezione 3.2.12.

Grazie alla presenza della camera d'aria interna, i sistemi assemblati galleggiavano appena messi a contatto con il mezzo di dissoluzione e continuavano a galleggiare fino alla loro completa dissoluzione.

I profili di rilascio ottenuti per queste formulazioni sono riportati in **Figura 25**.

Le formulazioni #C1 e #C8 mostrano un rilascio del 70% del principio attivo dopo 8 ore, mentre nella formulazione #C7 mostra una velocità di rilascio del principio attivo maggiore che arriva al 100% dopo 7 ore. La formulazione #C7 mostra un rilascio più rapido in quanto contiene solamente il 10% di polimero,

mentre le altre due formulazioni contengono rispettivamente un 30% e un 40%, quindi una quantità maggiore che è in grado di controllare in modo più rigoroso il rilascio di principio attivo.

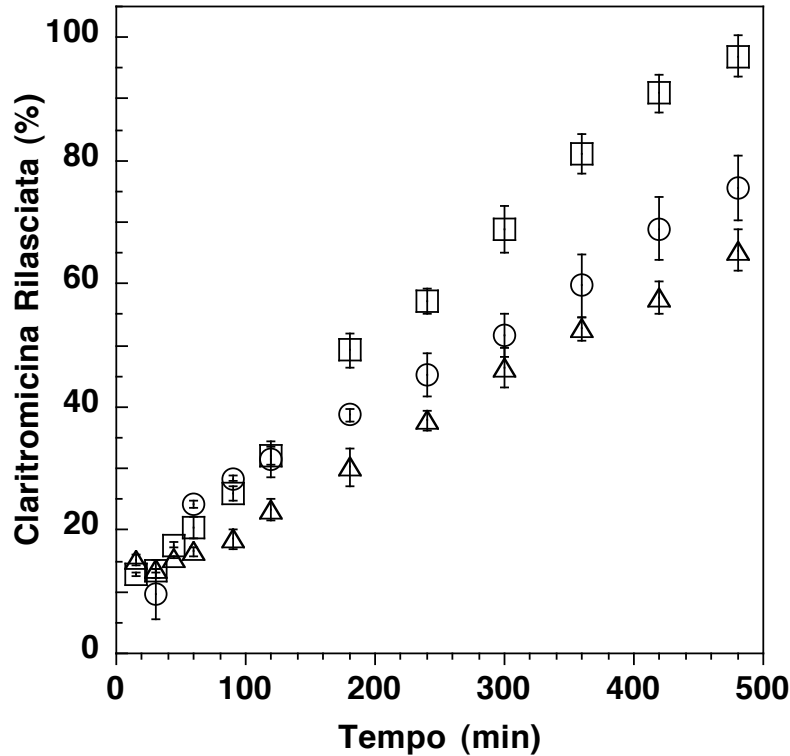


Figura 25: Confronto dei profili di rilascio dei sistemi in configurazione "a camera vuota" delle formulazioni #C1 (○) ($n=6$), #C7 (□) ($n=6$) e #C8 (△) ($n=6$).

Inoltre, come di può osservare dai dati riportati in Tabella VI, i valori di resistenza alla rottura sono inferiori nel caso della formulazione #C7. Anche questo potrebbe essere un fattore che influenza una dissoluzione più rapida di questi moduli. Le formulazioni #C1 e #C8 invece hanno un contenuto simile di polimero (30% e 40%) e, infatti, anche i profili di dissoluzione si comportano in maniera simile e più lenta rispetto a #C7.

Il confronto dei profili di rilascio è stato anche effettuato calcolando il fattore di similarità f_2 (come descritto in sezione 3.2.19):

- il fattore di similarità f_2 calcolato per le formulazioni #C1 e #C7 è 28,1;
- il fattore di similarità f_2 calcolato per le formulazioni #C7 e #C8 è 23,0;
- il fattore di similarità f_2 calcolato per le formulazioni #C1 e #C8 è 53,3.

Due formulazioni sono considerate simili in termini di profilo di dissoluzione se il valore di f_2 è superiore a 50. I valori di f_2 ottenuti indicano una differenza tra i profili di rilascio delle formulazioni #C1 e #C7 e anche tra i profili di dissoluzione delle formulazioni #C7 e #C8 come detto in precedenza. Il valore di f_2 ottenuto nel confronto tra #C1 e #C8 indica che non c'è nessuna differenza significativa nei profili di dissoluzione delle due formulazioni.

E' di notevole interesse il fatto che le curve di rilascio siano decisamente lineari. Sono state studiate le cinetiche di rilascio per queste formulazioni utilizzando l'equazione 1 descritta nella sezione 1.3.

- Il valore di n per la formulazione #C1 è pari a 0,65 (**Figura 26**).
- Il valore di n per la formulazione #C7 è pari a 0,58 (**Figura 27**).
- Il valore di n per la formulazione #C8 è pari a 0,57 (**Figura 28**).

Questi valori indicano che la cinetica di rilascio per questi sistemi è di tipo anomalo-fickiana ma, osservando i punti sperimentali e la curva calcolata con l'equazione esponenziale, si può notare come quest'ultima non descriva in maniera accurata il profilo di rilascio di claritromicina tra il 10% e il 60% di farmaco rilasciata, che invece presenta, come già detto in precedenza, un andamento più lineare. Questo indica che il rilascio è bifasico: una prima parte

di circa 20-30% viene rilasciata velocemente nei primi 60 minuti probabilmente dovuta alla dissoluzione del farmaco presente alla superficie del sistema, e una seconda parte rilasciata più lentamente ragionevolmente per diffusione attraverso lo strato di polimero stabilitosi al fronte di erosione. Questa seconda parte viene liberata a velocità costante.

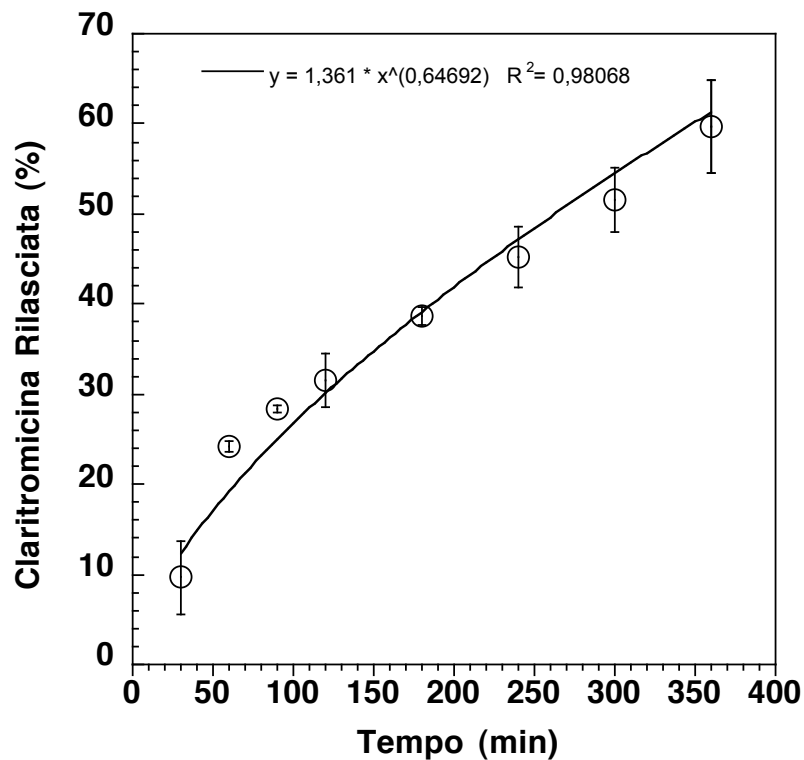


Figura 26: Cinetica di rilascio della formulazione #C1 in configurazione “a camera vuota”.

Per questa ragione, e per l'evidente quasi linearità dei dati in successione temporale, nella simulazione più avanti riportata abbiamo preferito descrivere il rilascio con un'equazione lineare.

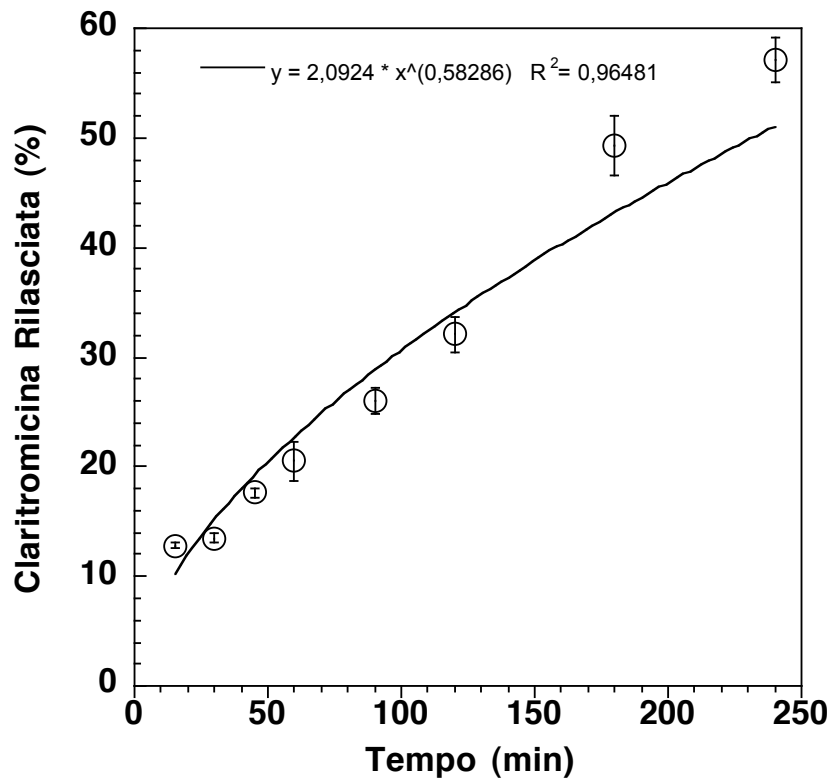


Figura 27: Cinetica di rilascio della formulazione #C7 in configurazione "a camera vuota".

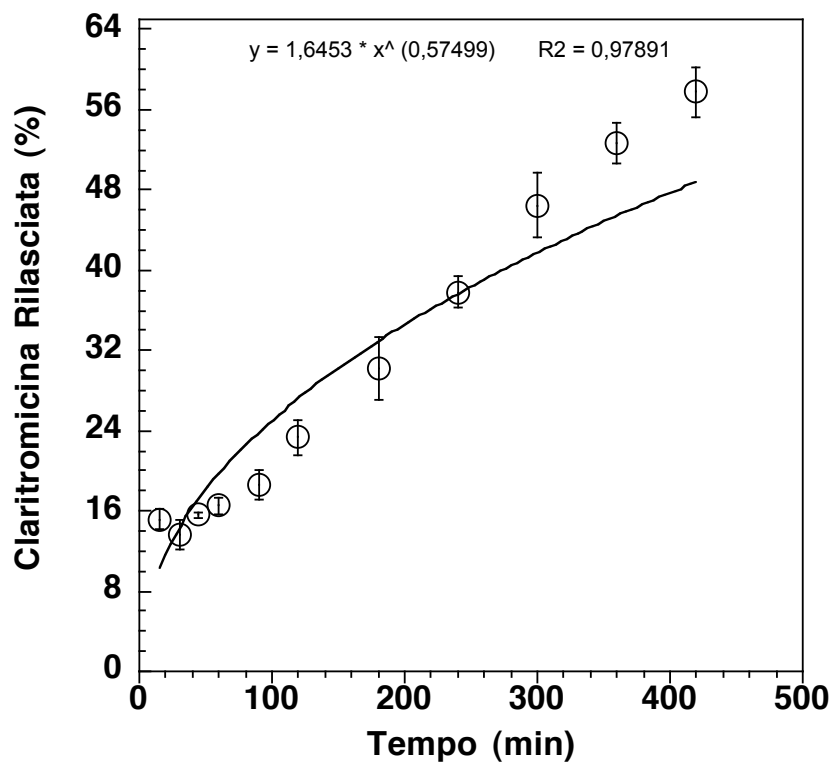


Figura 28: Cinetica di rilascio della formulazione #C9 in configurazione "a camera vuota".

4.1.1.3 Profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 10%, 20% e 40% di HPMC K15M

Anche nel caso delle formulazioni riportate in **Tabella VII** sono stati prodotti moduli maschio e moduli femmina aventi un diametro di 7,4 mm.

Tabella VII. Composizione di un modulo delle formulazioni #C2, #C4 e #C5.

	#C2(mg)	#C4(mg)	#C5(mg)
Claritromicina	84	84	84
HPMC K15M	8,4	16,8	33,7
PVP K30	2,7	3	4,2
PEG 6000	2,7	3	4,2
Talco	2,9	3,2	3,8
Magnesio stearato	1,3	1,4	1,6
Umidità	1,29	2,4	3,1
Totale	103,29	113,8	134,6

In **Tabella VIII** sono riportati i valori medi di resistenza alla rottura ottenuti.

Tabella VIII. Valori medi di resistenza alla rottura delle formulazioni #C2, #C4 e #C5.

	#C2	#C4	#C5
Resistenza alla rottura moduli femmina	3,12±0,37 Kg	4,17±0,24 Kg	4,87±0,63 Kg
Resistenza alla rottura moduli maschio	4,96±1,26 Kg	5,8±0,68 Kg	6,47±0,33 Kg

Per tutte e tre le formulazioni, il saggio di friabilità ha portato a una perdita in peso inferiore all'1%, quindi le compresse rientrano nei limiti indicati nella F.U.I. XII ed.

Per tutte e tre le formulazioni, i moduli sono stati assemblati in configurazione "a camera vuota" tramite incastro. Per ciascuna formulazione i sistemi Dome Matrix® così assemblati sono stati sottoposti al test di dissoluzione.

Tutti i sistemi galleggiavano appena messi a contatto con il mezzo di dissoluzione e continuavano a galleggiare fino a completa dissoluzione.

I profili di rilascio ottenuti per queste formulazioni sono riportati in **Figura 29**.

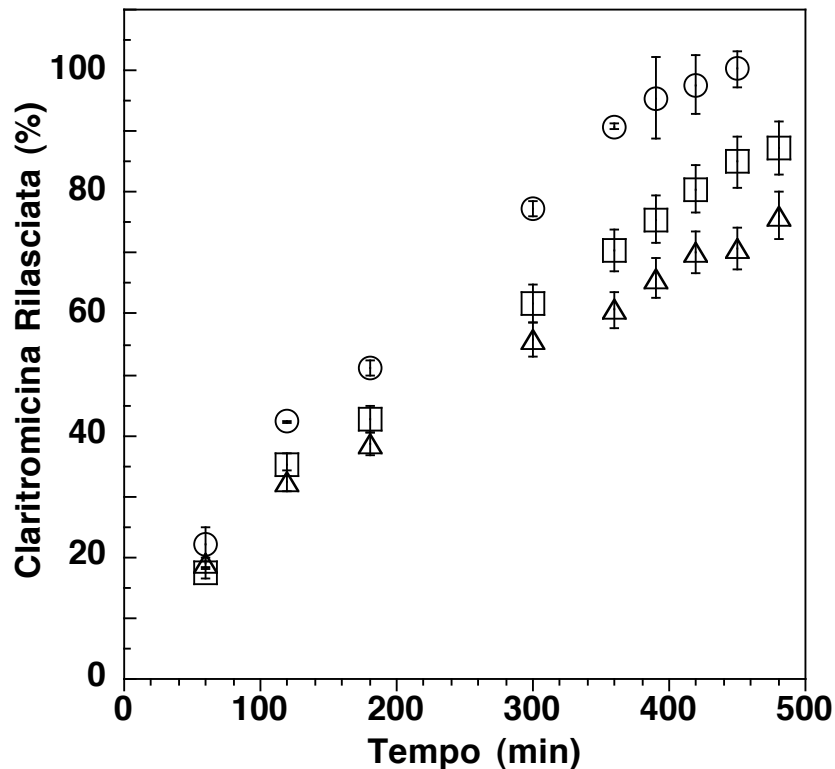


Figura 29: Confronto dei profili di rilascio dei sistemi in configurazione "a camera vuota" delle formulazioni #C2 (○) ($n=6$), #C4 (□) ($n=6$) e #C5 (△) ($n=6$).

La formulazione #C2 porta a un rilascio di principio attivo pari al 100% dopo 8 ore, mentre nel caso delle formulazioni #C4 e #C5 si osserva, rispettivamente, un rilascio del 85% e del 75% dopo 8 ore. Anche in questo caso quindi un minor contenuto di polimero (10%) comporta un rilascio molto più rapido del principio attivo rispetto alle formulazioni #C4 e #C5 che contengono un quantitativo maggiore di polimero e che mostrano tra loro un andamento simile. In questo caso i valori di resistenza alla rottura non mostrano una significativa differenza rilevabile poi nel comportamento di dissoluzione. Anche in questo caso è stato calcolato il fattore di similarità f_2 tra le diverse formulazioni:

- il fattore di similarità f_2 calcolato per le formulazioni #C2 e #C4 è di 42,2;
- il fattore di similarità f_2 calcolato per le formulazioni #C2 e #C5 è 32,2;
- il fattore di similarità f_2 calcolato per le formulazioni #C4 e #C5 è 52,8.

Dai valori di f_2 ottenuti si può dedurre che c'è una differenza tra i profili di rilascio delle formulazioni #C2 e #C4 ed anche tra i profili di dissoluzione delle formulazioni #C2 e #C5, dovuto, come detto in precedenza, all'inferiore contenuto di polimero di #C2 che controlla meno il rilascio di polimero.

Il valore ottenuto dal confronto tra #C4 e #C5 indica che non c'è nessuna differenza significativa nei profili di dissoluzione delle due formulazioni, nonostante il contenuto di HPMC K15M nelle due formulazioni sia diverso per un 20%.

4.1.1.4 Confronto tra i profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 10% di HPMC

Tra le diverse formulazioni è stato deciso di testare e confrontare quelle contenenti solo il 10% di polimero rispetto al principio attivo. Si è infatti ritenuto che tali formulazioni consentissero un controllo sul rilascio del farmaco senza rallentarlo eccessivamente, in modo da consentire una pronta disponibilità di antibiotico a contatto con l'agente patogeno. Inoltre il peso minore dei singoli moduli è un vantaggio in quanto permetterà di assemblare più moduli (per raggiungere la dose desiderata) ottenendo comunque un sistema ancora in grado di galleggiare.

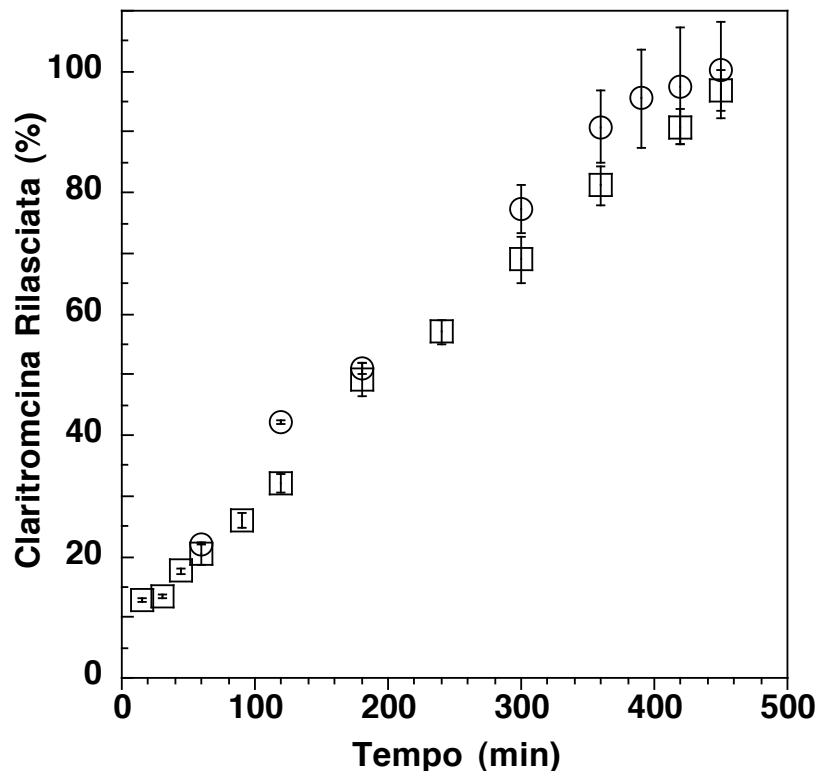


Figura 30: Confronto dei profili di dissoluzione delle formulazioni #C2 (○) ($n=6$) e #C7 (□) ($n=6$).

