



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
DIPARTIMENTO FARMACEUTICO

Dottorato di ricerca in BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA
CICLO XXIV (2009-2011)

LA IONOFRESI COME TECNICA NON INVASIVA PER
LA SOMMINISTRAZIONE TRANS-SCLERALE DI
COMPOSTI BIOTECNOLOGICI

Coordinatore: Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa SARA NICOLI

Dottoranda: Dott.ssa SILVIA PESCINA

INDICE

Abstract	i
Abstract (english)	ii
CAPITOLO I	1
INTRODUZIONE.....	1
1 STRUTTURA dell'OCCHIO [22, 23]	4
1.1 Congiuntiva [22, 23].....	6
1.2 Sclera [22-25]	7
1.3 Corioide, membrana di Bruch, RPE [26].....	7
1.4 Retina [22, 23]	8
2 PATOLOGIE del SEGMENTO POSTERIORE dell'OCCHIO	10
2.1 Retinopatia diabetica [28]	10
2.2 Degenerazione maculare senile [30].....	11
2.3 Glaucoma [31, 32]	12
3 FARMACOCINETICA OCULARE e MODALITÀ di SOMMINISTRAZIONE dei FARMACI.14	
3.1 Somministrazione topica [24, 31]	14
3.1.1 Inserti oculari	15
3.1.2 Mucoadesione [36, 37]	17
3.2 Somministrazione sistemica [31].....	19
3.3 Somministrazione intravitreale [6, 10, 39]	19
3.4 Somministrazione trans-sclerale [4]	20
3.4.1 Barriere statiche [41].....	21
3.4.2 Barriere dinamiche [41].....	23
3.4.3 Barriere metaboliche [41].....	24
4 STRATEGIE DI PROMOZIONE DELL'ASSORBIMENTO TRANS-SCLERALE.....	25
4.1 Approccio fisico	25
4.2 Approccio formulativo	27
5 IONOFORESIS.....	28

5.1	Meccanismi di trasporto [12]	28
5.2	Fattori che influenzano il trasporto ionoforetico [94]	31
5.3	Tollerabilità [9]	31
6	IDROGEL	33
6.1	Effetto dell'applicazione della corrente elettrica agli idrogel [96]	33
6.1.1	Sineresi indotta dalla corrente elettrica	34
6.1.2	Swelling indotto dalla corrente	35
6.1.3	Erosione indotta dalla corrente	35
CAPITOLO II		36
SCOPO DELLA TESI.....		36
CAPITOLO III.....		37
PRIMA PARTE.....		37
1	MATERIALI e METODI.....	37
1.1	MATERIALI	37
1.1.1	Soluzioni tampone	38
1.2	METODI	39
1.2.1	Bulbi oculari suini.....	39
1.2.2	Caratterizzazione dei tessuti oculari	42
1.2.3	Melanine.....	43
1.2.4	Esperimenti di permeazione	46
1.2.5	Metodiche analitiche.....	48
1.2.6	Analisi statistica	49
2	RISULTATI e DISCUSSIONE.....	50
2.1	Caratterizzazione del bulbo oculare suino	50
2.2	Coroide suino	51
2.3	Melanine.....	53
2.3.1	Estrazione della melanina oculare suina.....	53
2.3.2	Studi di legame con le melanine	55
2.4	Esperimenti di permeazione	58

2.4.1	Studi di permeazione attraverso coroide e membrana di Bruch	58
2.4.2	Studi di permeazione attraverso sclera e sclera, coroide e membrana di Bruch..	63
3	CONCLUSIONI della PRIMA PARTE	67
CAPITOLO IV		68
SECONDA PARTE		68
1	MATERIALI e METODI.....	68
1.1	MATERIALI	68
1.1.1	Oligonucleotidi	69
1.1.2	Soluzioni tampone	70
1.2	METODI	71
1.2.1	Quantificazione degli oligonucleotidi	71
1.2.2	Coniugazione di bevacizumab con fluoresceina isotiocianato (FITC).....	71
1.2.3	Verifica della stabilità dei coniugati	73
1.2.4	Tessuti.....	74
1.2.5	Esperimenti di permeazione	75
1.2.6	Metodiche analitiche	83
1.2.7	Analisi statistica	84
2	RISULTATI e DISCUSSIONE.....	85
2.1	FD-40	85
2.1.1	Meccanismi di trasporto ionoforetico.....	85
2.1.2	Permeazione di FD-40 attraverso sclera, coroide e membrana di Bruch	89
2.1.3	Permeazione di FD-40 attraverso bulbo oculare suino intero.....	92
2.2	Oligonucleotidi	95
2.2.1	Esperimenti di permeazione attraverso sclera la bovina	95
2.2.2	Confronto tra la permeabilità della sclera bovina e suina	101
2.3	Bevacizumab	103
2.3.1	Coniugazione	103
2.3.2	Stabilità dei coniugati.....	103
2.3.3	Esperimenti di permeazione attraverso sclera umana isolata	104