Dal confronto dei profili di dissoluzione delle formulazioni #C2 e #C7, ottenute utilizzando un diverso tipo di HPMC ma in quantità uguali (**Figura 30**), si evince che in entrambi i casi si raggiunge un rilascio del farmaco del 100% dopo 7 ore.

Il fattore di similarità f_2 (55,5) indica che i profili sono simili. Questo significa che il diverso grado di viscosità e numero di sostituenti del polimero non influenzano in modo significativo il rilascio di farmaco.

Le due formulazioni non mostrano una sostanziale differenza e potevano essere scelte entrambe. La scelta è ricaduta sulla formulazione #C2 semplicemente per una maggiore disponibilità di polimero. La bassa quantità di polimero e il conseguente peso ridotto del singolo modulo ci ha permesso di aumentare la dose di claritromicina contenuta in una singola unità, mantenendo la galleggibilità dell'assemblato.

È stata quindi prodotta una formulazione #C3 che differiva dalla #C2 per un contenuto maggiore di principio attivo, mentre la percentuale di HPMC K15M (10%) rimaneva costante rispetto al principio attivo presente. In tal modo sono stati preparati moduli contenenti ciascuno 100 mg di claritromicina. In tal modo, assemblando 5 moduli, è stato possibile ottenere un sistema contenente la dose di antibiotico solitamente somministrata (500 mg).

4.1.1.5 Profili di dissoluzione delle formulazioni contenenti 500 mg di claritromicina

Per la formulazione #C3 (riportata in **Tabella IX**) sono stati prodotti moduli maschio e moduli femmina con diametro di 7,4 mm.

Tabella IX. Composizione di un modulo della formulazione #C3

	#C3 (mg)
Claritromicina	100
HPMC K15M	10
PVP K30	2,16
PEG 6000	2,16
Talco	3,43
Magnesio stearato	1,14
Umidità	1,64
Totale	120,53

I moduli femmina hanno mostrato un valore di resistenza alla rottura medio di $3,9 \pm 0,32$ Kg, mentre per i moduli maschio il valore medio ottenuto è pari a $4,54 \pm 0,51$ Kg. Il saggio di friabilità ha portato a una perdita in peso inferiore all'1%, quindi le compresse rientrano nei limiti imposti dalla F.U.I. XII ed.

I moduli prodotti sono stati assemblati nel seguente modo: un modulo maschio è stato incastrato sulla base concava di un modulo femmina in modo tale da ottenere una configurazione "a camera vuota", successivamente sul modulo

femmina della configurazione ottenuta sono stati impilati mediante incastro altri 3 moduli femmina (**Figura 31**).



Figura 31: *Formulazione #C3 assemblata in 5 moduli.*

Il sistema Dome Matrix® assemblato è stato saggiato mediante il test di dissoluzione (come descritto in sezione 3.2.12).

Anche il sistema a 5 moduli galleggiava appena messo a contatto con il mezzo di dissoluzione e continuava a galleggiare fino a completa dissoluzione.

Il galleggiamento del sistema a 5 moduli potrebbe essere dovuto a due fenomeni:

- la camera d'aria presente nei moduli assemblati in configurazione "a camera vuota" è sufficiente a garantire il galleggiamento del sistema nonostante l'aggiunta di tre moduli impilati;
- il contributo della formazione di piccole camere d'aria tra i moduli impilati si somma alla camera d'aria dei moduli assemblati in configurazione "a camera vuota" permettendo il galleggiamento del sistema.

Il profilo di rilascio ottenuto dal test di dissoluzione del sistema assemblato a 5 moduli è riportato in **Figura 32**.

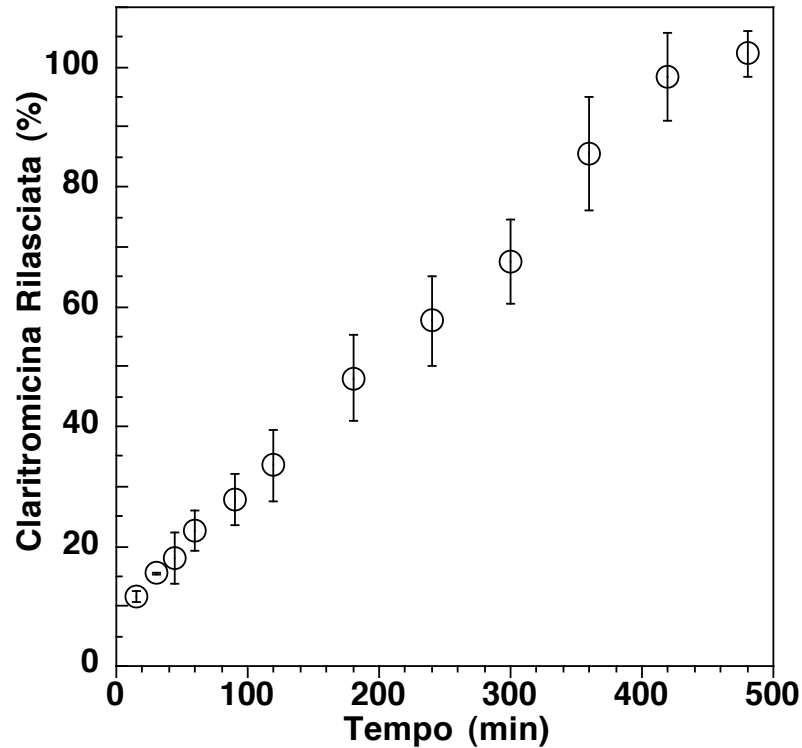


Figura 32: *Profilo di rilascio della formulazione #C3 assemblata in 5 moduli (n=6).*

Il sistema assemblato mostra un rilascio del 100% in 7 ore. È stata calcolata la cinetica di rilascio per questo assemblato utilizzando l'equazione 1 descritta nella sezione 1.3. Il valore di n per la formulazione #C3 è pari a 0,59 (**Figura 33**). Questo valore indica che la cinetica di rilascio per questo sistema è di tipo anomalo-fickiana.

Anche in questo caso osservando i punti sperimentali si nota che la curva estrapolata dall'equazione non fitta in maniera accurata i punti sperimentali.

Successivamente per questo motivo abbiamo preferito descrivere il rilascio con un'equazione lineare.

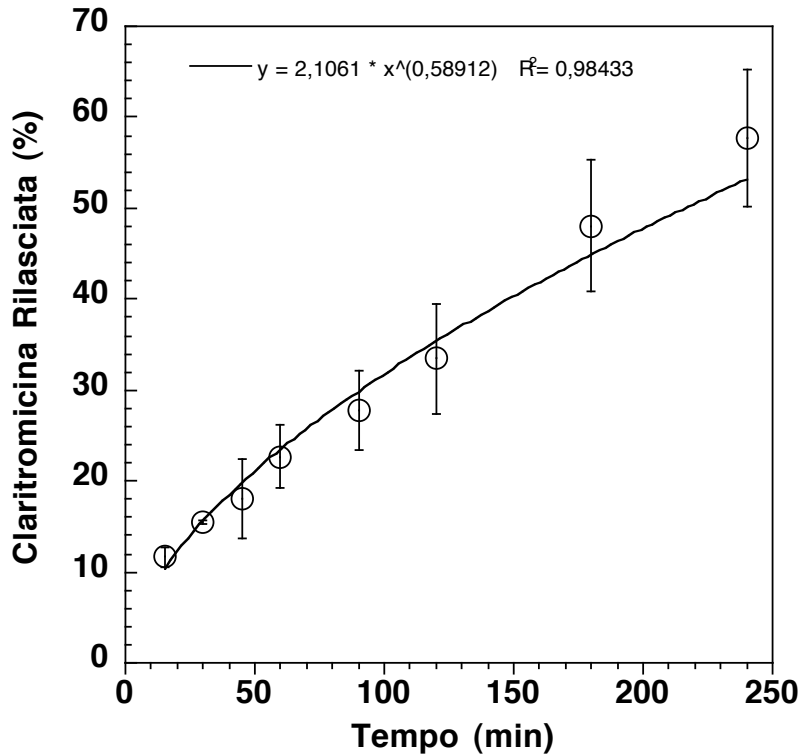


Figura 33: *Analisi cinetica del profilo di rilascio della formulazione #C3 assemblata in 5 moduli.*

E' stato anche valutato se la variazione della posizione dei moduli potesse influire sul profilo di rilascio della claritromicina.

Per la formulazione #C3 sono stati quindi assemblati due diversi sistemi, definiti A e B, ciascuno costituito da 5 moduli di diametro 7,4 mm (formulati come descritto in **Tabella IX**) nelle seguenti configurazioni:

$$A = F + F + F + M + F$$

$$B = F + F + F + F + M$$

con F per il modulo femmina e con M per il modulo maschio.

Durante i test di dissoluzione si è osservato che entrambi i sistemi galleggiavano dopo essere stati messi a contatto con il mezzo di dissoluzione e continuavano a galleggiare fino a completa dissoluzione.

I profili di dissoluzione ottenuti sono mostrati in **Figura 34**.

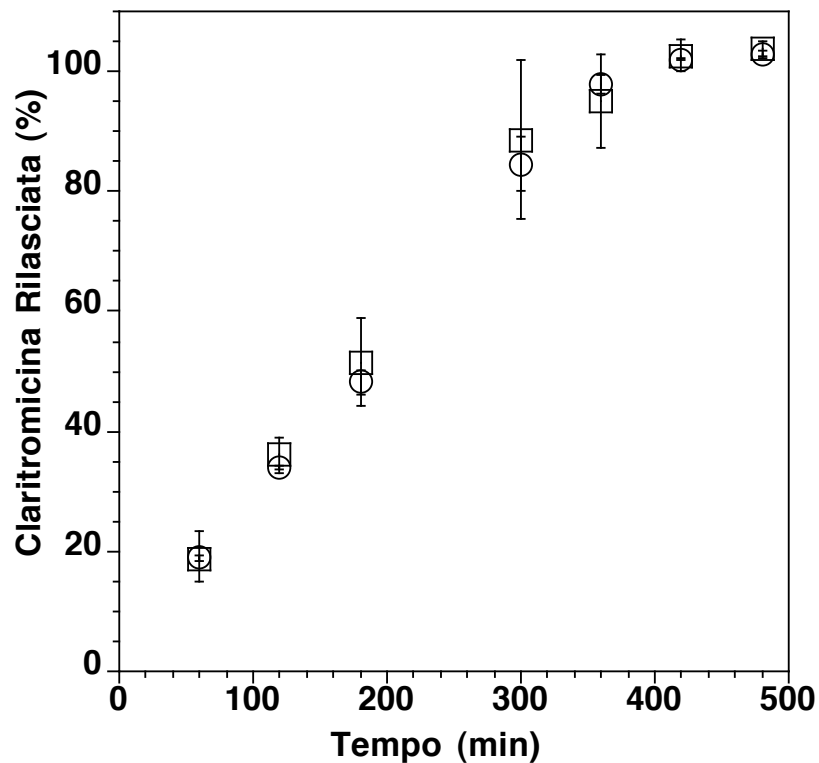


Figura 34: Confronto dei profili di dissoluzione dei sistemi A (○) ($n=6$) e B (□) ($n=6$).

Dall'analisi dei profili di dissoluzione riportati in **Figura 34**, si può osservare che dopo 7 ore entrambi i sistemi hanno rilasciato il 100% di principio attivo. Il fattore di similarità f_2 è 79,2 e ciò significa che i profili di rilascio dei due sistemi A e B sono simili. Quindi si può concludere che la posizione dei singoli moduli

nell'assemblato non influenza in modo significativo la velocità di rilascio del principio attivo.

Il problema principale è rappresentato però dalle dimensioni del sistema #C3. Per questo motivo si è pensato ad una formulazione che permettesse di contenere 500 mg di principio attivo in un sistema con configurazione "a camera vuota".

Questo è stato possibile producendo moduli da 11 mm che potevano quindi contenere 250 mg di principio attivo ciascuno (formulazione #C6).

Per la formulazione #C6, riportata in **Tabella X**, sono stati preparati moduli maschio e moduli femmina con diametro di 11 mm.

Tabella X. Composizione di un modulo della formulazione #C6.

	#C6 (mg)
Claritromicina	250
HPMC K15M	25
PVP K30	5,3
PEG 6000	5,3
Talco	8,6
Magnesio stearato	3,7
Umidità	4,3
Totale	302,2

I moduli femmina hanno mostrato un valore di resistenza alla rottura medio di $5,06 \pm 0,46$ Kg, mentre per i moduli maschio il valore medio ottenuto è di

9,8±1,04 Kg. Il saggio di friabilità ha portato ad una perdita in peso inferiore all'1%, entro i limiti imposti dalla F.U.I. XII ed.

I moduli sono stati assemblati in configurazione "a camera vuota" tramite incastro e sono stati sottoposti al test di dissoluzione (**Figura 35**).

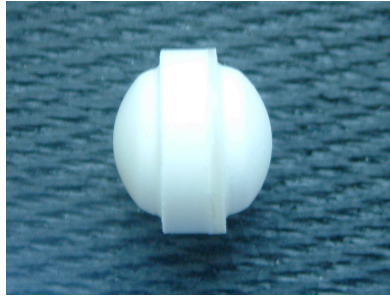


Figura 35: Formulazione #C6 in configurazione "a camera vuota".

Il profilo di rilascio ottenuto è riportato in **Figura 36**.

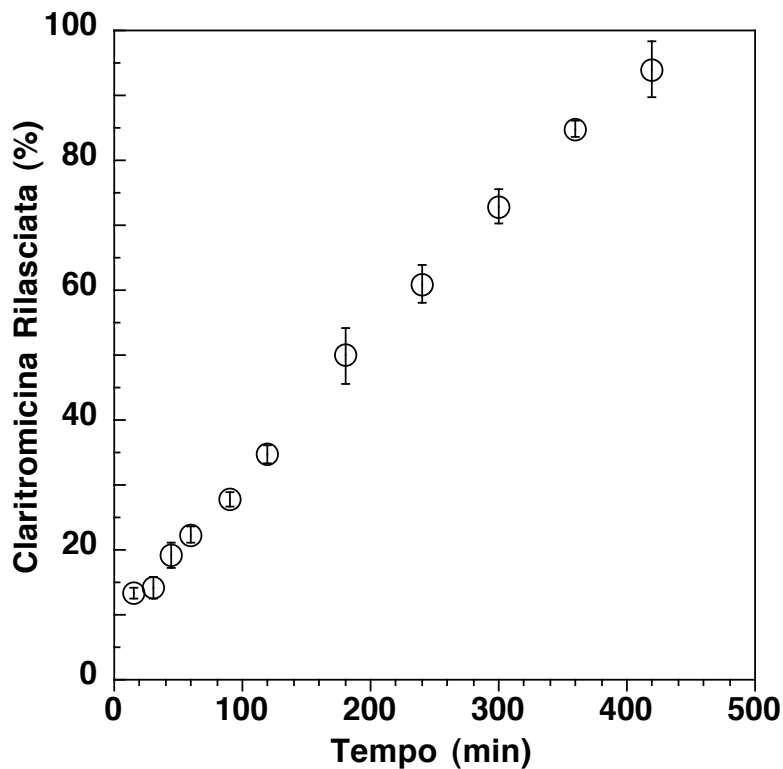


Figura 36: Profilo di rilascio della formulazione #C6 in configurazione "a camera vuota" (n=6).

Dal profilo di dissoluzione riportato in Figura 36 si evince che dopo 7 ore il sistema ha rilasciato il 100% di principio attivo.

È stata calcolata la cinetica di rilascio per questa formulazione utilizzando l'equazione 1 descritta nella sezione 1.3. Il valore di n per la formulazione #C6 è pari a 0,69 (Figura 37). Questo valore indica che la cinetica di rilascio per questo sistema è di tipo anomalo-fickiana. Anche in questo caso i punti sperimentali che descrivono il profilo di rilascio di Claritromicina non sono rappresentati in modo accurato dall'equazione esponenziale, per cui successivamente è stata utilizzata un'equazione lineare per descrivere il rilascio.

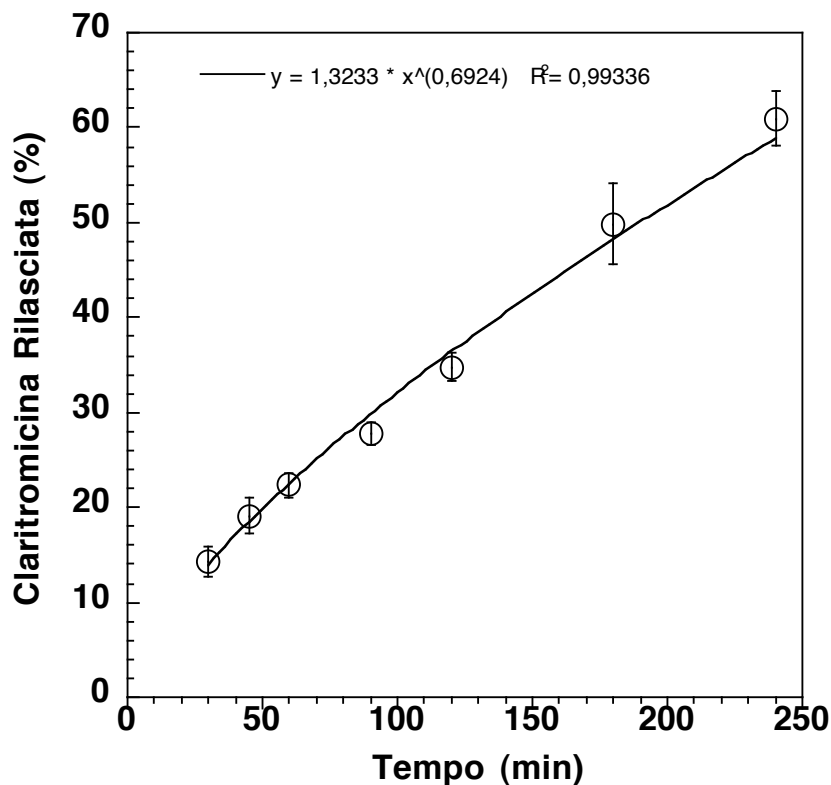


Figura 37: Cinetica di rilascio della formulazione #C6 in configurazione "a camera vuota".

In **Figura 38** è riportato il confronto dei profili di dissoluzione di dei sistemi #C3 e #C6, contenenti entrambi 500 mg di principio attivo ma di geometria diversa.