3	CONCLUSIONI della SECONDA PARTE.....	108
	CAPITOLO V.....	110
	TERZA PARTE.....	110
1	MATERIALI e METODI.....	110
1.1	MATERIALI.....	110
1.1.1	Soluzioni tampone.....	112
1.2	METODI.....	112
1.2.1	Preparazione degli idrogel.....	112
1.2.2	Caratterizzazione degli idrogel di agarosio.....	114
1.2.3	Esperimenti di rilascio dai dispositivi di idrogel.....	115
1.2.4	Esperimenti di permeazione attraverso sclera suina isolata.....	117
1.2.5	Metodo analitico per la quantificazione di FD-40 e BSA-FITC.....	118
1.2.6	Analisi statistica.....	119
2	RISULTATI e DISCUSSIONE.....	120
2.1	Alginato di sodio.....	120
2.2	Agarosio.....	120
2.2.1	Perdita in peso e reidratabilità dei dispositivi.....	122
2.2.2	Esperimenti di rilascio dai dispositivi.....	124
2.2.3	Esperimenti di permeazione attraverso sclera suina isolata.....	131
3	CONCLUSIONI della TERZA PARTE.....	135
	CAPITOLO VI.....	137
	CONCLUSIONI.....	137
	CAPITOLO VII.....	140
	ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI.....	140
	PRESENTAZIONE DEI RISULTATI A CONVEGNI E SCUOLE.....	140
	CAPITOLO VIII.....	142
	BIBLIOGRAFIA.....	142

Abstract

Le patologie degenerative che colpiscono il segmento posteriore dell'occhio rappresentano un'importante sfida in oftalmologia. Negli ultimi anni sono state sviluppate nuove efficaci strategie farmacologiche che coinvolgono composti biotecnologici, la cui utilità terapeutica è però limitata da problemi legati alla loro somministrazione.

Scopo di questa tesi è stato lo studio della ionoforesi trans-sclerale come approccio non invasivo per la somministrazione al segmento posteriore dell'occhio di farmaci biotecnologici. La tecnica è proposta come un'alternativa alle attuali vie di somministrazione, prima fra tutte, l'iniezione intravitreale, scarsamente tollerata e soggetta a severi, se pur rari, effetti collaterali.

La caratterizzazione dei tessuti oculari suini ha permesso di evidenziarne l'analogia con i corrispondenti umani ed ha consentito di dimostrare che il bulbo oculare suino costituisce un ottimo modello animale *in vitro* per la valutazione della somministrazione trans-sclerale di farmaci. Sono stati pertanto sviluppati modelli *in vitro* utili per la valutazione delle barriere oculari, con particolare attenzione al ruolo della melanina.

Poiché numerosi farmaci, impiegati in terapia o in fase di studio, sono macromolecole di origine biotecnologica, sono stati selezionati quali composti modello di riferimento un destrano ad alto peso molecolare, tre oligonucleotidi a singola catena ed un anticorpo monoclonale umanizzato. La valutazione dell'effetto di promozione del trasporto dei composti testati da parte della ionoforesi trans-sclerale è stata preceduta da esperimenti mirati a stabilire la capacità dei composti stessi di permeare la sclera e le altre barriere statiche in condizioni passive. Gli esperimenti sono stati realizzati utilizzando i modelli *in vitro* basati sull'impiego di tessuti oculari animali e umani, precedentemente sviluppati. La ionoforesi trans-sclerale ha dimostrato la propria capacità di promuovere l'assorbimento trans-sclerale di macromolecole e pertanto può essere considerata una strategia promettente da applicare al trattamento delle patologie del segmento posteriore.

Infine sono stati preparati e caratterizzati idrogel quali piattaforme per il drug delivery oculare di macromolecole, controllato dalla ionoforesi. Gli esperimenti di rilascio condotti, seppur preliminari, hanno messo in luce l'abilità della ionoforesi di controllare il rilascio dagli idrogel dell'albumina bovina, utilizzata come modello di macromolecola proteica, e hanno pertanto posto le basi per lo sviluppo di un innovativo e non invasivo device oculare.

Abstract (english)

The degenerative diseases affecting the posterior segment of the eye represent a major challenge in ophthalmology. In recent years, new effective pharmacological strategies involving biotech compounds have been developed, but due to eye anatomy, they can be administered only by injective routes.

The aim of this thesis was to study trans-scleral iontophoresis as a non-invasive approach for the administration of biotech drugs to the back of the eye. The technique is proposed as an alternative to current administration routes, in particular to the intravitreal injection, slightly tolerated and responsible for severe, although rare, side effects. The characterization of porcine ocular tissues demonstrated that pig eyeball is an excellent animal model of human eyeball and is suitable for in vitro evaluation of the trans-scleral delivery of active compounds. In vitro models useful for the evaluation of ocular barriers, with particular attention to the role of melanin, have been developed.

Since many drugs used in therapy or under study, are biotech macromolecules, a high molecular weight dextran, three single-stranded oligonucleotides and a humanized monoclonal antibody have been selected as model compounds. Permeation experiments were conducted both in passive and iontophoretic condition. All macromolecules tested demonstrated their ability to passively cross the sclera and the other ocular barriers; iontophoresis has proven its ability to promote the trans-scleral transport and therefore it can be considered a promising strategy to non-invasively deliver biotech compounds for the treatment of the posterior segment eye diseases.

Finally, agarose hydrogels have been prepared and characterized as ocular drug devices for delivery of macromolecules, controlled by iontophoresis. The experiments conducted, although preliminary, showed the ability of iontophoresis to control the release of bovine albumin, chosen as protein model, from hydrogel: this positive result is encouraging for the development of an innovative, non-invasive ocular delivery system hydrogel-based.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

Le patologie del segmento posteriore dell'occhio come la retinopatia diabetica (DR), la degenerazione maculare senile (AMD), il glaucoma, le retiniti e le uveiti, rappresentano la principale causa di riduzione e perdita della vista nei Paesi industrializzati [1]. L'allungamento della durata della vita media [2] ed il cambiamento delle abitudini alimentari, che hanno visto incrementare i disordini metabolici come il diabete di tipo II [3], hanno determinato l'aumento di incidenza di tali affezioni morbose. Attualmente sono a disposizione composti biotecnologici (peptidi, proteine, anticorpi, fattori di crescita), caratterizzati da differenti meccanismi d'azione, in grado di rallentare oppure di bloccare il decorso clinico di alcune di queste patologie [4]. Tuttavia, se da un lato, in alcuni casi, si dispone di farmaci efficaci e sicuri, dall'altro si riscontra un limite rappresentato dalla via di somministrazione; infatti l'applicazione topica consente l'accesso del farmaco alla sola camera anteriore dell'occhio, mentre la via sistemica sottintende, a causa della presenza della barriera emato-oculare, la necessità di utilizzare dosi eccessivamente elevate per raggiungere la concentrazione efficace a livello del segmento posteriore.

Per queste ragioni in clinica si ricorre alla somministrazione dei farmaci attivi sul segmento posteriore dell'occhio mediante iniezione intravitreale, che, nel caso di patologie croniche, ha una frequenza media mensile [5]. Tale pratica risulta particolarmente invasiva e non priva di effetti collaterali (endofalmiti, distacco della retina ed aumento della pressione intraoculare), che, se pur caratterizzati da una ridotta incidenza [6-8], risultano alquanto lesivi.

Si pone quindi l'esigenza di individuare vie di somministrazione alternative e formulazioni innovative. Ad esempio le iniezioni periorbitali e sottocongiuntivali associate all'utilizzo di micro-nano particelle e liposomi, gli impianti e la ionoforesi. In particolare la ionoforesi, che consiste nell'applicazione di corrente di debole intensità, rappresenta un metodo non invasivo, ben tollerato [9] e di facile attuazione. Inoltre consente di modulare la dose da somministrare e permette di veicolare il farmaco nella camera anteriore e nel segmento posteriore. Rispetto alle vie iniettive richiede una maggiore frequenza di somministrazione, ma è praticamente priva di effetti collaterali,

se si esclude la possibile insorgenza di algesia transitoria [9-11]. Se la tecnica ionoforetica è da tempo consolidata in ambito transdermico per promuovere l'assorbimento dei farmaci, solamente nell'ultimo decennio essa ha subito un decisivo incremento ed una ottimizzazione in ambito oculare, con lo sviluppo di alcuni dispositivi specifici per l'applicazione oftalmica [12]. In letteratura sono riportati diversi studi relativi all'impiego della ionoforesi come tecnica di promozione dell'assorbimento di farmaci per il trattamento di patologie del segmento anteriore; incomplete sono invece le conoscenze relative all'applicazione della ionoforesi per il targeting al segmento posteriore. Infatti, gli studi fino ad ora condotti sulla ionoforesi trans-sclerale sono poco numerosi e si riferiscono quasi esclusivamente alla somministrazione di farmaci di basso peso molecolare, quali antinfiammatori steroidei ed antibiotici [12]. Poiché i composti biotecnologici impiegati in clinica sono spesso molecole ad alto peso molecolare, lo studio della loro somministrazione mediante applicazione della ionoforesi trans-sclerale rappresenta un soggetto di indagine completamente nuovo e di notevole interesse.