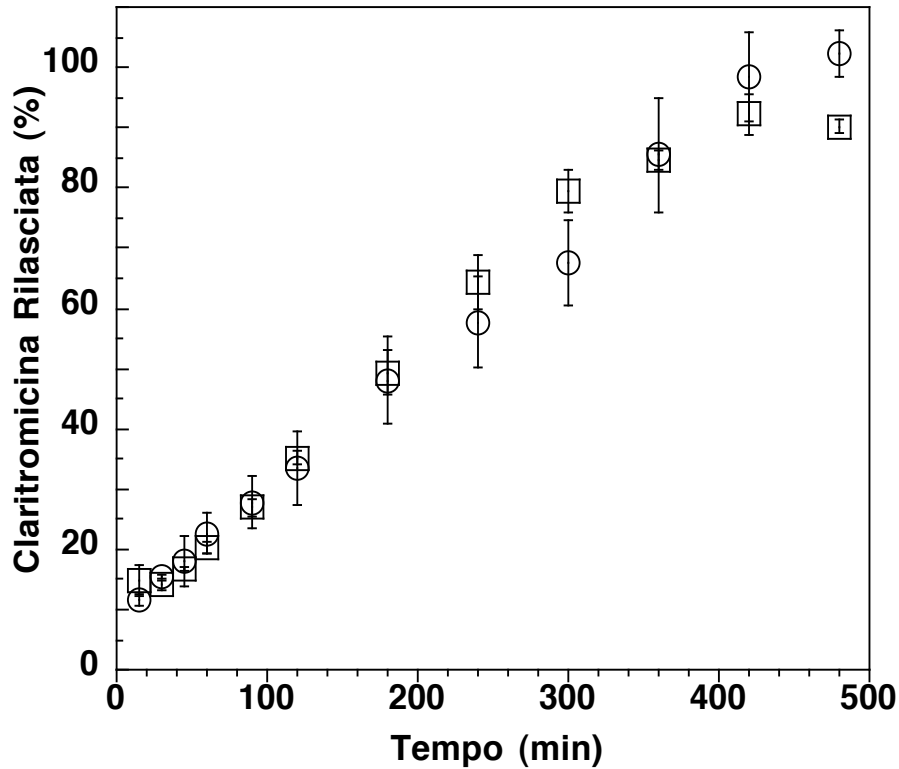


Figura 38: Confronto dei profili di rilascio della formulazione #C3 assemblata in 5 moduli (○) ($n=6$) e della formulazione #C6 in configurazione "a camera vuota" (□) ($n=6$).

Il fattore di similarità f_2 è 71,4; ciò indica che i profili di dissoluzione sono simili, infatti sono quasi completamente sovrapponibili e rilasciano entrambi il 100% di farmaco dopo 8 ore. Quindi la variazione di geometria non influisce in modo significativo sul rilascio di principio attivo. Tuttavia l'assemblato a 5 offre la possibilità di modulare il numero di moduli e di conseguenza la dose di claritromicina somministrata.

4.1.2 Simulazione della concentrazione gastrica di claritromicina

Per valutare se a livello gastrico la concentrazione di farmaco rilasciato potesse mantenersi al di sopra della MIC per un tempo prolungato, i dati di dissoluzione sono stati analizzati mediante il programma di simulazione STELLA[®], la cui descrizione è riportata in sezione 3.2.18. I parametri necessari per la simulazione sono stati ricavati dai profili di dissoluzione e dai dati riportati in letteratura.

La Minima Concentrazione Inibente (MIC) della claritromicina per l'*Helicobacter Pylori* è pari a 2 µg/ml [83-86]. Il volume del contenuto gastrico a stomaco pieno è di circa 1 L o 1,5 L [87]. Il volume massimo che lo stomaco può raggiungere è di 3 L [77, 88, 89].

Siccome la claritromicina viene somministrata a stomaco pieno si è preso come riferimento un volume del contenuto dello stomaco pari a 1,5 L, quindi dal valore di MIC preso come riferimento, è necessario che nello stomaco siano presenti almeno 3 mg di claritromicina per permettere l'eradicazione dei batteri sensibili all'antibiotico.

La costante di dissoluzione è stata ricavata dai profili di dissoluzione sopra riportati utilizzando un'equazione di ordine zero ricavata per regressione lineare del profilo.

Si è calcolata la costante di dissoluzione per le formulazioni #C3 assemblata in 5 moduli (**Figura 39**) e #C6 in configurazione "a camera vuota" (**Figura 40**).

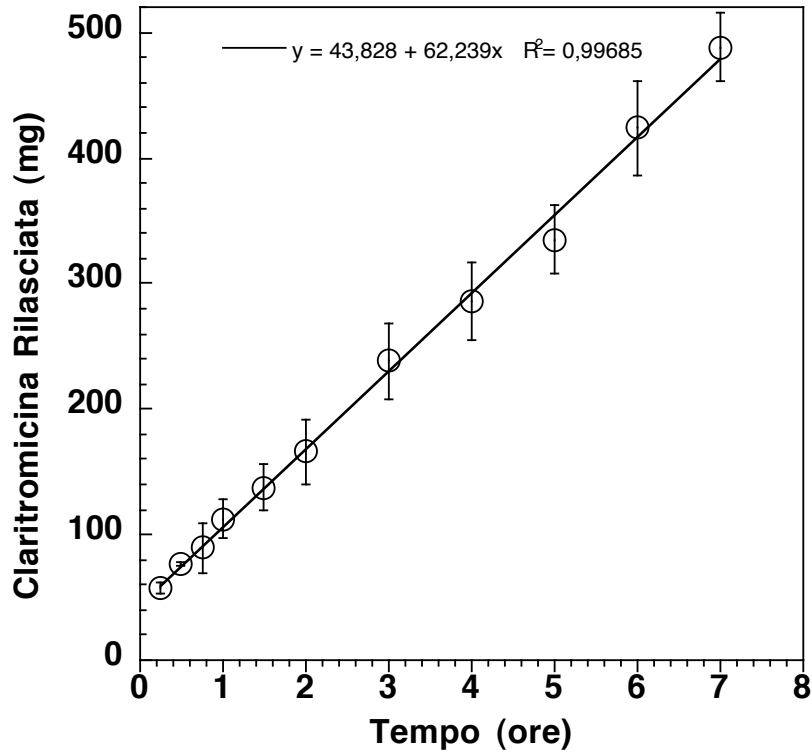


Figura 39: Calcolo della costante di dissoluzione di ordine zero della formulazione #C3 assemblata in 5 moduli.

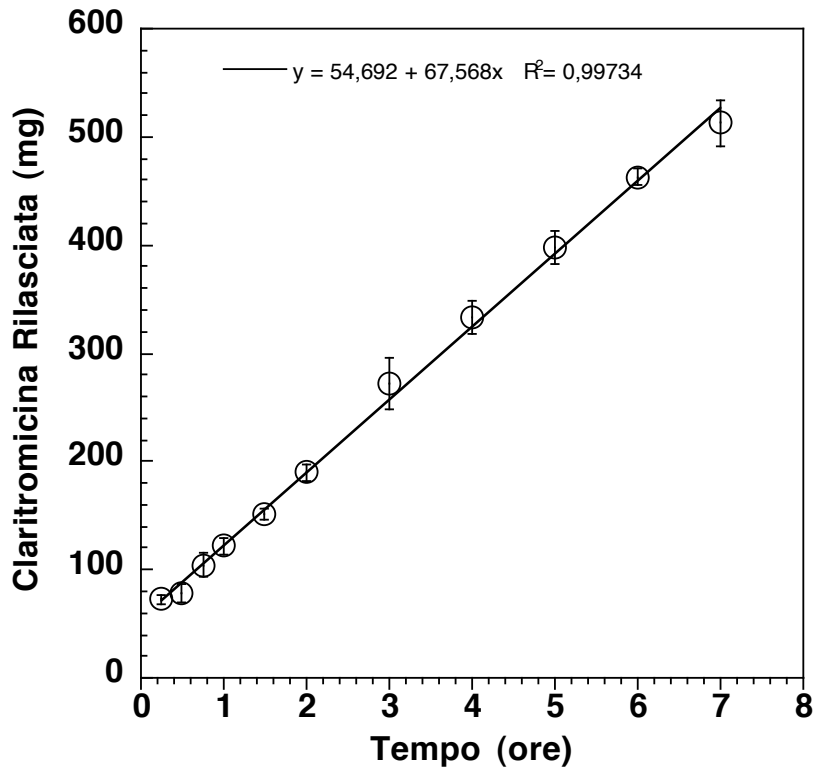


Figura 40: Calcolo della costante di dissoluzione di ordine zero della formulazione #C6 in configurazione "a camera vuota".

La K_{diss} calcolata per la formulazione #C3 assemblata in 5 moduli è pari a 62,239 mg/ora, mentre la K_{diss} calcolata per la formulazione #C6 in configurazione “a camera vuota” è pari a 67,568 mg/ora.

I valori ottenuti sono stati utilizzati nel programma di simulazione per determinare il contenuto in mg di claritromicina nello stomaco.

Uno studio *in vivo* della gastroretentività dei sistemi assemblati [90] ha dimostrato che le preparazioni farmaceutiche ottenute mediante tecnologia Dome Matrix® galleggiano e restano a livello gastrico per circa 5 ore. Per questo motivo nel programma di simulazione è stata imposta l’uscita della forma farmaceutica dallo stomaco dopo 5 ore. E’ stato tenuto conto di un assorbimento minimo della forma farmaceutica in soluzione e della fuoriuscita dallo stomaco.

I risultati ottenuti dalla simulazione mediante il programma STELLA® mostrano che entrambe le formulazioni rilasciano una quantità di principio attivo superiore a 3 mg per tutto il tempo in cui restano a livello gastrico (Figura 41 e 42).

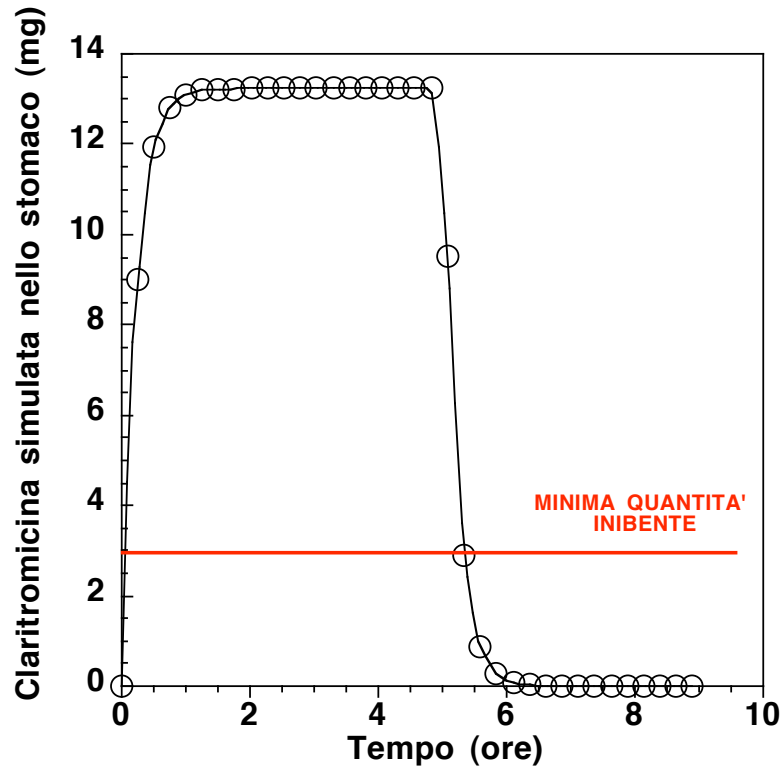


Figura 41: Simulazione del contenuto gastrico per la formulazione #C3 assemblata in 5 moduli contenente 500 mg di Claritromicina.

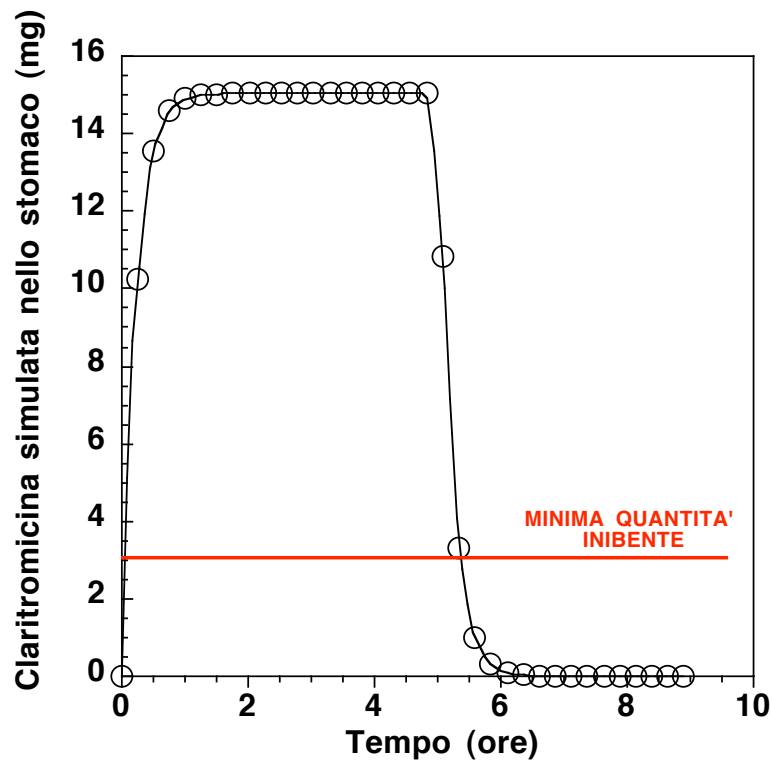


Figura 42: Simulazione del contenuto gastrico per la formulazione #C6 in configurazione "a camera vuota" contenente 500 mg di Claritromicina.

Considerato che, secondo la simulazione, la quantità presente nello stomaco nell'intervallo di tempo delle 5 ore, era superiore alla minima quantità inibente si è deciso di provare a diminuire il dosaggio di farmaco. Utilizzando la formulazione #C3 (riportata in **Tabella IX**) è stato prodotto un nuovo sistema contenente 300 mg di claritromicina: un modulo maschio è stato incastrato sulla base concava di un modulo femmina in modo tale da ottenere una configurazione "a camera vuota", successivamente sul modulo femmina della configurazione ottenuta è stato impilato mediante incastro un modulo femmina (**Figura 43**).



Figura 43: Formulazione #C3 assemblata in 3 moduli.

I sistemi Dome Matrix® così assemblati sono stati saggiati mediante il test di dissoluzione.

I sistemi galleggiavano appena messi a contatto con il mezzo di dissoluzione e continuavano a galleggiare fino a completa dissoluzione.

Il profilo di rilascio ottenuto per questa formulazione è riportato in **Figura 44**.

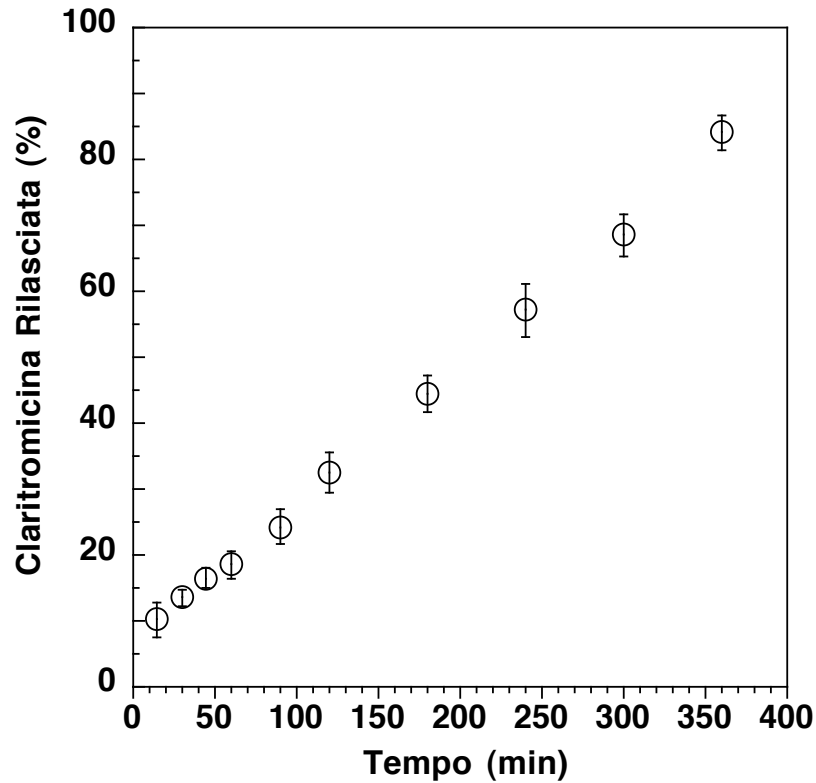


Figura 44: Profilo di rilascio della formulazione #C3 assemblata in 3 moduli ($n=6$).

È stata calcolata la cinetica di rilascio per questa formulazione utilizzando l'equazione 1 descritta nella sezione 1.3. Il valore di n per la formulazione #C3 assemblata in 3 moduli è pari a 0,63 (dato non mostrato).

Questo valore indica che la cinetica di rilascio per questo sistema è di tipo anomalo-fickiana. Anche in questo caso l'equazione esponenziale non descrive in modo accurato il profilo di rilascio della claritromicina, quindi nella simulazione è stato descritto il rilascio con un'equazione lineare.

È stata calcolata la costante di dissoluzione per questo sistema (**Figura 45**).

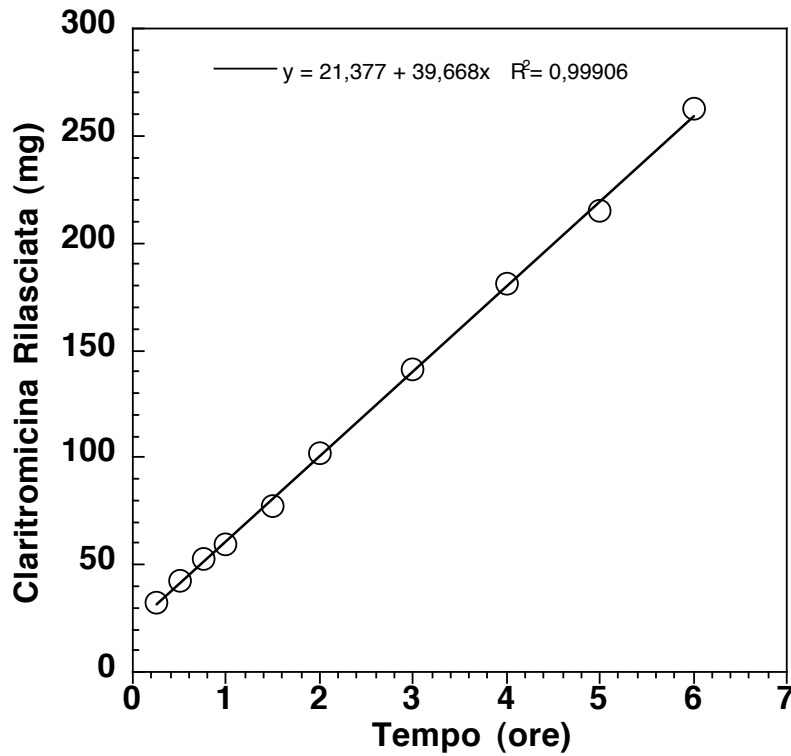


Figura 45: Calcolo della costante di dissoluzione della formulazione #C3 assemblata in 3 moduli.