Le macromolecole somministrate in oftalmologia comprendono peptidi, proteine e materiale genetico come oligonucleotidi, polinucleotidi, acidi nucleici (DNA ed RNA) e plasmidi. Il bevacizumab (anticorpo monoclonale umanizzato di 149 kDa), il ranibizumab (frammento anticorpale di 48 kDa), il pegaptanib (aptamero di 50 kDa) [13] e l'affibercept (proteina chimerica di 97 kDa) [14] sono attualmente impiegati nel trattamento delle affezioni oculari caratterizzate da angiogenesi. Altre proteine sono impiegate, oppure in fase di studio, come il Nerve Growth Factor (26 kDa) ed il Glial-Derived Neurotrophic Factor (17 kDa), proposti per la terapia del glaucoma [15, 16], mentre il Ciliary Neurotrophic Factor è in fase di studio clinico per il trattamento della forma secca della degenerazione maculare senile [17]. Oltre alle proteine, recentemente l'attenzione è stata rivolta agli acidi nucleici, ovvero ad oligonucleotidi antisenso, siRNA ed aptameri, tutti caratterizzati da un elevato potenziale terapeutico [18]. Sia le proteine che gli oligonucleotidi sono caratterizzati da ridotta stabilità e sono facilmente metabolizzati a livello oculare. Le proprietà farmacocinetiche delle macromolecole dipendono principalmente dal raggio molecolare, dalla forma e dalla carica superficiale: tali fattori sono a loro volta influenzati dal peso molecolare e dalla loro struttura primaria (nel caso di peptidi e proteine) e dalla loro sequenza (relativamente al materiale genetico). Poiché spesso la forma delle macromolecole è irregolare si utilizza il raggio di Stokes come approssimazione: tale approssimazione è

maggiormente attendibile per le proteine, che hanno una forma globulare, rispetto agli oligonucleotidi, che sono meglio descritti come strutture lineari. Inoltre la conformazione della catena degli oligonucleotidi, a causa della loro natura di polielettroliti, è influenzata dalla forza ionica del veicolo, così come dalla concentrazione dell'oligonucleotide stesso [19, 20]. Studi condotti *in vivo* utilizzando proteine e destrani hanno rivelato come la farmacocinetica di una macromolecola sia influenzata dalla carica [21], per effetto dell'interazione con la matrice extracellulare e/o con specifici organi.

1 **STRUTTURA dell'OCCHIO** [22, 23]

L'occhio, o bulbo oculare, è il principale organo dell'apparato della vista e si inserisce nella cavità orbitaria del cranio. In particolare il bulbo oculare è posteriormente fissato al corpo adiposo, una massa di grasso che occupa buona parte della cavità orbitaria stessa, mediante un setto fibroso detto fascia del bulbo o capsula del Tenone. Tale lamina di connettivo denso aderisce al bulbo oculare mediante sottili fibre collagene solo in due punti, in modo da non ostacolare i movimenti del bulbo stesso. Questi ultimi, sincroni e solidali per entrambi i bulbi, sono garantiti dal lavoro dei sei muscoli estrinseci, quattro retti (superiore, inferiore, mediale e laterale) e due obliqui (superiore ed inferiore). A protezione del bulbo oculare si trovano, oltre alla cavità orbitaria, il sopracciglio, le palpebre, la congiuntiva, la ghiandola lacrimale e le vie lacrimali, le quali includono il condotto naso-lacrimale, che permette il drenaggio delle lacrime.

Il bulbo oculare ha un peso di circa 7 g ed una forma sferoidale, ovvero è formato da due segmenti di sfera aventi differente raggio di curvatura. Anteriormente si trova la cornea, che costituisce un sesto del bulbo oculare con un raggio di curvatura di 8 mm; posteriormente la sclera (Figura 1a), con un raggio di curvatura di 12 mm, rappresenta i restanti cinque sestimi del bulbo. Il tratto che congiunge il centro della cornea (polo anteriore) al centro della sclera (polo posteriore) è detto asse anatomico ed ha una lunghezza di 24 mm (Figura 1b).