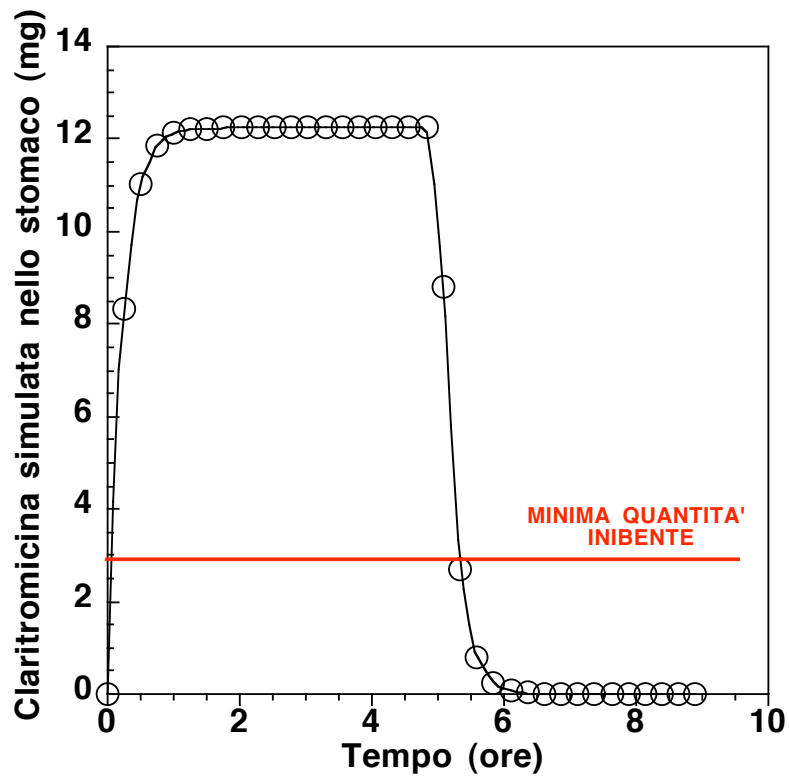


Figura 46: Simulazione del contenuto gastrico per la formulazione #C3 assemblata in 3 moduli contenente 300 mg di Claritromicina.

Inserendo il valore ottenuto nel programma di simulazione, si nota che la formulazione rilascia una quantità di principio attivo superiore alla MIC per tutto il tempo in cui resta a livello gastrico (**Figura 46**).

In **Figura 47** è riportato il confronto dei contenuti gastrici di claritromicina (espressa in mg) nello stomaco, ottenuti dal programma simulazione STELLA[®], per le formulazioni #C3 assemblata in 5 moduli, #C6 in configurazione “a camera vuota” e #C3 assemblata in 3 moduli. In tutti e tre i casi, la quantità di farmaco si mantiene superiore al valore di minima quantità inibente (3 mg, corrispondenti alla MIC di 2 µg/ml in 1,5 L di contenuto gastrico) per tutto il tempo di permanenza della forma farmaceutica nel tratto gastrico.

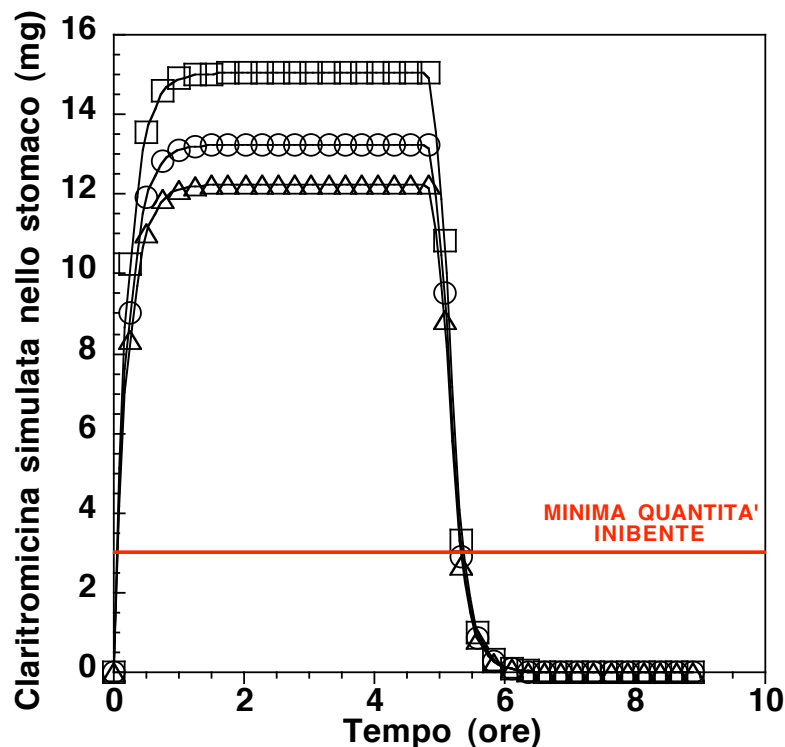


Figura 47: Simulazione della concentrazione nello stomaco per le formulazioni #C3 assemblata in 5 moduli (○), #C6 in configurazione “a camera vuota” (○) e #C3 bis assemblata in 3 moduli (△).

4.2 Amoxicillina

4.2.1. Moduli e assemblato di amoxicillina

In Tabella XI sono riportate le formulazioni di Amoxicillina utilizzate per la preparazione dei moduli Dome Matrix® a rilascio modificato; per ogni formulazione è stata studiata la cinetica di rilascio del farmaco. I diversi profili sono stati ottenuti variando la percentuale di polimero utilizzato e di principio attivo.

Tabella XI: Formulazioni dei moduli di Amoxicillina espresse in percentuale e contenuto (mg).

	A1 (mg)	A2 (mg)	A3 (mg)
Amoxicillina	92,6	100	105
HPMC K100M	46,14	46,2	21
Talco	5,79	6,2	3,78
Magnesio stearato	1,45	1,6	1,26
TOTALE	145,98 mg	154 mg	131,04 mg

I moduli ottenuti sono stati sottoposti al test di dissoluzione in fluido gastrico simulato pH 1,2 e i campioni prelevati a tempi prestabiliti durante il test di dissoluzione sono stati analizzati mediante spettrofotometria UV. Il metodo analitico UV è stato precedentemente convalidato per i valori di linearità, precisione e accuratezza.

Il titolo dei moduli Dome Matrix® di Amoxicillina è stato effettuato mediante analisi in UV-visibile in tampone pH 7,4 (metodo validato precedentemente) per garantire una maggiore stabilità del principio attivo e minimizzarne la degradazione. Infatti a pH 1,2 il principio attivo degrada rapidamente formando un degradato che assorbe alla medesima lunghezza d'onda. La presenza del degradato porta ad un incremento del valore di assorbanza (**Figura 48**) ottenendo un titolo di farmaco superiore al 110% dopo 2 ore.

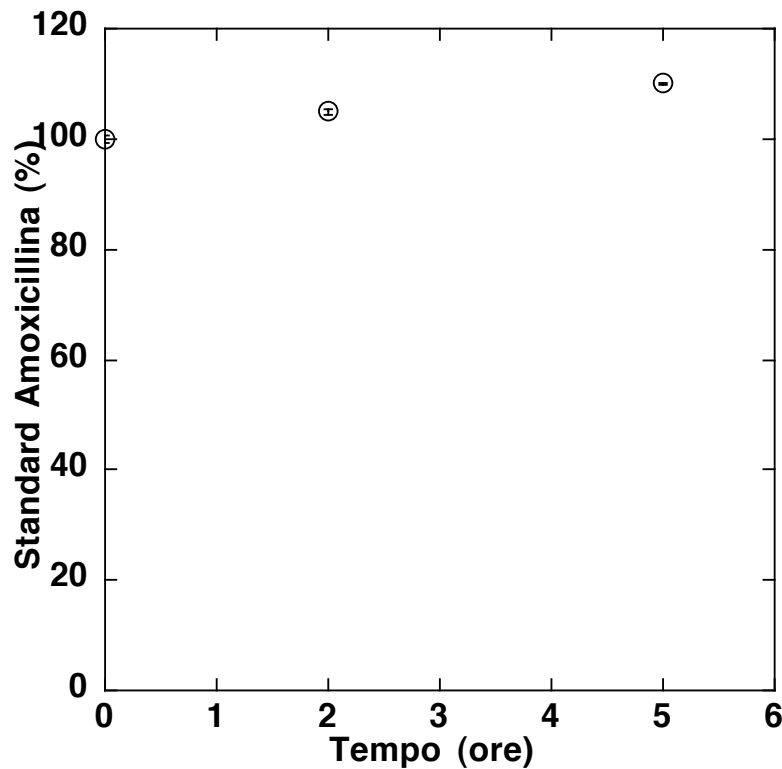


Figure 48: *Profilo di stabilità dell'Amoxicillina in fluido gastrico simulato a 37°C*

Per la determinazione del titolo, i moduli di amoxicillina sono stati lasciati a contatto con il medium per quattro ore, secondo la procedura riportata in sezione 3.2.7. In questo intervallo di tempo, parte del farmaco si è degradato a pH 1,2 ottenendo un valore non attendibile del contenuto di farmaco. A pH 7,4 non si è osservata una degradazione significativa del principio attivo. In **Figura 49** è riportato il profilo di stabilità di due soluzioni standard a concentrazione nota di amoxicillina e della soluzione utilizzata per la determinazione del titolo dei moduli prodotti. Come si evince dalla Figura 49, il valore di assorbanza non subisce variazioni nell'arco delle 24 ore a dimostrazione della stabilità del farmaco in tampone 7,4.

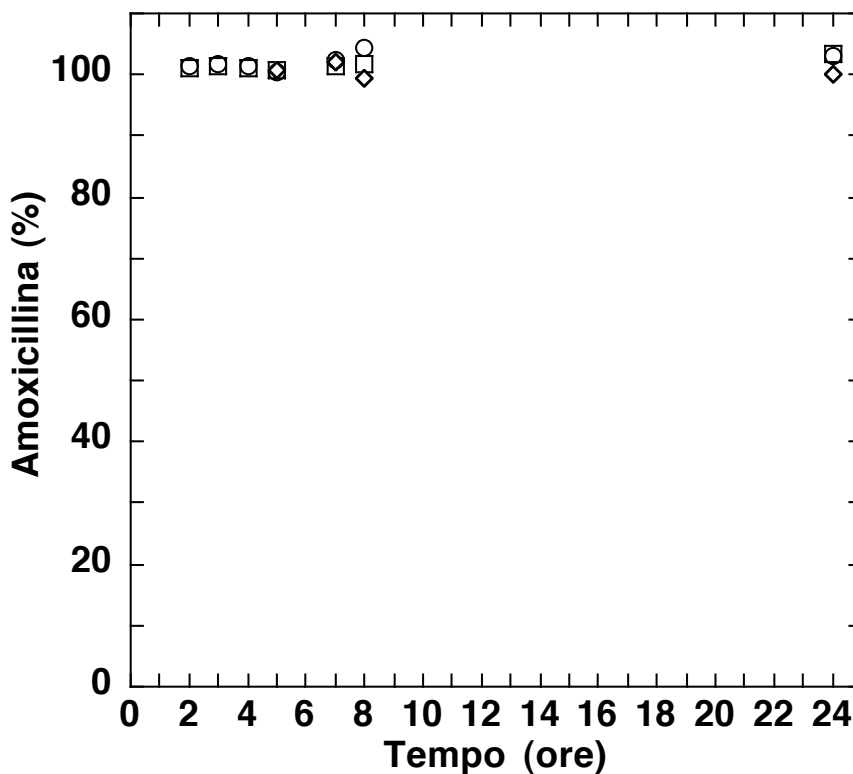


Figura 49: Profilo di stabilità di due soluzioni standard: 0,11832 mg/ml (○); 0,23664 mg/ml (□) e titolo (△) di Amoxicillina a 37°C in tampone pH 7,4.

4.2.1.1 Profilo di dissoluzione della formulazione A1

Per la formulazione A1 sono stati preparati moduli maschio e femmina con un diametro di 7,4 mm ed assemblati in configurazione a camera vuota. Ogni modulo conteneva 92,6 mg di farmaco e circa 46 mg di HPMC quindi in rapporto principio attivo/polimero 1:2 (Tabella XI).

I moduli sono stati assemblati in configurazione "a camera vuota", inserendo la protrusione presente sulla base concava di un modulo maschio nella base concava di un modulo femmina. I sistemi Dome Matrix® assemblati sono stati sottoposti al test di dissoluzione a pH 1,2, come descritto nella sezione 3.2.12.

I campioni prelevati sono stati analizzati mediante spettrofotometro UV-Visibile come descritto in sezione 3.2.13.

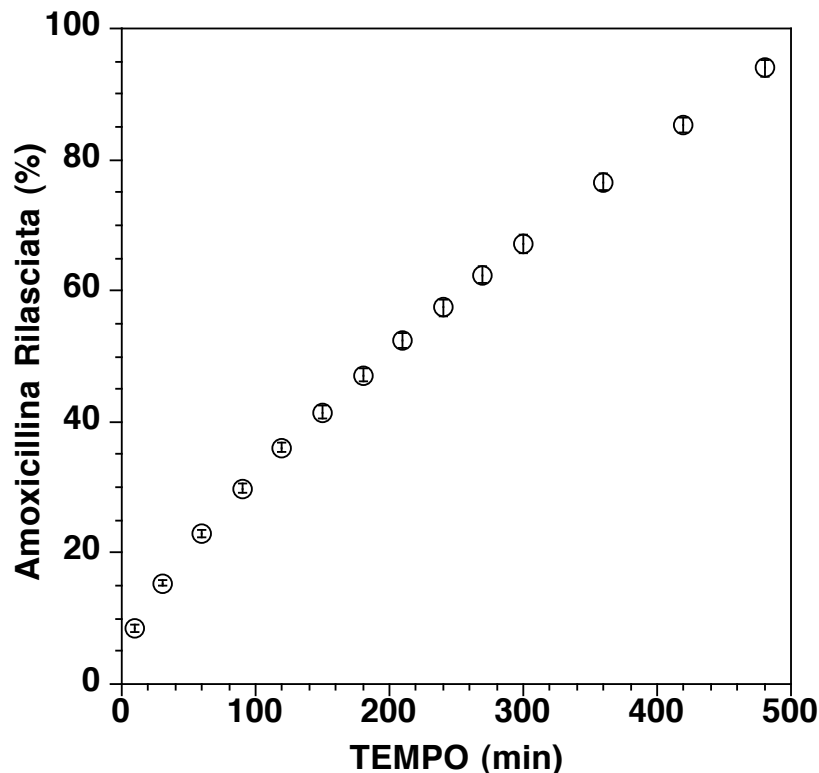


Figura 50: Profilo di rilascio della formulazione A1 in configurazione "a camera vuota" (n=6)

Il profilo di rilascio per questa formulazione è riportato in **Figura 50**. Il grafico mostra un rilascio di farmaco superiore all'80% dopo 7 ore. La cinetica di rilascio segue un andamento anomalo-fickiano ($n=0,61$).

4.2.1.2 Profilo di dissoluzione della formulazione A2

Anche per questa formulazione riportata in **Tabella XI** sono stati preparati moduli maschio e femmina con un diametro di 7,4 mm ed assemblati in configurazione "a camera vuota". In questa formulazione è stata mantenuta costante la quantità di HPMC mentre il principio attivo è stato aumentato (100 mg) per tentare di caricare più farmaco all'interno di ogni modulo in modo da somministrare la dose corretta.

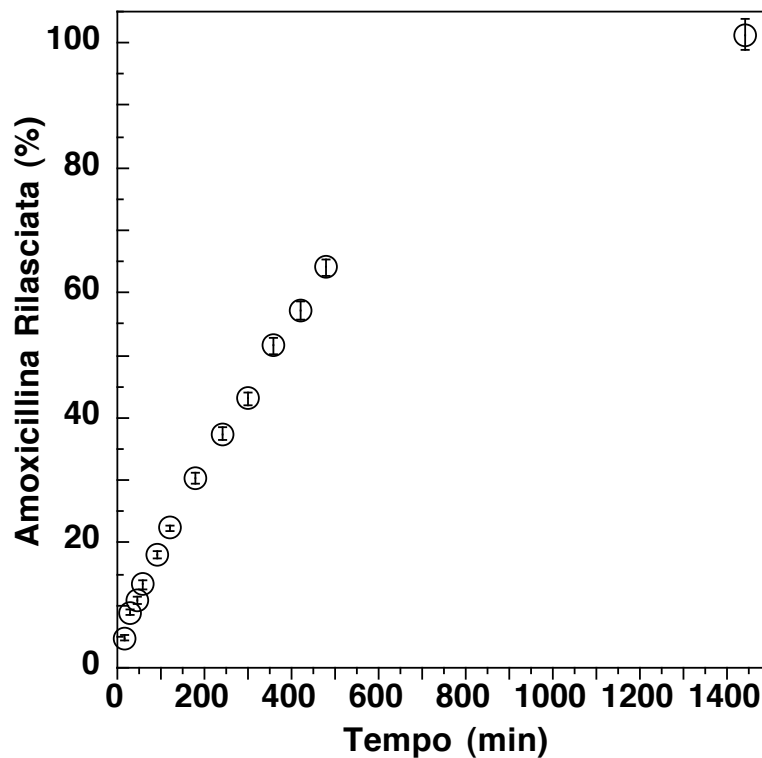


Figura 51: Profilo di rilascio della formulazione A2 nell'arco di 24 h in fluido gastrico simulato a 37°C ($n=6$).

Il profilo di rilascio dei moduli è stato riportato in **Figura 51**.

Dopo 8 ore il rilascio percentuale di farmaco è inferiore all'80%, quindi si è deciso di prolungare la dissoluzione fino alla 24^a ora, ottenendo un rilascio di farmaco del 100%. Anche in questo caso la cinetica di rilascio segue un andamento anomalo-fickiano con n pari a 0,73.

4.2.1.3 Profilo di dissoluzione della formulazione A3

Nel caso della formulazione A3 è stato ridotto di circa la metà il contenuto di HPMC rispetto alla formulazione A2, mentre il contenuto di farmaco (mg) è stato mantenuto costante (**Tabella XI**). Come nel caso delle formulazioni precedenti, sono stati prodotti moduli maschio e moduli femmina assemblati tramite incastro in configurazione "a camera vuota".

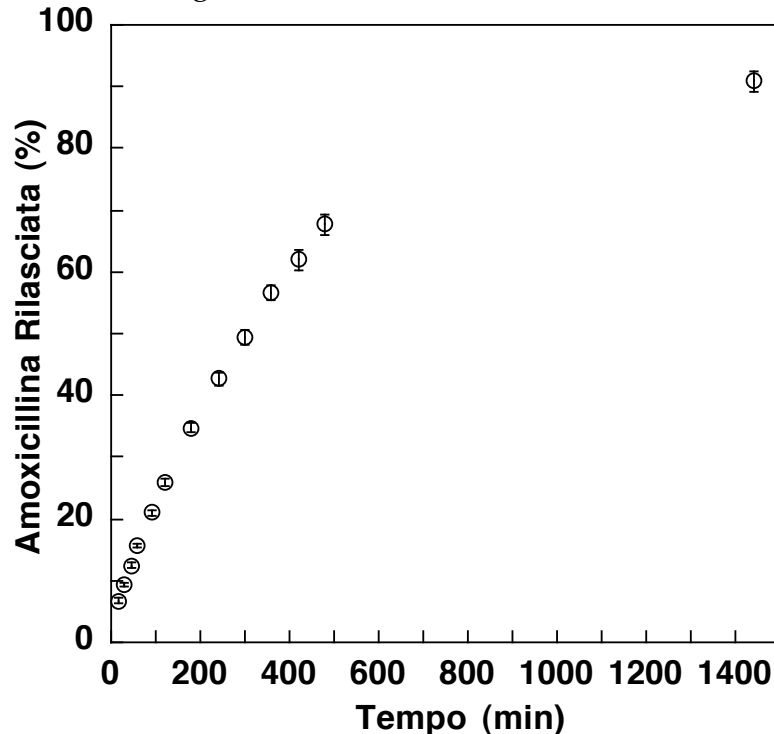


Figura 52: Profilo di rilascio della formulazione A3 nell'arco di 24 h in fluido gastrico simulato a 37°C (n=6).

Il profilo di rilascio è mostrato in **Figura 52**.

Anche nel caso della formulazione A3 si è ottenuto un rilascio di farmaco superiore all'80% dopo 8 ore dall'inizio del test di dissoluzione e la cinetica è anomalo-fickiana ($n=0,695$).

4.2.1.4 Profilo di dissoluzione di moduli da 11 mm

Anche nel caso dell'amoxicillina, così come per la claritromicina, abbiamo prodotto un sistema "a camera vuota" di 11 mm di diametro che potesse contenere una dose maggiore di amoxicillina. La formulazione A4 utilizzata è riportata in **Tabella XII**.

Tabella XII: Formulazione dei moduli A4.

	A4 (mg)
Amoxicillina Triidrato	235,5
HPMC K100M	60
Talco	9
Magnesio Stearato	3
Totale	307,5

Dal profilo di rilascio, mostrato in **Figura 53**, si può notare un rilascio di farmaco superiore all'80% dopo 10 ore.

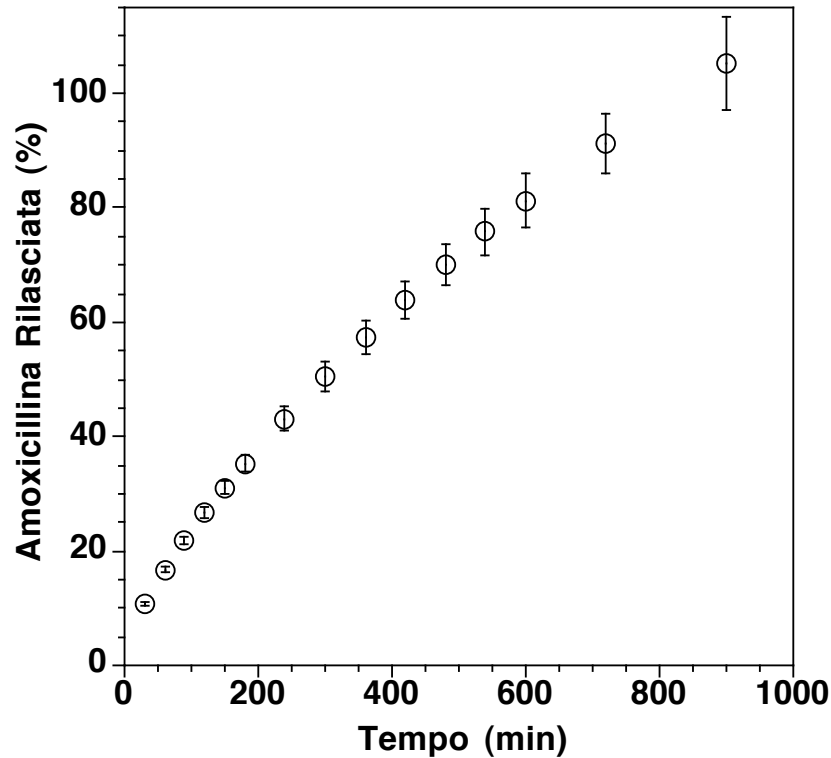


Figura 53: *Profilo di rilascio della formulazione A4 nell'arco di 24 h in fluido gastrico simulato a 37 °C (n=6).*

4.2.1.5 Simulazione del contenuto gastrico di amoxicillina

Nel caso dell'amoxicillina la MIC per l'*Helicobacter Pylori* è pari a 0,06 mg/L [84, 86, 91-94]. Affinché la terapia antibiotica sia efficace è necessario che la concentrazione del farmaco nel sito d'azione si mantenga al di sopra del valore di MIC. Il fattore predominante nell'eradicazione dell'*Helicobacter Pylori* è sicuramente il contenuto gastrico di farmaco, o più precisamente il volume gastrico da cui si determina la concentrazione di farmaco presente.

Per avere una stima della concentrazione di amoxicillina presente a livello gastrico durante la terapia, anche in questo caso i dati di dissoluzione in vitro

sono stati analizzati mediante il programma di simulazione STELLA®, come descritto nella sezione 3.2.18. I dati ottenuti del test di dissoluzione sono stati rielaborati sulla base dei seguenti presupposti:

- La costante di dissoluzione K_{diss} è stata calcolata sulla base di equazioni di ordine zero;
- L'amoxicillina è assunta a stomaco pieno, per tale motivo nel calcolo della MIC si deve considerare il volume gastrico a stomaco pieno. A stomaco vuoto il volume gastrico è di 1 L e può raggiungere un volume massimo di 3 L successivamente ad un pasto [87, 88]. Come nel caso della claritromicina, come valore di riferimento è stato preso un volume gastrico di 1,5 L; il valore di minima quantità inibente per l'amoxicillina sarà quindi 0,09 mg;
- Studi *in vivo* condotti precedentemente sulla gastroretentività dei sistemi assemblati di moduli Dome Matrix® hanno dimostrato che questi sistemi hanno la capacità di permanere nello stomaco per un tempo di almeno 5 ore. Per questo motivo nei parametri iniziali del programma di simulazione è stato impostato il tempo di uscita della forma farmaceutica dallo stomaco di 5 ore. Inoltre sono stati impostati parametri sull'assorbimento e fuoriuscita dallo stomaco.

Il profilo di simulazione delle diverse formulazioni è riportato in **Figura 54**. In tutti e tre i casi, la concentrazione di farmaco si mantiene al di sopra del valore preso come riferimento (0,09 mg).

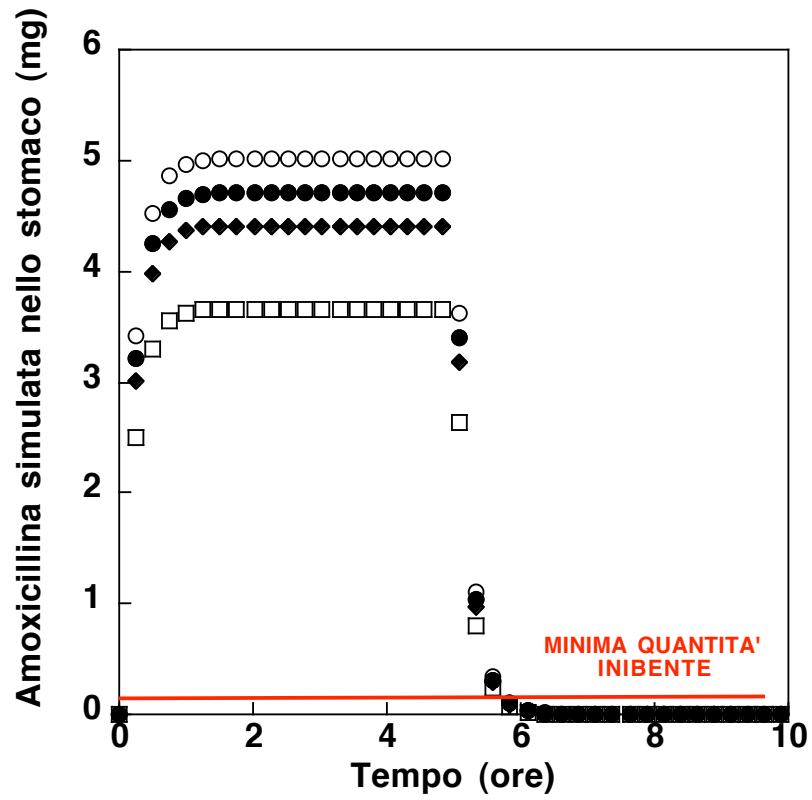


Figura 54: Simulazione della concentrazione di Amoxicillina nello stomaco per le formulazioni A1 (□), A2 (○), A3 (●), A4 (◆).

4.3 Assemblaggio dei moduli di claritromicina e amoxicillina

Dall'analisi dei dati di dissoluzione e dallo studio di simulazione mediante il programma STELLA® si è osservato che, nel caso della claritromicina, era sufficiente un assemblato di 3 moduli di formulazione C3 per raggiungere una quantità di principio attivo superiore di circa 4 volte rispetto alla MIC per l'*Helicobacter Pylori*. Analogamente, nel caso dell'Amoxicillina erano sufficienti 2 moduli di formulazione A2 per avere quantità di farmaco molto alte nello stomaco. Queste conclusioni rappresentano un aspetto importante ai fini del progetto di dottorato, in quanto dai risultati ottenuti è stato possibile ridurre le dosi di entrambi gli antibiotici e riunirli in un unico assemblato, ottenendo così un'unica forma farmaceutica da somministrare.

Si è deciso di sviluppare un nuovo sistema di dosaggio basato su un sistema assemblato di 3 moduli di claritromicina (formulazione C3, contenente 300 mg di farmaco) a cui assemblare 2 moduli di amoxicillina (formulazione A2) nel seguente modo: un modulo maschio di claritromicina è stato incastrato con un modulo femmina contenente lo stesso farmaco in configurazione a camera vuota (void); un altro modulo femmina di claritromicina è stato impilato sulla faccia convessa del sistema "a camera vuota". Successivamente due moduli femmina impilati di amoxicillina sono stati assemblati sulla faccia convessa del modulo femmina. Si ottiene così l'assemblato mostrato in **Figura 55** che contiene entrambi gli antibiotici.

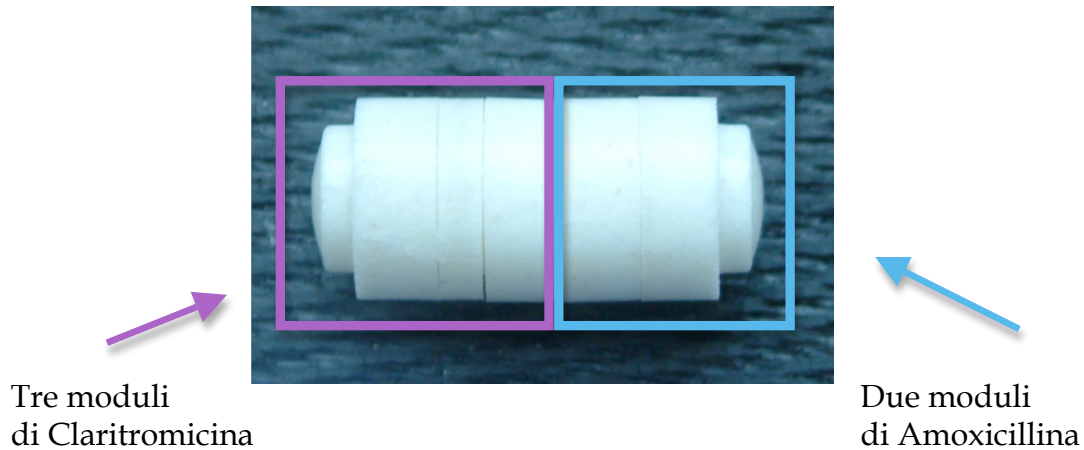


Figura 55: *Assemblato di 5 moduli ottenuto incastrando due moduli femmina di Amoxicillina (i due a destra) al sistema assemblato di 3 moduli di Claritromicina.*

Il sistema è stato testato come descritto in sezione 3.2.6.3 per valutare la sua capacità di rimanere assemblato nonostante gli urti. Tutti i sistemi assemblati hanno resistito al test del friabilometro e nessuno si è aperto.

Il sistema è stato sottoposto al test di dissoluzione come descritto in sezione 3.2.12. Durante il test di dissoluzione è stato osservato un profilo di rilascio dell'amoxicillina superiore al 100% già nelle prime ore di dissoluzione, in contraddizione rispetto a quanto osservato durante lo studio del profilo di dissoluzione in vitro dei due moduli di amoxicillina.

Si è deciso di analizzare un campione di claritromicina mediante metodo UV e si è osservato che tale farmaco assorbiva alla stessa lunghezza d'onda dell'amoxicillina. Il diverso profilo di rilascio dell'amoxicillina nel sistema assemblato a 5 moduli rispetto al profilo di dissoluzione di soli 2 moduli di amoxicillina era dovuto al fatto che la claritromicina interferiva durante l'analisi

UV dei campione di dissoluzione di amoxicillina.

Si è individuato un metodo analitico in grado di analizzare contemporaneamente i due antibiotici ma si ottenevano dei picchi cromatografici molto allargati e scodati, aventi una scarsa risoluzione.

Quindi i campioni di dissoluzione contenenti i due farmaci sono stati analizzati mediante due metodiche analitiche differenti secondo quanto riportato nelle sessioni 3.2.14 e 3.2.15.

E' stata verificata la linearità del metodo HPLC per l'Amoxicillina con una retta di calibrazione analizzando campioni a concentrazioni diverse (**Figura 56**).

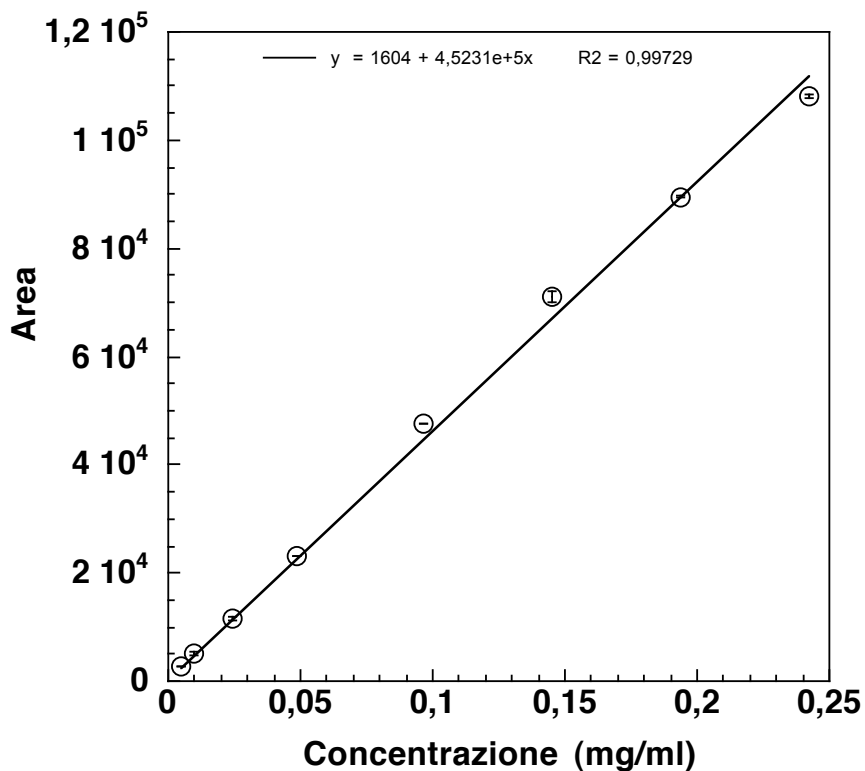


Figura 56: Retta di taratura dell'Amoxicillina in HPLC

Prima di effettuare il test di dissoluzione sull'assemblato totale, si è deciso di

ripetere la dissoluzione su due moduli contenenti soltanto Amoxicillina assemblati sia in configurazione a camera vuota (come avevamo fatto singolarmente) che in configurazione impilata (come sono negli assemblati) e di analizzarli mediante il metodo HPLC (Figura 57).

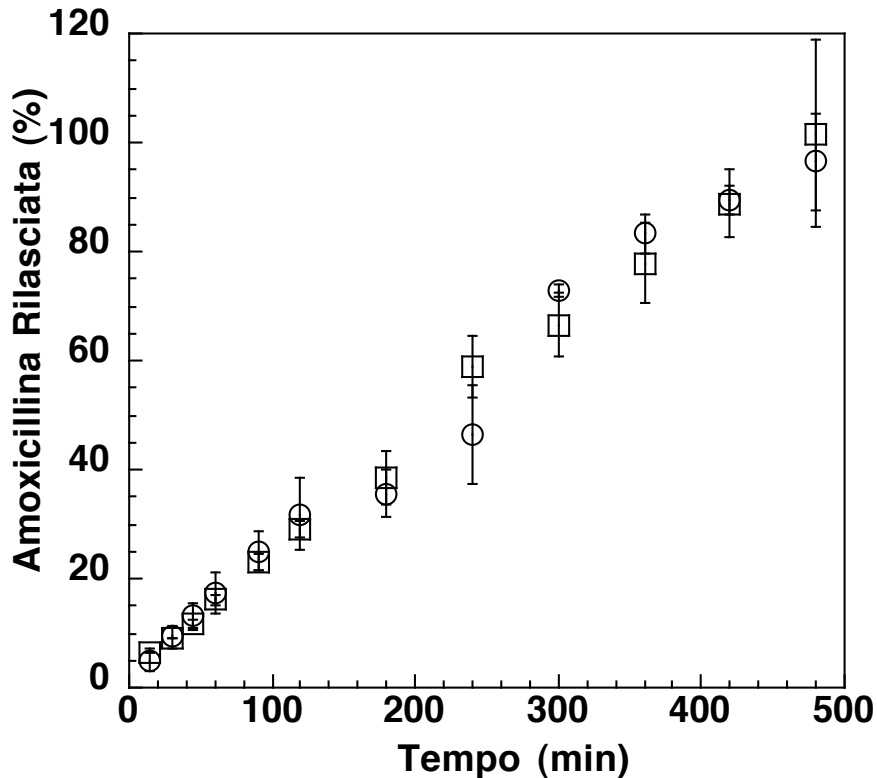


Figura 57: Confronto dei profili di dissoluzione dei moduli di amoxicillina in configurazione impilata (○) ($n=6$) e "a camera vuota" (□) ($n=6$).

Dal confronto dei profili di dissoluzione si evince che la diversa configurazione di assemblaggio dei moduli di amoxicillina non influisce sul profilo di rilascio del farmaco. Dal calcolo del fattore di similarità f_2 si ottiene un valore di 65,49 e quindi i profili di dissoluzione sono considerati sovrapponibili.

Il profilo di rilascio dell'Amoxicillina nell'assemblato a 5 moduli raggiunge

l'80% di farmaco rilasciato nelle 8 ore, mantenendo quindi una cinetica confrontabile con il profilo di dissoluzione dei soli moduli di amoxicillina (Figura 58). Anche per questo confronto è stato calcolato il fattore di similarità f_2 , ottenendo un valore di 66,19.

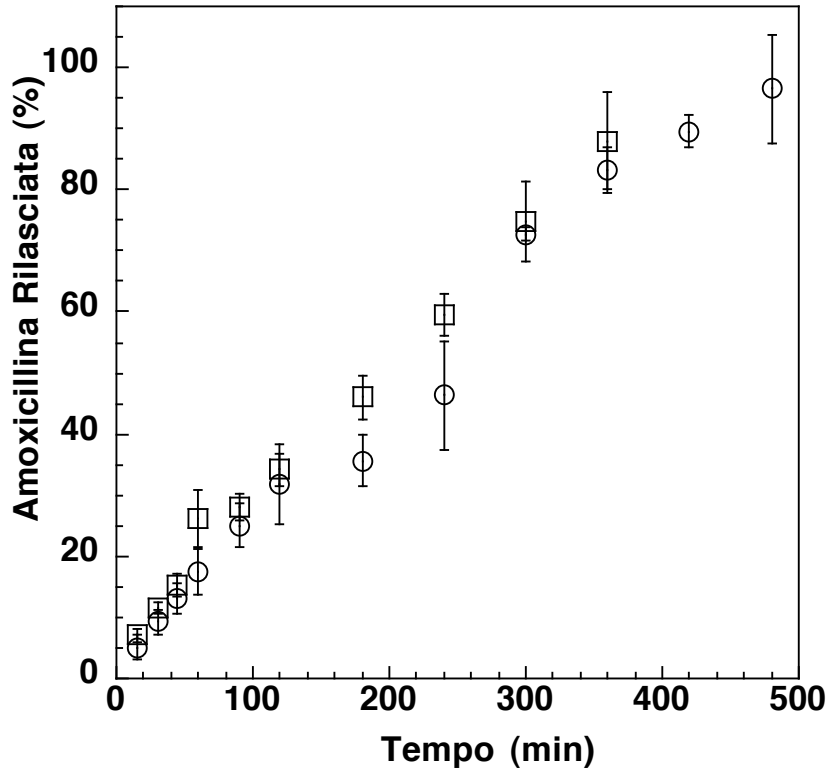


Figura 58: Confronto dei profili di rilascio di Amoxicillina nell'assemblato con Claritromicina (□) ($n=6$) e nel sistema impilato di sola Amoxicillina (○) ($n=6$).