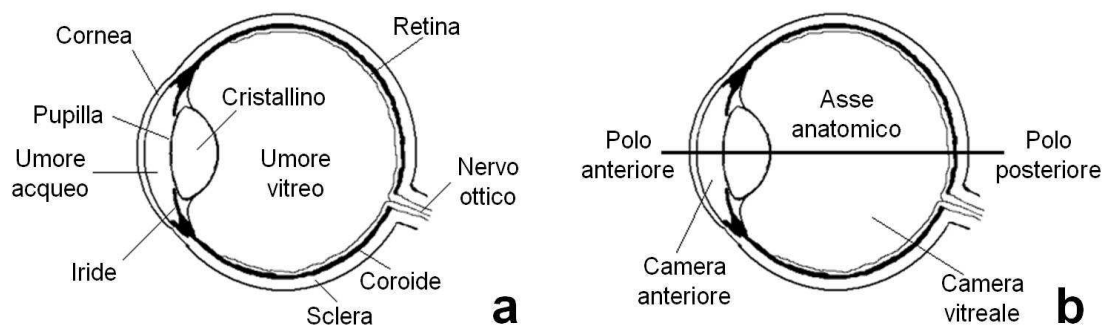


Figura 1. Struttura del bulbo oculare in sezione orizzontale

Perpendicolarmente all'asse anatomico, equidistante dai poli anteriore e posteriore, è possibile tracciare sulla superficie del bulbo una circonferenza

immaginaria detta equatore; è inoltre attuabile una ulteriore divisione in quattro quadranti, due superiori e due inferiori, attraverso due piani immaginari tra loro perpendicolari, che si incontrano lungo l'asse anatomico. In corrispondenza del polo posteriore emergono il nervo ottico (Figura 1a), che prosegue fino al diencefalo, i vasi linfatici ed i nervi ciliari; in prossimità dell'equatore fuoriescono le vene vorticosose, una per ciascuno dei quattro quadranti.

Il bulbo oculare è al proprio interno suddiviso in una camera anteriore, delimitata da cornea, iride e cristallino, una camera posteriore, di piccole dimensioni, racchiusa da iride e cristallino ed una camera vitreale, che occupa lo spazio compreso tra cristallino e retina (Figura 1b). Le camere anteriore e posteriore sono tra loro collegate mediante il foro pupillare, che permette la circolazione dell'umore acqueo (Figura 1a), un liquido che esercita una pressione compresa tra 18 e 20 mmHg. L'umore acqueo, prodotto dall'epitelio ciliare della retina, ha pH 7,3, contiene elettroliti, proteine e glucosio e svolge funzione nutritiva e diottrica.

La camera vitreale contiene l'umore vitreo, o corpo vitreo (Figura 1a), un gel trasparente con funzioni diottriche secreto dal corpo ciliare retinico, costituito per oltre il 98% da acqua, quindi da collagene e acido ialuronico.

L'occhio si compone di tre membrane omologhe alle meningi e sovrapposte tra loro, che, procedendo dall'esterno verso l'interno, sono la tonaca fibrosa, a funzione protettiva, la tonaca vascolare, a funzione trofica, e la tonaca nervosa, a funzione sensitiva.

La tonaca fibrosa è costituita anteriormente dalla cornea, separata dalla parte posteriore, la sclera, dall'orlo sclero-corneale o limbus. La cornea, priva di propri vasi sanguigni, è un mezzo diottrico ed un elemento di protezione per l'occhio. La sclera è una membrana di natura connettivale con funzione di protezione e sostegno delle membrane oculari più interne, oltre ad essere punto di inserzione per i tendini dei muscoli estrinseci dell'occhio.

La tonaca vascolare, detta uvea o coroide (Figura 1a), è una membrana connettivale riccamente vascolarizzata che assicura nutrizione alla retina. Si caratterizza per una parte anteriore, l'iride, a forma di disco forato al centro, una porzione intermedia, il corpo ciliare, ed una posteriore denominata coroide. L'iride, che mostra un colore variabile da soggetto a soggetto per effetto della melanina,

rappresenta un diaframma che separa la camera anteriore da quella posteriore. Il centro dell'iride è occupato da un foro, la pupilla, il cui diametro di apertura dipende dai muscoli intrinseci sfintere e dilatatore, sottoposti rispettivamente a controllo parasimpatico e simpatico. Posteriormente all'iride si colloca il cristallino (Figura 1a), un piccolo organo trasparente ed elastico a forma di lente biconvessa con funzioni diottriche. Il cristallino è connesso al corpo ciliare attraverso fibre (dette dell'apparato sospenditore) che possono rilassarsi e tendersi in funzione della contrazione e del rilassamento del muscolo ciliare con il conseguente aumento e diminuzione della curvatura del cristallino. Tale adattamento, detto accomodazione, permette di variare la capacità rifrattiva del cristallino. La parte intermedia dell'uvea è costituita dal corpo ciliare, a propria volta suddiviso in due zone: una posteriore, detta orbicolo ciliare, ed una anteriore denominata corona ciliare, caratterizzata da una serie di rilievi radiali definiti processi ciliari. Posteriormente il corpo ciliare prende rapporto con il coroide, che si estende per i due terzi del bulbo oculare e si fissa alla sclera attraverso un sottile strato composto da fibre collagene e definito lamina sovracorioidea. Lo strato più interno del coroide è rappresentato dalla membrana di Bruch.