Dai campioni prelevati durante la dissoluzione è stato anche studiato il profilo di rilascio della claritromicina dal sistema assemblato a 5 moduli, confrontandolo con il profilo avuto negli studi precedenti effettuati sul sistema assemblato di 3 moduli di claritromicina (Figura 59).

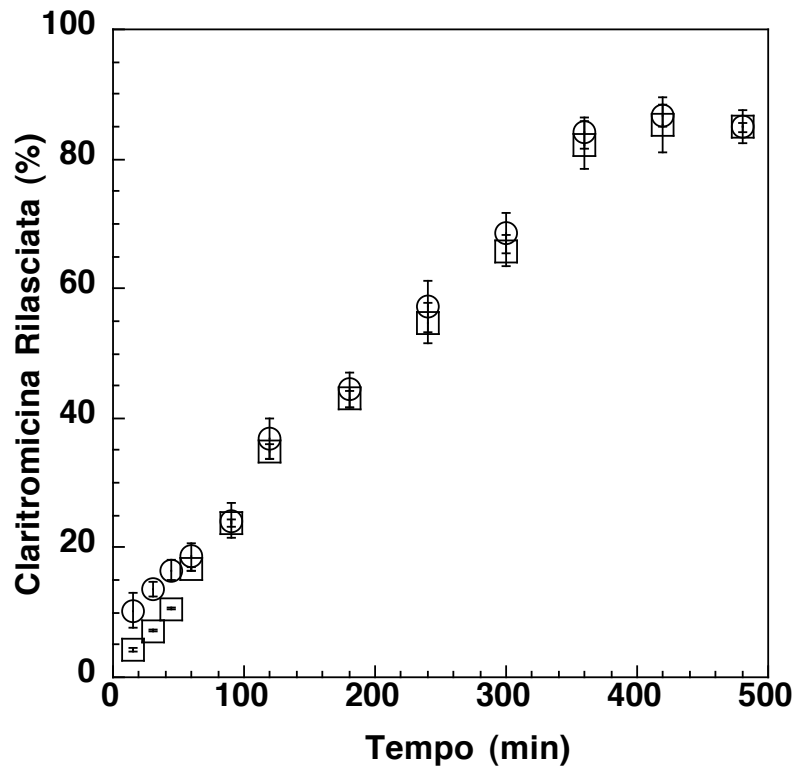


Figura 59: Confronto profili di rilascio di Claritromicina nell'assemblato con Amoxicillina (□) ($n=6$) e nel sistema a 3 moduli (○) ($n=6$).

Dal calcolo del fattore di similarità f_2 si ottiene un valore di 51,59.

Quando $f_2 \geq 50$, i profili di dissoluzione sono considerati sovrapponibili.

4.4. Studi di Galleggiamento

Sia gli assemblati composti da 3 moduli di claritromicina, sia quelli ottenuti dalla combinazione di 3 moduli di claritromicina e 2 moduli di amoxicillina sono stati sottoposti alle prove di galleggiamento secondo la procedura descritta in sessione 3.2.20.

Nel caso del sistema assemblato a 3 moduli di claritromicina, si è osservato una diminuzione della *Resultant weight* di circa il 20% durante i primi 20 minuti

dell'esperimento di galleggiamento. Tale valore si è poi mantenuto costante fino alla fine dell'esperimento (**Figura 60**). Nel caso del sistema assemblato a 5 moduli di claritromicina ed amoxicillina (**Figura 62**), si è notato un comportamento opposto rispetto a quello precedente. La *Resultant weight* aumenta di circa il 25% rispetto al valore iniziale nei primi venti minuti dell'analisi.

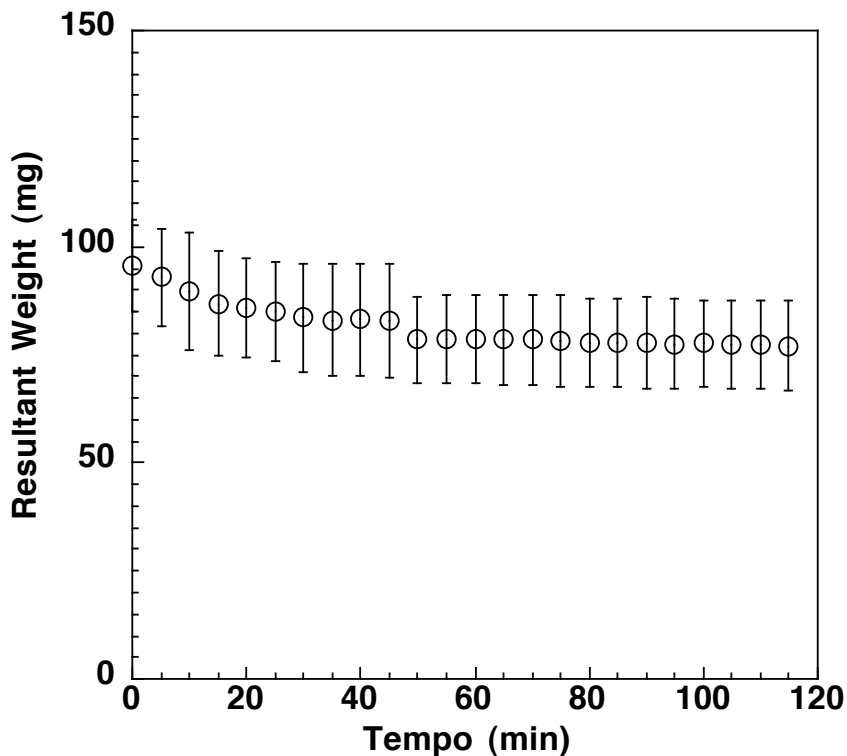


Figura 60: *Resultant weight* dell'assemblato di 3 moduli di sola claritromicina ($n=3$).

Per cercare di capire la ragione di tale comportamento, sono state scattate delle foto durante le prove di galleggiamento. Dalla foto riportata in **Figura 61** si è notata l'erosione dei moduli di claritromicina a differenza dei moduli di amoxicillina (**Figura 63**) che, contenendo una percentuale maggiore di polimero rigonfiabile, mostravano uno strato di gel più uniforme che determinava una

maggior spinta di galleggiamento.

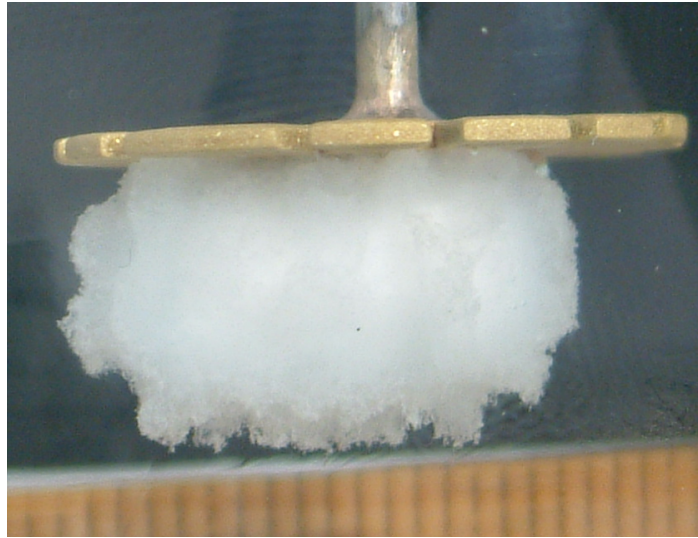


Figura 61: Immagine dei 3 moduli assemblati di claritromicina acquisita a 20 minuti.

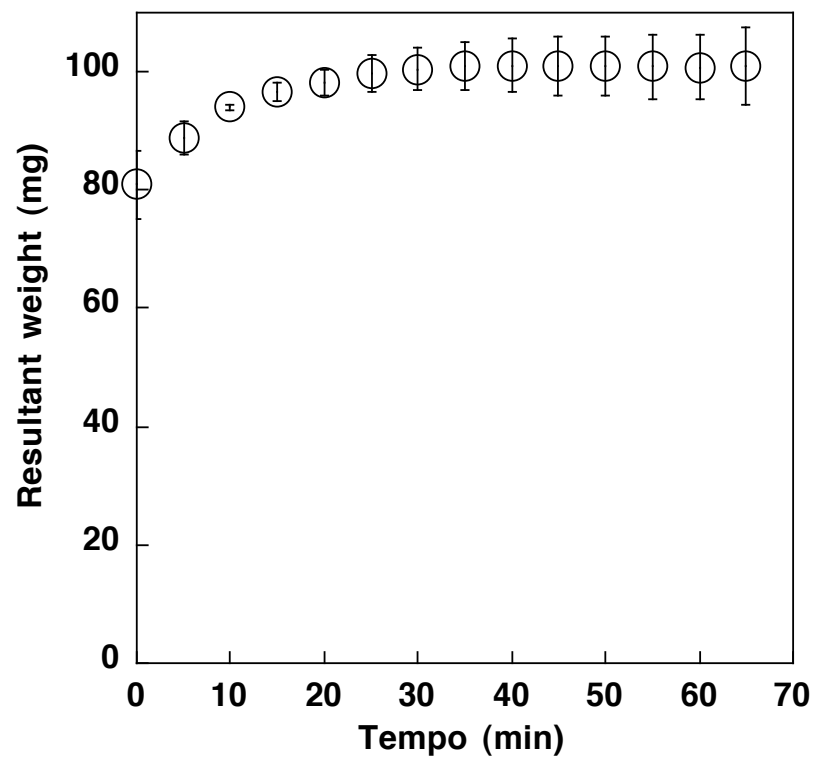


Figura 62: Resultant weight dell'assemblato contenente sia moduli di claritromicina che moduli di amoxicillina ($n=3$).

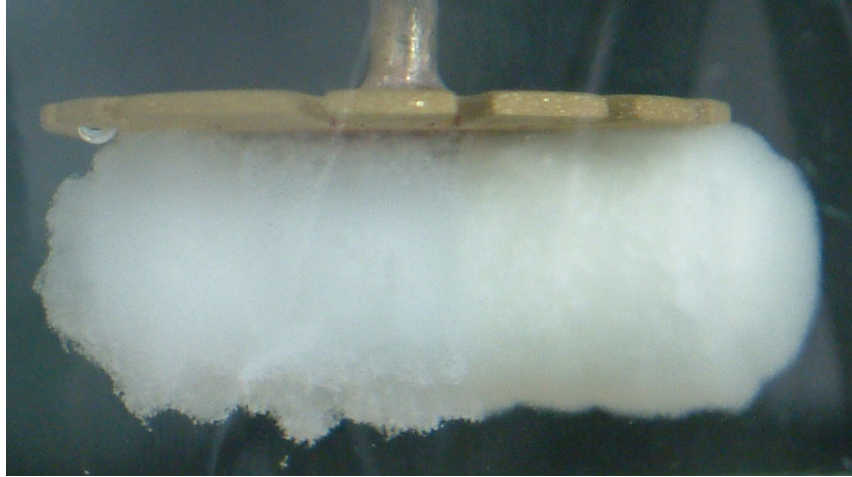


Figura 63: Immagine dei 5 moduli assemblati di claritromicina e amoxicillina acquisita a 20 minuti.

4.5 Studi in Vivo

Gli studi in vivo sono stati condotti nella parte di dottorato svolta all'estero, presso la Faculdade de Farmacia dell'Università di Porto, in Portogallo.

L'esperimento è stato condotto come descritto in sezione 3.2.21. Gli assemblati utilizzati per gli studi in vivo sono quelli costituiti da 3 moduli di claritromicina e 2 moduli di amoxicillina, in modo da somministrare ai cani 300 mg di claritromicina e 200 mg di amoxicillina.

I campioni di plasma sono stati prelevati dalla zampa anteriore del cane da un veterinario specializzato e analizzati come descritto in sezione 3.2.22.

L'analisi iniziale in HPLC con rivelatore UV non è stata molto utile in quanto le concentrazioni plasmatiche dei due farmaci erano troppo basse per poter essere rivelate. Si è sostituito il metodo analitico con un metodo analitico UPLC-MS/MS. Per analizzare i campioni plasmatici di claritromicina e amoxicillina,

sono stati utilizzati due standard interni: l'eritromicina (per la claritromicina) e l'oxacillina (per l'amoxicillina).

Le rette di calibrazione di amoxicillina e claritromicina sono riportate in **Figura 64 e 65**.

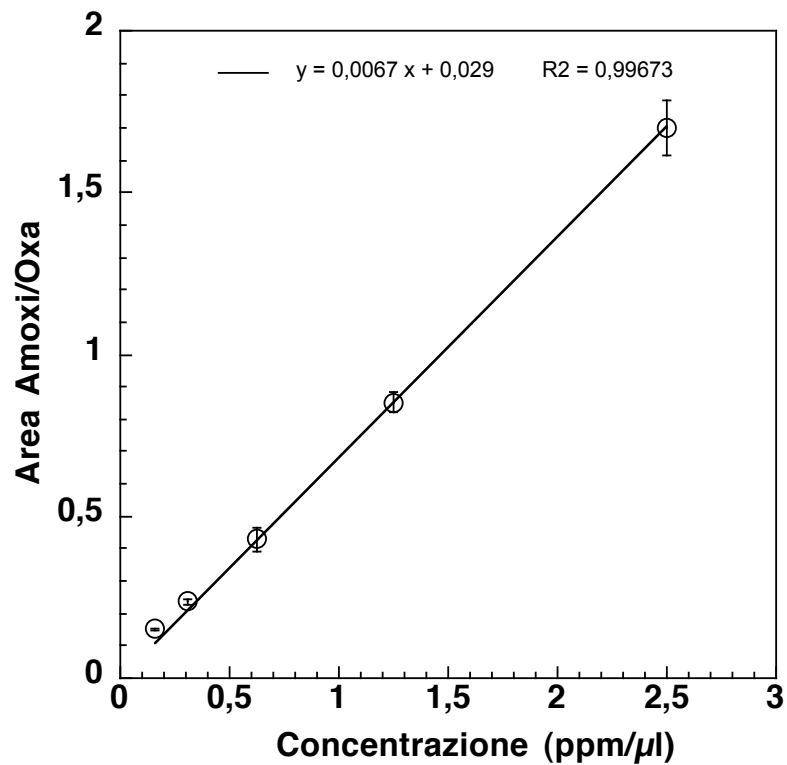


Figura 64: Retta di calibrazione dell'amoxicillina in plasma utilizzando come standard interno l'oxacillina.

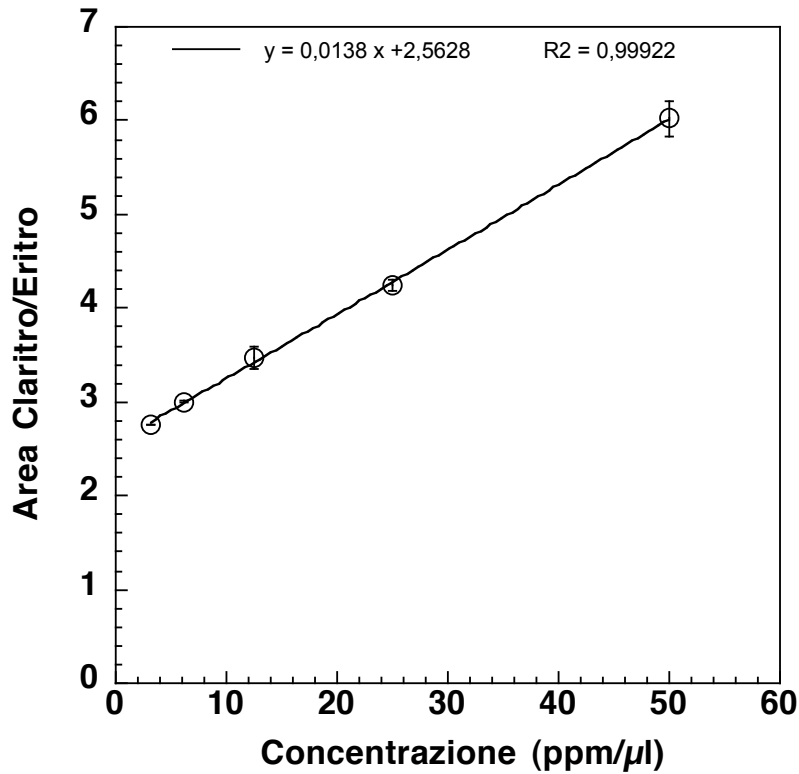


Figura 65: Retta di calibrazione della claritromicina in plasma utilizzando come standard interno l'eritromicina.

Lo studio delle concentrazioni plasmatiche è stato effettuato somministrando ai cani prima i nostri assemblati e dopo una settimana di wash out i due farmaci commerciali contemporaneamente come descritto in sezione 3.2.21. Le forme commerciali prescelte sono state quelle a rilascio immediato e ovviamente la dose è stata adattata ai cani, somministrando le stesse dosi che erano contenute nei nostri assemblati.

Le **Figure 66** e **67** riportano le curve plasmatiche ottenute per la claritromicina e l'amoxicillina.

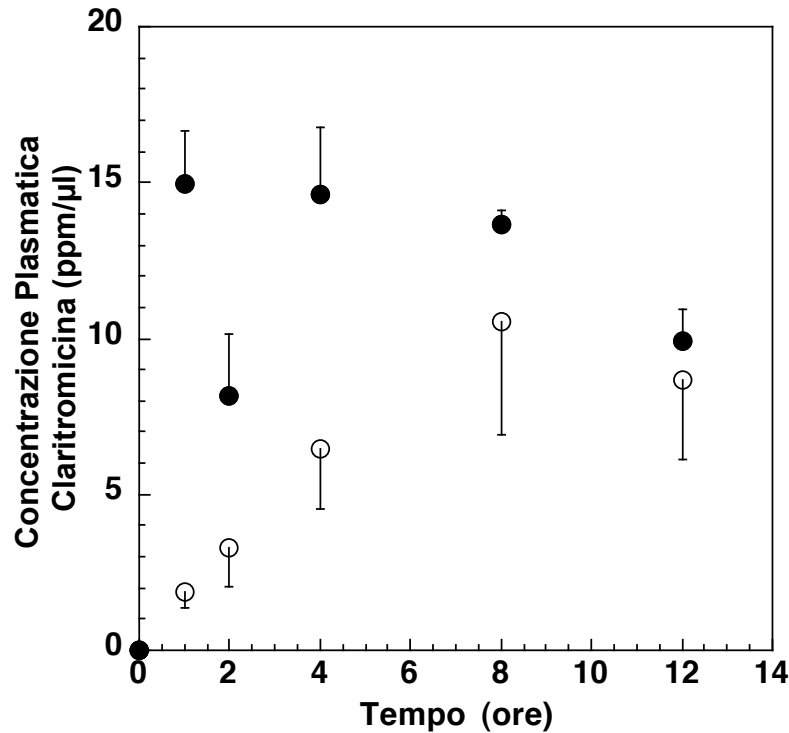


Figura 66: Curva plasmatica della claritromicina. Valori riportati dal rilascio di assemblati Dome Matrix® (○) e dalla forma farmaceutica commerciale (●) (n=6).

Come si può osservare dal grafico la curva plasmatica ottenuta con i sistemi assemblati è più bassa rispetto ai valori raggiunti con la forma farmaceutica commerciale. Utilizzando la forma in commercio, che è a rilascio immediato, si producono valori plasmatici più elevati e più rapidamente. Il fatto che i valori plasmatici degli assemblati siano più bassi è imputabile sia al fatto che i moduli hanno un rilascio abbastanza prolungato nel tempo, sia che il loro rilascio avviene per lo più nello stomaco, dove l'assorbimento è minore. I valori raggiunti più bassi indicano quindi che la gran parte del farmaco è trattenuta nello stomaco, dove andrebbe a diretto contatto con l'agente patogeno, inibendone la crescita.