Infine la tonaca nervosa o retina (Figura 1a) in cui si distinguono una porzione posteriore, la parte ottica, costituita dai fotorecettori ed una parte anteriore priva di fotorecettori e quindi denominata cieca, separate tra loro dall'ora serrata. In entrambe le parti la retina si compone di due foglietti sovrapposti: esternamente si trova l'epitelio pigmentato della retina (RPE), a contatto con l'uvea e formato da cellule epiteliali; internamente la retina propriamente detta, che nella parte ottica ha una struttura nervosa, mentre nella parte cieca consiste di un monostrato di cellule epiteliali.

1.1 Congiuntiva [22, 23]

È una membrana mucosa sottile e trasparente formata da epitelio cilindrico stratificato, con numerose cellule caliciformi mucipare, e da tessuto connettivo lasso. La congiuntiva copre la porzione anteriore dell'occhio, ad esclusione della cornea, tappezzando la faccia posteriore della palpebra (congiuntiva palpebrale) e la superficie esterna della sclera nella parte anteriore del bulbo (congiuntiva bulbare). La zona di riflessione della congiuntiva palpebrale in quella bulbare prende il nome di fornice congiuntivale, distinto in superiore ed inferiore. La congiuntiva forma un sacco appiattito (il sacco congiuntivale) delimitato lateralmente dai fornici e applicato contro la

faccia anteriore del bulbo oculare e la cui parte anteriore è aderente alla faccia posteriore delle palpebre. Nella parte laterale del fornice superiore sboccano i dotti escretori delle ghiandole lacrimali. La congiuntiva è irrorata da diramazioni delle arterie palpebrali e ciliari; le vene affluiscono nella rete venosa palpebrale e ciliare.

1.2 Sclera [22-25]

La superficie esterna della sclera è avvolta nella sua porzione più anteriore dalla congiuntiva. Quest'ultima inizia a livello dell'orlo sclero-corneale e dopo aver ricoperto parte della sclera, si riflette sulla faccia posteriore delle palpebre in corrispondenza del fornice congiuntivale. Nella porzione posteriore la superficie della sclera è a contatto con la capsula del Tenone. La sclera è povera di vasi sanguigni propri: le arterie sono diramazioni delle ciliari, mentre le vene confluiscono nelle vene vorticosi. Lo spessore della sclera non è uniforme, essendo $0,53\pm 0,14$ mm in corrispondenza del limbo, $0,39\pm 0,17$ mm all'equatore e tra 0,9 e 1,0 mm in prossimità del polo posteriore. L'area superficiale è mediamente pari a $16,3\pm 1,8$ cm². Dal punto di vista istologico la sclera è composta da tre strati, che, procedendo verso l'interno, sono l'episclera, lo stroma e la lamina fusca. L'episclera, che costituisce lo strato superficiale, si compone di connettivo lasso con alcuni fibroblasti, proteoglicani e melanociti. Lo stroma, la parte più consistente, è costituito da connettivo denso formato da fasci appiattiti di fibre collagene di tipo I che si incrociano in diverse direzioni, mantenendosi comunque paralleli alla superficie dell'organo, e da una minima quantità di sostanza fondamentale e di fibroblasti. La lamina fusca è uno strato condiviso tra sclera e coroide ed è formata da fibre collagene lasse e da alcuni melanociti.

1.3 Coroide, membrana di Bruch, RPE [26]

Il coroide è lo strato deputato al trasporto di metaboliti, ossigeno e prodotti di rifiuto da e verso la retina. Partendo dalla sclera si possono osservare: la lamina sopracoroidea, uno strato di connettivo lasso in cui si trova un numero variabile di melanociti; la lamina vascolosa, che contiene vene ed arterie di grande e medio calibro, da cui originano i capillari che costituiscono lo strato successivo, perciò definito dei corio capillari; lo stroma, ed infine la membrana di Bruch. Lo stroma corioideo è un connettivo lasso pigmentato che colma gli spazi interstiziali tra i vasi ematici e linfatici corioidei e le fibre nervose. Si compone di fibroblasti, melanociti, fibrociti macrofagi,

linfociti immersi nel collagene e nelle fibre elastiche. L'endotelio dei coriocabillari è diverso a seconda che si consideri il lato rivolto verso la sclera, oppure verso l'epitelio pigmentato della retina. Infatti, se nel primo caso l'endotelio è spesso e privo di fenestrature, nel secondo caso esso si presenta sottile e fenestrato: ciò permette gli scambi con la retina e ne assicura la vitalità.