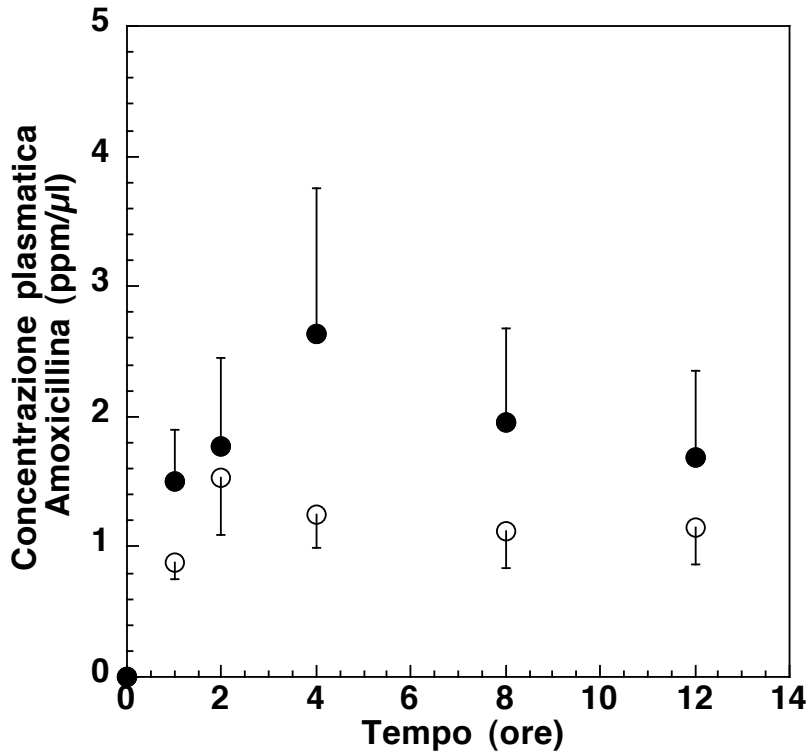


Figura 67: *Curva plasmatica dell'amoxicillina. Valori riportati dal rilascio di assemblati Dome Matrix® (○) e da forme farmaceutiche commerciali (●) (n=6).*

Anche nel caso dell'amoxicillina i valori ottenuti con i sistemi assemblati sono più bassi rispetto a quelli ottenuti con la forma commerciale. Anche in questo caso si potrebbe pensare che il fatto di ritrovare poco farmaco nel sangue nelle 12 ore con il sistema gastroretentivo sia imputabile al fatto che la maggior parte di farmaco rimane nello stomaco per un tempo piuttosto lungo dove è assorbito in maniera minima rispetto all'intestino.

Per confermare il fatto che la forma farmaceutica rimanesse all'interno dello stomaco sono stati effettuati raggi X dopo ogni prelievo. In effetti il nostro assemblato arricchito di Bario solfato era evidente nello stomaco anche dopo 4 ore.

4.6 Omeprazolo

4.6.1. Modulo di omeprazolo

Nella fase iniziale del progetto di dottorato si era pensato di aggiungere al sistema assemblato di claritromicina e amoxicillina un ulteriore modulo di omeprazolo a rilascio immediato, ma opportunamente gastroprotetto per evitare la degradazione del principio attivo a contatto con l'ambiente acido [24, 95, 96].

Successivamente sia per la difficoltà di costruire un modulo gastroprotetto, sia grazie a studi successivi, si è pensato di costruire un modulo a rilascio immediato non gastroprotetto. Alcuni studi infatti hanno rivelato che l'omeprazolo può infatti essere assorbito già a livello gastrico abbastanza rapidamente. L'unico inconveniente è rappresentato dal fatto che il principio attivo in soluzione è degradato dall'intorno dell'ambiente acido. Una soluzione al problema potrebbe essere l'aggiunta alla formulazione di un agente alcalinizzante che sia in grado di innalzare il pH della soluzione circostante riducendo la degradazione dell'omeprazolo. Il principio attivo presente all'interno della forma farmaceutica non dissolta sarebbe protetto dalla degradazione dalla presenza dell'agente alcalino, così come il farmaco appena dissolto che dovrebbe essere in parte protetto nell'intorno e in parte assorbito rapidamente.

Sono state preparate 2 formulazioni con 2 agenti tamponanti differenti: il Mg ossido e il carbonato di sodio (Na_2CO_3). In una delle due formulazioni è stato

inoltre aggiunto un agente idrofobo allo scopo di ridurre la bagnabilità della formulazione. Le formulazioni mostrate in **Tabella XIII**, sono state ottenute previa granulazione a secco dell'omeprazolo come descritto in sezione 3.2.1. Il carbonato di sodio e gli agenti disgreganti (Acdisol e PVP-CL) sono stati aggiunti alla miscela dopo la granulazione, prima della compressione.

Tabella XIII: Formulazione dei moduli di Omeprazolo.

	OME 1 (mg)	OME 2 (mg)
Omeprazolo	20	20
Magnesio Ossido	102	102
Na₂CO₃	63,03	78,53
Compritol 888		30
Acdisol	8,13	10,13
PVP-CL	8,13	10,13
Magnesio Stearato	2,03	2,53
Totale	203,32	253,32

I moduli così ottenuti sono stati sottoposti al test di disgregazione, come descritto in sezione 3.2.11. I moduli OME 1 disgregano molto rapidamente (circa 2 minuti), quelli invece OME 2 disgregano più lentamente (circa 5 minuti e 30 secondi). Oltre ad effettuare il test di disgregazione abbiamo anche osservato in che modo cambiava la soluzione a contatto con i moduli. Il test è stato svolto in fluido gastrico simulato perciò l'omeprazolo dissolto poteva

subire una degradazione a contatto con l'ambiente acido. La degradazione è stata valutata in un primo momento soltanto in modo visivo, osservando come cambiava il colore della soluzione a contatto con i moduli. Man mano che il principio attivo si degradava la soluzione passava da trasparente, a giallo brillante che diventava sempre più scuro fino ad assumere una colorazione marroncina.

Da un punto di vista visivo, per entrambe le formulazioni la degradazione sembrava comunque piuttosto rapida.

Per condurre uno studio di dissoluzione al riparo dalla degradazione abbiamo utilizzato l'Apparatus IV descritto in sezione 3.2.12. Il flusso continuo permette di analizzare farmaci con concentrazioni molto basse che non potrebbero essere studiate con la dissoluzione in vessel. Inoltre il flusso continuo fa sì che il fluido gastrico sia a contatto con il modulo e con il principio attivo per un tempo minore, riducendo così al minimo il rischio di degradazione dell'omeprazolo.

I campioni prelevati sono analizzati in HPLC come descritto in sezione 3.2.16. il metodo analitico è stato validato per i parametri di linearità, precisione, accuratezza.

In **Figura 68** e **69** sono riportati rispettivamente i profili di rilascio dei moduli OME 1 e OME 2.

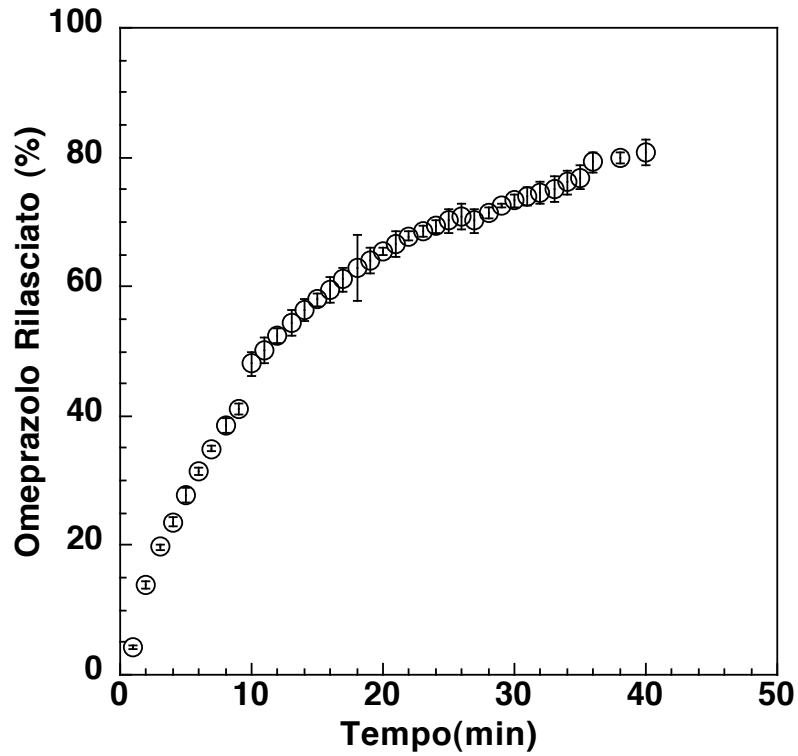


Figura 68: Profilo di rilascio dei moduli OME 1 in fluido gastrico simulato pH 1,2 ($n=3$).

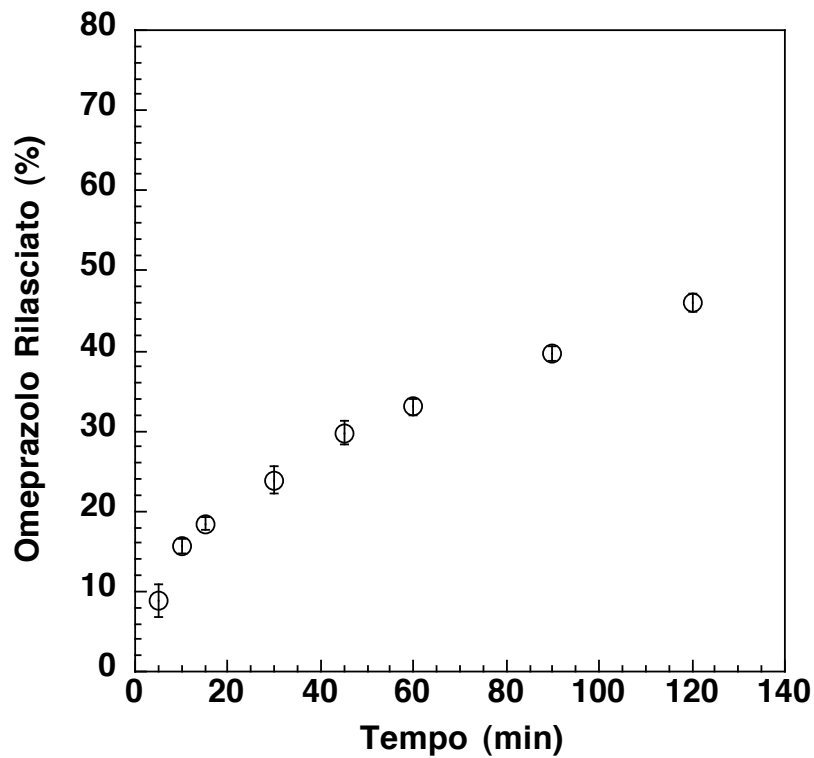


Figura 69: Profilo di rilascio dei moduli OME 2 in fluido gastrico simulato pH 1,2 ($n=3$).

Come si può osservare dai grafici, la formulazione contenente OME 1 senza Compritol 888 (Figura 68) mostra un rilascio dell'80% in meno di un'ora. La dissoluzione è stata poi interrotta poiché il modulo era quasi del tutto disgregato e le aree che si ottenevano in HPLC erano molto ridotte, praticamente non integrabili. Il principio attivo contenuto nel modulo veniva rilasciato e rimaneva stabile per circa l'80%, mentre il restante 20% era rilasciato probabilmente degradato. Nel caso della formulazione con Magnesio ossido e Carbonato di sodio (Figura 69) il rilascio raggiunge il 50% in 2 ore circa, dopodiché il modulo era completamente disgregato e le aree dei picchi HPLC non erano integrabili. Questo significa che il restante 50% è probabilmente degradato. In parte questo risultato contrasta con la precedente osservazione visiva effettuata durante il test di disgregazione. Apparentemente la formulazione OME 2 doveva essere più lenta sia nella disgregazione che nella degradazione, in quanto il Compritol 888 dovrebbe ridurre la bagnabilità e quindi la penetrazione del fluido a contatto con il principio attivo. Il test di dissoluzione ha invece rivelato il contrario in quanto, il prolungato contatto con il fluido gastrico simulato (120 minuti) probabilmente favorisce una maggiore degradazione dell'Omeprazolo che non risulta sufficientemente protetto né dal Mg Ossido né dal Compritol 888.

Per questo motivo è stato scelto come formulazione quella dell'OME 1.

5. CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti dai dati di dissoluzione in vitro dell'assemblato a tre moduli Dome Matrix® di claritromicina e la simulazione del contenuto mediante il programma di simulazione Stella® si può concludere che la formulazione C3 contenente il 10% di HPMC K15 rispetto al principio attivo permetteva di mantenere un contenuto gastrico di antibiotico superiore rispetto al valore di MIC della claritromicina preso come riferimento (2 µg/ml). D'altra parte lo studio dell'assemblato a due moduli di amoxicillina ha mostrato che la formulazione A2 era quella che consentiva di ottenere un contenuto gastrico di antibiotico superiore al valore di MIC dell'amoxicillina preso come riferimento (0,06 mg/L). I due singoli assemblati sono stati perciò uniti in un unico assemblato, incastrando i due moduli di amoxicillina sul sistema di claritromicina. L'assemblato ottenuto si è rivelato gastroflottante e i profili di rilascio in vitro risultavano sovrapponibili a quelli dei farmaci singoli; questo a dimostrazione del fatto che i due farmaci non interferivano tra di loro nella dissoluzione e che la differente geometria non influenzava in modo significativo la velocità di rilascio. Inoltre i valori di contenuto gastrico, secondo la simulazione, rimanevano entrambi superiori ai rispettivi valori di MIC.

Le prove di galleggiamento hanno rivelato che nel sistema a tre moduli di claritromicina la spinta di galleggiamento diminuiva a causa dell'erosione, ma la presenza dell'amoxicillina nel sistema assemblato a 5 favoriva il galleggiamento per la formazione di uno strato di gel sui moduli, dovuto alla presenza di una maggiore quantità di polimero all'interno della formulazione.

Gi studi in vivo dei sistemi a 5 moduli con claritromicina e amoxicillina hanno rivelato che le concentrazioni plasmatiche di entrambi gli antibiotici erano più basse di un prodotto commerciale preso di riferimento, sia a causa della loro minore dose, sia probabilmente per il fatto che il farmaco veniva liberato nello stomaco dove rimaneva più a lungo.

In conclusione, la tecnologia Dome Matrix® potrebbe essere sfruttata per la terapia dell'*Helicobacter Pylori*. La possibilità per il sistema assemblato di galleggiare nello stomaco comporta un rilascio degli antibiotici a diretto contatto con l'agente patogeno e quindi la possibilità di raggiungere concentrazioni efficaci con dosi molto più basse di quelle attuali, come dimostrato dagli studi di simulazione gastrica con il programma di simulazione Stella®. L'assemblato quindi consente di ridurre le dosi di entrambi gli antibiotici e di somministrarli in un'unica forma farmaceutica.

Inoltre è stata studiata la possibilità di aggiungere un ulteriore modulo di omeprazolo all'assemblato. La formulazione OME 1, contenente il solo Mg ossido senza Compritol 888, infatti, permette di ottenere un modulo disgregante in grado di liberare il principio attivo direttamente nello stomaco, ma allo stesso tempo di mantenerlo protetto dall'intorno acido fino al assorbimento dell'omeprazolo.

L'assemblato finale composto da sei moduli (**Figura 70**) può essere inserito in una capsula di gelatina di tipo 000. In questo modo è possibile ottenere un'unica forma farmaceutica per la somministrazione della politerapia utilizzata per l'*Helicobacter Pylori*. Questo può rappresentare un vantaggio in

quanto permette da una parte di ridurre gli effetti collaterali dovuti a un'eccessiva dose di antibiotico e dall'altra di migliorare la compliance del paziente che si ritroverebbe a dover assumere un numero inferiore di forme di dosaggio separate.

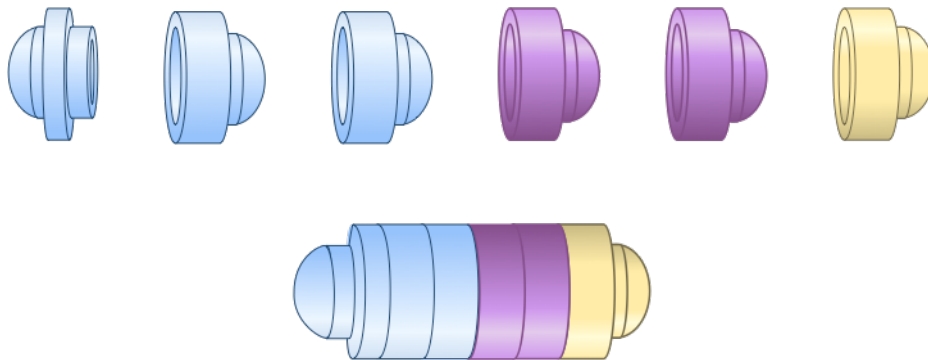


Figura 70: Schema del sistema assemblato che potrebbe essere utilizzato nella politerapia dell'*Helicobacter Pylori* composta da: claritromicina (modulo azzurro), amoxicillina (modulo rosa), omeprazolo (modulo giallo).

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Y. Yuan, I.T. Padol, R. H. Hunt, *Peptic ulcer disease today*, Nat Clin Pract, Gastroenterol Hepatol, 3 (2) Feb 2006, 80-9.
- [2] Contran, Kumar, Collins, *Le basi patologiche delle malattie*, (2) Piccin, 6^a edizione.
- [3] M. Ryan-Harshman, W. Aldoori, *How diet and lifestyle affect duodenal ulcers. Review of the evidence*, Can Fam Physician, 50, May 2004, 727-32.
- [4] C. Scarpignato, *NSAID-induced intestinal damage: are luminal bacteria the therapeutic target?*, Gut, 57 (2), Feb 2008, 145-8.
- [5] C. Scarpignato, I. Pelosini, *Prevention and treatment of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastro-duodenal damage: rationale for the use of antisecretory compounds*, Ital J GE, Suppl 1, Jun 1999, 563-72.
- [6] O. S. Malysenko, E. I. Beloborodova, A.M. Vavilov, G. V. Lomivorotova, V. I. Kasperskaia, *Impact of age and type of behaviour on the course of ulcer disease*, Ter Arkh, 77 (2), Jan 2005, 28-31.
- [7] W. K. Wu, C. H. Cho, *The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract*, J Pharmacol Sci, 94 (4), Apr 2004, 348-58.
- [8] J. G. Kusters, A. H. van Vliet, E. J. Kuipers, *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*, Clin Microbiol Rev, 19 (3), Jul 2006, 449-90.

- [9] C. Scarpignato, I. Pelosini, *Antisecretory Drugs for Eradication of Helicobacter pylori: Antibacterial Activity and Synergism with Antimicrobial Agents*, Clinical Pharmacology and Therapy of Helicobacter pylori Infection, Prog Basic Clin Pharmacol, Basel, Karger, 1999, vol. 11, 136-180.
- [10] M. Feldmann, W. L. Peterson, *Helicobacter pylori and Peptic Ulcer disease*, WJM, 159 (5), Nov 1993, 555-559.
- [11] www.enotime.it.
- [12] G. A. Thibodeau, K. T. Patton, *Anatomia e Fisiologia*, Casa Editrice Ambrosiana, IV edizione, 2005.
- [13] bloopinion.com/mucosa.
- [14] P. Castano, R. F. Donato, *Anatomia dell'uomo*, edi-ermes.
- [15] R. M. Berne, M. N. Levy, *Fisiologia*, Casa Editrice Ambrosiana, quarta edizione.
- [16] mednat.org.
- [17] R. Negrini, N. Manca, *Helicobacter Pylori*, monografia, Istituto di Microbiologia e Virologia, Ospedali Civili, Brescia. Documenta: Programma di Documentazione Scientifica, Edizioni Scientifiche, Mascia Brunelli Biolife.

- [18] amyking.wordpress.com
- [19] M. La Placa, *Principi di Microbiologia Medica*, Società Editrice Esculapio, Nona edizione.
- [20] cismedica.com.
- [21] K. Wolle, P. Malfertheiner, *Treatment of Helicobacter pylori*, Best Pract Res Clin Gastroenterol, 21 (2), Jan 2007, 315-24.
- [22] P.L. Bardonnnet, V. Faivre, W. J. Pugh, J. C. Piffaretti, F. Falson, *Gastroretentive dosage form: overview and special case of Helicobacter pylori*, J Control Release, 111 (1-2), Mar 2006, 1-18.
- [23] F. Di Mario, L.C. Cavallaro, C. Scarpignato, *Rescue Therapies for the Management of Helicobacter pylori Infection*, Recent Advances in Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics, Karger, Basel, 2006, 190-219.
- [24] Y. Habu, S. Mizuno, S. Hirano, K. Kiyota, H. Inokuchi, K. Kimoto, M. Nakajima, K. Kawai, *Triple Therapy with Omeprazole, Amoxicillin and Clarithromycin is effective against Helicobacter Pylori infection in gastric ulcer patients as well as in duodenal ulcer patients*, Digestion, 59, 1998, 321-325.
- [25] S. Ramteke, N. Ganesh, S. Bhattacharya, K. Narendra, *Amoxicillin, clarithromycin, omeprazole based targeted nanoparticles for the treatment of H. pylori*, J Drug Target, 17 (3), 2009, 225-34.

- [26] D.Y. Graham, H. Lu, Y. Yamaoka, *Therapy for Helicobacter pylori infection can be improved: sequential therapy and beyond*, *Drugs*, 68 (6), Jan 2008, 725-36.
- [27] C. Scarpignato, I. Pelosini, *Review article: the opportunities and benefits of estende acid suppression*, *Aliment Pharmacol Ther*, 23 Suppl 2, Jun 2006, 23-34.
- [28] C. Scarpignato, I. Pelosini, F. Di Mario *Acid Suppression Therapy: Where Do We Go from Here? Recent Advances in Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, Karger, Basel, 2006, 12-59.
- [29] R. A. M. Ortiz, S. A. Calafatti, L. A. Moraes, M. Deguer, C. C. Ecclissato, M. A. M. Marchioretto, M. L. Ribeiro, G. Bernasconi, J. Pedrazzoli, *Effect of Helicobacter pylori infection and acid blockade by lansoprazole on clarithromycin bioavailability*, *Braz J Med Biol Res*, 40 (3), 2007, 383-9.
- [30] P. O. Erah, A. F. Goddard, D. A. Barrett, P. N. Shaw, R. C. Spiller, *The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of Helicobacter pylori infection*, *J Antimicrob Chemother*, 39 (1), 1997, 5-12.
- [31] Scifinder
- [32] Goodman & Gilman's, *The Pharmacological basis of therapeutics*, International Edition, X edizione, 2001.

- [33] Martindale, The complete drug reference, Pharmaceutical Press, 35^a ed., 2007.
- [34] P. Colombo, P. Santi, R. Bettini, C. Brazel, N.A. Peppas, *Drug release from swelling-controlled systems*, in Wise D. (ed.), Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Thecnology, Dekker, New York, 2000, 9, 183-206.
- [35] P. Colombo, P. Santi, J. Siepmann, G. Colombo, F. Sonvico, A. Rossi, O.L. Strusi, *Swellable and Rigid Matrices: Controlled Release Matrices with Cellulose Ethers*, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Third Edition, Edited by Larry L. Augsburger, Stephen W. Hoag, 2008, vol. 2, cap. 14.
- [36] A.T. Pham, P.I. Lee, *Probing the Mechanism of Drug Release from Hydroxypropylmethyl Cellulose Matrices*, Pharmaceutical Research, 11 (10), 1994, 1379-1384.
- [37] S.S. Davis, *Formulation strategies for absorption windows*, Drug Discov Today, 10 (4), Feb 2005, 249-57.
- [38] L. Whitehead, J.T. Fell, J.H. Colet, H.L. Sharma, A. Smith, *Floating dosage forms: an in vivo study demonstrating prolonged gastric retention*, J Control Release, 55 (1), Oct 1998, 3-12.
- [39] I.S. Ahmed, J. W. Ayres, *Bioavability of riboflavin from a gastric retention formulation*, Int J Pharm, Feb 2007, 330 (1-2), 147-154.

- [40] S. Sungthongjeen, O. Paeratakul, S. Limmatvapirat, S. Puttipipatkachorn, *Preparation and in vitro evaluation of a multiple-unit floating drug delivery system based on gas formation technique*, *Int J Pharm*, 324 (2), 2006, 136-43.
- [41] S. Baumgartner, J. Kristl, F. Vrecer, P. Vodopivec, B. Zorko, *Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time*, *Int J Pharm*, 195 (1-2), 2000, 125-35.
- [42] B. N. Singh, K. H. Kim, *Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled, drug delivery via gastric retention*, *J Control Release*, 63 (3), 2000, 235-59.
- [43] L. Yang, J. Eshraghi, R. Fassihi, *A new intragastric delivery system for the treatment of Helicobacter pylori associated gastric ulcer: in vitro evaluation*, *J Control Release*, 57 (3), 1999, 215-22.
- [44] H. K. Sun, S. Y. Lee, M. A. Banevicius, X. Du, D. Maglio, D. P. Nicolau, *Efficacy of pulsatile amoxicillin and clarithromycin dosing alone and in combination in a murine pneumococcal pneumonia model*, *J Antimicrob Chemother*, 56 (3), 2005, 559-65.
- [45] M. Nakamura, R. C. Spiller, D. A. Barrett, J. I. D. Wibawa, N. Kumagai, K. Tsuchimoto, T. Tanaka, *Gastric juice, gastric tissue and blood antibiotic concentrations following omeprazole, amoxicillin and clarithromycin triple therapy*, *Helicobacter*, 8 (4), 2003, 294-9.

- [46] P.S. Raijnkant, J. Balasubramaniam, B. Mishra, *Development and evaluation of a novel floating in situ gelling system of amoxicillin for eradication of Helicobacter pylori*, Int J Pharm, 335 (1-2), Apr 2007, 114-22.
- [47] T. Sahasathian, T. Kerdcholpetch, A. Chanweroch, N. Praphairaksit, N. Suwonjandee, N. Muangsin, *Sustained release of amoxicillin from chitosan tablets*, Arch Pharm Res, 30 (4), 2007, 526-31.
- [48] T. Tokumura, Y. Machida, *Preparation of amoxicillin intragastric buoyant sustained-release tablets and the dissolution characteristics*, J Control Release, 110 (3), 2006, 581-6.
- [49] M. Tapia-Albarran, L. Villafuerte-Robles, *Assay of amoxicillin sustained release from matrix tablets containing different proportions of Carbopol 971P NF*, Int J Pharm, 273 (1-2), 2004, 121-7.
- [50] L. Whitehead, J. H. Collett, J. T. Fell, *Amoxycillin release from a floating form based on alginates*, Int J Pharm, 210 (1-2), 2000, 45-9.
- [51] A. Hoffman, H. D. Danenberg, I. Katzhendler, R. Shuval, D. Gilhar, M. Friedman, *Pharmacodynamic and pharmacokinetic rationale for the development of an oral controller-release amoxicillin dosage forms*, J Control Release, 54, 1998, 29-37.
- [52] J. Gottfries, A. Svenheden, M. Alpsten, B. Bake, A. Larsson, J. P. Idström, *Gastrointestinal transit of amoxicillin modified-release tablets, and a placebo tablet including pharmacokinetic assessments of amoxicillin*, Scan J Gastroenterol, 31 (1), 1996, 49-53.

- [53] P.S. Raijnkanth, B. Mishra, *Floating in situ gelling system for stomach site-specific delivery of clarithromycin to eradicate H. pylori*, J Control Release, 125 (1), Jan 2008, 33-41.
- [54] M. Gómez-Burgaz, B. García-Ochoa, S. Torrado-Santiago, *Chitosan-carboxymethylcellulose interpolymers complexes for gastric-specific delivery of clarithromycin*, Int J Pharm, 359 (1-2), 2008, 135-43.
- [55] M. Nama, C. S. R. Gonugunta, P.R. Veerareddy, *Formulation and evaluation of gastroretentive dosage forms of Clarithromycin*, AAPS PharmSciTech, 9 (1), 2008, 231-7.
- [56] S. S. Patel, S. Ray, R. S. Thakur, *Formulation and evaluation of floating drug delivery system containing clarithromycin for Helicobacter pylori*, Acta Pol Pharm, 63 (1), 2006, 53-61.
- [57] R. Piccolomini, G. Di Bonaventura, C. Picciani, F. Laterza, J. Vecchiet, M. Neri, *In vitro activity of clarithromycin against intracellular Helicobacter pylori*, Antimicrob Agents Chemother, 45 (5), 2001, 1568-71.
- [58] J. R. Robinson, V.H K. Li, V. H. L. Lee, *Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems*, Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications, second ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1987.
- [59] C. Sauzet, M. Claeys-Bruno, M. Nicolas, J. Kister, P. Piccerella, P. Prinderra, *An Innovative floating gastro retentive dosage system: formulation and in vitro evaluation*, Int J Pharm, 378, 2009, 23-29.

- [60] R.W. Korsmeyer, N.A. Peppas, *Macromolecular and modeling aspect of swelling-controlled system*, Rosemann T.J., Mansdorf S.Z., *Controlled Release Delivery Systems*, Dekker ed., New York and Basel, 1983.
- [61] P. Colombo, *Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route* *Adv Drug Del, Rewiew*, 11, 1993, 37-57.
- [62] P. Borgquist, A. Körner, L. Piculell, A. Larsson, A. A Axelsson, *A model for the drug release from a polymer matrix tablet – effects of swelling and dissolution*, *J Control Release*, 113 (3), 2006, 216-25.
- [63] A. Frank, S. K. Rath, S. S. Venkatraman, *Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition*, *J Control Release*, 102 (2), 2005, 333-44.
- [64] P. M. de la Torre, S. Torrado, S. Torrado, *Interpolymer complexes of poly (acrylic acid) and chitosan: influence of the ionic hydrogel-forming medium*, *Biomaterials*, 24 (8), 2003, 1459-68.
- [65] P. Colombo, R. Bettini, P.L. Catellani, P. Santi, N. A. Peppas, *Drug volume fraction profile in the gel phase and drug release kinetics in hydroxypropylmethyl cellulose matrices containing a soluble drug*, *Eur J Pharm Sci*, 9 (1), Oct 1999, 33-40.
- [66] T. Phaechamud, *Variables influencing drug release from layered matrix system comprising hydroxypropyl methylcellulose*, *AAPS PharmSciTech*, 9 (2), 2008, 668-74.

- [67] P. Colombo, R. Bettini, P. Santi, N. A. Peppas, *Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance*, *Pharm Sci Technol Today*, 3 (6), Jun 2000, 198-204.
- [68] P.I. Lee, N.A. Peppas, *Prediction of polymer dissolution in swelling controlled-release systems*, *J Control Release*, 1987, 207-215.
- [69] P. Colombo, R. Bettini, N.A. Peppas, *Observation on swelling process and diffusion from position during swelling in hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) matrices containing a soluble drug*, *J Control Release*, 61, 1999, 83-91.
- [70] P. Colombo, R. Bettini, G. Massimo, P.L. Catellani., P. Santi, N.A. Peppas, *Drug diffusion front movements is important in drug release control from swellable matrix tablets*, *J Pharm Sci*, 84, 2006, 991-997.
- [71] R. Bettini, P. L. Catellani, P. Santi, G. Massimo, N. A. Peppas, P. Colombo, *Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate*, *J Control Release*, 70 (3), Feb 2001, 383-91.
- [72] J. Siepmann, N.A. Peppas, *Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*, *Adv Drug Deliv Rev*, 48 (2-3), Jun 2001, 139-57.
- [73] E. Losi, R. Bettini, P. Santi, F. Sonvico, G. Colombo, K. Lofthus, P. Colombo, N. A. Peppas, *Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems*, *J Control Release*, 111 (1-2), Mar 2006, 212-8.

- [74] P. Colombo, R. Bettini, P. Santi, P.L. Catellani, *Sistemi modulari per il rilascio controllato di sostanza e controllo spaziale e temporale*, PCT WO 03/043601 A2.
- [75] P. Colombo, P. Santi, R. Bettini, O.L. Strusi, F. Sonvico, G. Colombo, *New modules, new assemblage kits and new assemblies for the controlled release of substances*, PCT EP 2006/011661.
- [76] SS Davis, JG Hardy, JW Fara, *Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine*, *Gut*, 27, 1986, 886-892.
- [77] G. Darwiche, E. M. Östman, H. GM Liljeborg, N. Kallinen, I. ME Björck, L.O. Almér, *Measurements of the gastric emptying rate by use of ultrasonography: studies in humans using bread with added sodium propionate*, *Am J Clin Nutr*, 74, 2001, 254-8.
- [78] J. Timmermans, A.J. Moës, *The cutoff size for gastric emptying of dosage forms*, *J Pharm Sci*, 82 (8), Aug 1993, 854.
- [79] K. Ewe, AG. Press, S. Bollen, I. Schunn, *Gastric emptying of indigestible tablets in relation to composition and time of meals studied by metal detector*, *Digestive disease and sciences*, 36 (2), 1991, 146-152.
- [80] Stella®, Systems Thinking for Education and Research, <http://www.iseesystems.com>.

- [81] C. Washington, N. Washington, C. G. Wilson, *Pharmacokinetic modelling using Stella on the Apple™ Macintosh™*, Ellis Horwood Limited, England, 1990.
- [82] M.J. Ahsman, E.D. Wildschut, D. Tibboel, R.A. Mathot, *Microanalysis of beta-lactam antibiotics and vancomycin in plasma for pharmacokinetics studies in neonates*, *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (1), Jan 2009, 75-80.
- [83] P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover, *Manual of clinical microbiology*, 6TH ed., ASM PRESS, Washington, D.C., 1995.
- [84] M.R. Jacobs, *How can we predict bacterial eradication?*, *Inter J Infect Disease*, 7 (1), 2003, 13-20.
- [85] V. De Francesco, A. Zullo, E. Ierardi, D. Vaira, *Minimal inhibitory concentration (MIC) values and different point mutations in the 23S rRNA gene for clarithromycin resistance in Helicobacter pylori*, *Dig Liver Dis*, 41 (8), 2009, 610-1.
- [86] L. Boyanova, R. Koumanova, G. Gergova, M. Popova, I. Mitov, Y. Kovacheva, S. Derejian, N. Katsarov, R. Nikolov, Z. Krastev, *Prevalence of resistant Helicobacter pylori isolates in Bulgarian children*, *J Med Microbiol*, 51, 2002, 786-790.

- [87] O. Goetze, A. Steingoetter, D. Menne, I.R. van der Voort, M.A. Kwiatek, P. Boesiger, D. Weishaupt, M. Thumshirn, M. Fried, W. Schwizer, *The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: A magnetic resonance imaging study*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292 (1), 2007, 11-7.
- [88] A.Vella, G. Bock, P.D. Giesler, D.B. Burton, D.B. Serra, M. Ligueros Saylan, C.F. Deacon, J.E. Foley, R.A. Rizza, M. Camilleri, *The effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on gastric volume, satiation and enteroendocrine secretion in type 2 diabetes: a double-blind, placebo-controlled crossover study*, *Clinical Endocrinology*, 69, 2008, 737-744.
- [89] A. B. M. Grudell, M. Camilleri, D. D. Burton, D. A. Stephens, *Effect of a proton pump inhibitor on postprandial gastric volume, emptying and symptoms in healthy, human subjects: a pilot study*, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 24 (7), 2006, 1037-43.
- [90] O.L.Strusi, F. Sonvico, R. Bettini, P. Santi, G. Colombo, P. Barata, A. Oliveira, D. Santos, P. Colombo, *Module assemblage technology for floating systems: in vitro flotation and in vivo gastro-retention*, *J Control Release*, 129 (2), 2008, 88-92.
- [91] M. J. Matteo, G. Granados, M. Olmos, A. Wonaga, M. Catalano, *Helicobacter pylori amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1° in isogenic isolates*, *J Antimicrob Chemother*, 61 (3), 2008, 474-7.
- [92] K. Watanabe, A. Tanaka, K. Imase, K. Tokunaga, H. Sugano, A. Kai, H. Ishida, T. Itoh, S. Takahashi, *Amoxicillin resistance in Helicobacter pylori: studies from Tokyo, Japan from 1985 to 2003*, *Helicobacter*, 10 (1), 2005, 4-11.

- [93] M. P. Dore, D. Y. Graham, A. R. Sepulveda, G. Realdi, M. S. Osato, *Sensitivity of Amoxicillin-Resistant Helicobacter pylori to Other Penicillins*, *Antimicrob Agents Chemother*, 43 (7), 1999, 1803-1804.
- [94] V. Berry, K. Jennings, G. Woodnutt, *Bactericidal and morphological effects of amoxicillin on Helicobacter pylori*, 39 (8), 1995, 1859-61.
- [95] M. A. Mohiuddin, K. G. Pursnani, D. A. Katzka, R. M. Gideon, J. A. Castell, D. O. Castell, *Effective gastric acid suppression after oral administration of enteric-coated omeprazole granules*, *Dig Dis Sci*, 42 (4), 1997, 715-9.
- [96] A. Farinha, A. Bica, J. M. Martins, J. P. Pais, *Dissolution of omeprazole from delayed-release solid oral dosage forms*, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26 (7), 2000, 785-90.

Ringraziamenti

Questo lavoro non sarebbe stato possibile senza l'aiuto e il supporto di molte persone.

Desidero ringraziare il mio supervisore Chiar.mo Prof Paolo Colombo per aver guidato sapientemente e con professionalità questo lavoro di dottorato, offrendomi l'opportunità di questa importante esperienza.

Ringrazio inoltre il mio relatore, Chiar.mo Prof Carmelo Scarpignato, per l'occasione che mi ha fornito e i preziosi consigli.

Un sentito ringraziamento va al Prof. Delfim Santos e al Prof. Pedro Barata per avermi aiutato a svolgere parte di questa tesi e per avermi accolto nella loro città, facendomi sentire come a casa.

Ringrazio la Dott.ssa Alessandra Rossi, il Dott. Fabio Sonvico e la Dott.ssa Francesca Buttini per la loro pronta presenza e il loro valido aiuto.

Sono grata inoltre alla Prof. Carla Caramella, alla Prof. Maria Cristina Bonferoni e alla Dott.ssa Giuseppina Sandri per il loro importante contributo negli studi di simulazione.

Desidero ringraziare inoltre Beatrice Bardini e Cristina Carrisi per aver contribuito alla realizzazione di questo lavoro di tesi.

Un ringraziamento enorme va a tutti i ragazzi del laboratorio e soprattutto i colleghi di dottorato per il sostegno, l'amicizia e il clima di serenità e armonia che hanno saputo creare intorno a me.

Infine desidero ringraziare tutta la mia famiglia, per avermi appoggiato e sostenuto in ogni scelta, e per la forza e l'immenso amore che mi ha donato in tutti questi anni.