La membrana di Bruch è una membrana elastica, detta anche membrana vetrosa, posizionata tra RPE ed i coriocabillari coroidei e rappresenta la porzione più profonda del corioide. Ha uno spessore di circa 3 μm ed è composta, procedendo dall'esterno verso l'interno, dalla lamina basale dei capillari, seguito da uno strato esterno di collagene, quindi da un network di fibre elastiche, da uno strato interno di collagene ed infine dalla lamina basale dell'epitelio pigmentato. Il collagene e le fibre elastiche passano tra gli spazi intercapillari dello stroma corioide e si fissano alla membrana di Bruch.

L'epitelio pigmentato è lo strato più esterno della retina, costituito da un monostrato di cellule cuboidali pigmentate, che, viste dall'alto, mostrano un aspetto esagonale e che sono unite tra loro mediante tight junctions. Sono larghe 14 μm ed alte 10-14 μm ; contengono un nucleo circolare e nel citoplasma sono visibili granuli di melanina. Il polo apicale, rivolto verso la retina, è dotato di corti microvilli e di lunghi processi, spesso ramificati, che possono contenere granuli di melanina e che corrono paralleli ai fotorecettori nel cosiddetto spazio sub-retinico.

1.4 Retina [22, 23]

All'esame oftalmoscopico la retina mostra un colore rosso-brunastro per il trasparire del suo strato pigmentato (RPE) e dei vasi coroidei. Sulla retina è possibile distinguere la papilla del nervo ottico, zona in cui tutte le fibre nervose retiniche convergono per dare inizio al suddetto nervo, e, lateralmente, una piccola regione di forma ellittica, la macula lutea, con un diametro di circa 2 mm, di colore rosso-bruno. La *macula lutea* presenta al centro una piccola depressione detta fovea centralis, costituita esclusivamente dai coni, i fotorecettori che permettono la percezione dei colori e la visione diurna. Procedendo verso la periferia il numero dei coni diminuisce progressivamente ed aumenta quello dei bastoncelli, fotorecettori specializzati nella visione notturna. La parte ottica della retina, costituita dall'RPE e dalla retina propriamente detta, diversamente dalla parte cieca che dipende dai vasi del corpo ciliare e dell'iride, presenta una propria vascolarizzazione. Tuttavia i vasi retinici si

trovano solamente negli strati più interni della tonaca nervosa e quindi lo strato dei fotorecettori dipende, per la nutrizione, dal liquido interstiziale che filtra dal coroide. Poiché la fovea centralis è costituita da coni per l'intero suo spessore è evidentemente sprovvista di vasi propri. Il principale tra i vasi arteriosi retinici è l'arteria centrale della retina, che emerge dalla papilla ottica e si biforca in un ramo superiore ed in uno inferiore, ciascuno dei quali è a propria volta ulteriormente biforcato. Le vene retiniche si organizzano analogamente alle arterie, mostrando quattro tronchi, che si riducono a due prima di confluire nella vena centrale della retina.

2 PATOLOGIE del SEGMENTO POSTERIORE dell'OCCHIO

L'occhio può essere sede primaria o secondaria di affezioni patologiche, che vengono in genere classificate in funzione della parte anatomica coinvolta. Si descrivono pertanto affezioni a carico delle palpebre, dell'apparato lacrimale, della congiuntiva, della cornea, della sclera, dell'iride, del corpo ciliare, del cristallino, del corioide, della retina, dell'umore vitreo e del nervo ottico, dei muscoli oculari [27].

Un criterio più generale di classificazione distingue le malattie oculari in patologie del segmento anteriore (ovvero a carico di cornea, camera anteriore e posteriore, iride, cristallino e corpi ciliari) e del segmento posteriore (relative a umore vitreo, sclera, corioidea e retina). Tra le patologie del segmento posteriore di particolare interesse clinico si annoverano la *retinopatia diabetica*, la *degenerazione maculare senile* ed il *glaucoma*.

2.1 Retinopatia diabetica [28]

Con il termine retinopatia si indica, in generale, un'affezione retinica di natura non infiammatoria. La retinopatia diabetica, in particolare, rappresenta una forma di retinopatia che insorge frequentemente in conseguenza dello stato diabetico e che rientra, analogamente alla nefropatia ed alla neuropatia, tra le microangiopatie diabetiche. La classificazione internazionale della retinopatia diabetica prevede la suddivisione della stessa in tre stadi, differenti per grado di severità delle lesioni. Si tratta, nello specifico, di uno stadio pre-clinico; uno stadio non proliferativo, a propria volta distinto in lieve, moderato e severo o pre-proliferativo, ed infine uno stadio proliferativo, che può essere a basso rischio, a medio rischio o avanzato. Se nello stadio pre-clinico non si rilevano lesioni a carico della retina, a partire dallo stadio non proliferativo di grado lieve i vasi presentano zone di indebolimento con dilatazione della parete (microaneurismi) e possono sanguinare (microemorragie). Tale condizione progredisce con la conseguente formazione di edemi ed ischemie, che rappresentano i segni caratterizzanti lo stadio non proliferativo di grado moderato. La condizione pre-proliferativa (o non proliferativa di grado severo) mostra anomalie vascolari a carico della microcircolazione retinica, associate ad emorragie multiple. Nella successiva fase proliferativa si osserva come la presenza di ischemie venga compensata da un processo angiogenetico. I neovasi che si sviluppano sia a partire dalla papilla del nervo

ottico, sia dalla regione periferica della retina, sono anomali perché estremamente fragili: ciò determina frequenti sanguinamenti ed è quindi causa di emorragie intravitreali. Tali emorragie sono progressivamente riassorbite, ma inducono la formazione di tessuto cicatriziale con possibile trazione e distacco della retina. La retinopatia diabetica proliferativa è causa di cecità nel 4,8% di tutti i casi di cecità a livello mondiale [29]. Il trattamento più efficace attualmente disponibile è la fotocoagulazione laser; il successo di tale trattamento è tuttavia inversamente proporzionale alla precocità di intervento, e non è privo di effetti collaterali. Ultimamente si ricorre alla somministrazione per iniezione intravitreale di corticosteroidi come triamcinolone acetonide, di fattori anti-angiogenetici ovvero di anticorpi monoclonali umanizzati anti-VEGF quali ranibizumab e bevacizumab e di un aptamero peghilato anti-VEGF come pegaptanib sodico.

2.2 Degenerazione maculare senile [30]

La degenerazione maculare senile è una malattia degenerativa la cui incidenza aumenta con l'età e costituisce la principale causa di riduzione e perdita della vista nei soggetti ultrasessantenni nei Paesi Occidentali, mentre a livello mondiale è responsabile dell'8,7% di tutti i casi di cecità [29]. Se ne distinguono due forme: la prima detta atrofica o secca, la seconda definita essudativa o umida. La forma atrofica è a propria volta distinta in precoce, intermedia e avanzata, in funzione del numero e delle dimensioni delle drusen, depositi sottoretinici di natura prevalentemente lipidica e di colore giallo, responsabili della progressiva atrofia retinica. La forma essudativa si caratterizza per una rapida perdita della vista. Ciò in relazione al manifestarsi di emorragie sub-retiniche, come conseguenza della proliferazione di vasi anomali nello spazio sub-retinico, e quindi della formazione di tessuto cicatriziale che determina distacco trazionale della retina stessa. La patogenesi di questa malattia degenerativa non è completamente chiara ed il suo sviluppo potrebbe dipendere da cause multifattoriali, con fattori di rischio predisponenti di natura genetica e ambientale.

Allo stato attuale non esiste alcun trattamento per la forma secca, anche se il Ciliary Neurotrophic Factor è in fase di studio clinico quale possibile agente terapeutico [17]. La forma essudativa può essere invece efficacemente controllata attraverso la fotocoagulazione laser oppure, essendo determinante il ruolo del VEGF come induttore del processo angiogenetico, per somministrazione intravitreale di farmaci biotecnologici

ad attività anti-angiogenetica. Nello specifico si tratta di farmaci anti-VEGF quale l'anticorpo monoclonale umanizzato ranibizumab, l'aptamero peghilato pegaptanib e la proteina chimera aflibercept, approvata dall'FDA nel novembre 2011 [14]. L'anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF bevacizumab è invece oggetto di utilizzo off-label.

2.3 Glaucoma [31, 32]

Il glaucoma è una malattia dell'occhio che si caratterizza per l'alterazione progressiva della papilla ottica e del campo visivo in presenza o meno di ipertono oculare, ovvero di una pressione intraoculare superiore a 21 mmHg. A livello mondiale il glaucoma è la seconda causa di cecità, preceduto solo dalla cataratta, essendo responsabile del 12,3% dei casi di perdita completa della vista [29]. In base alla classificazione internazionale il glaucoma si distingue in primario e secondario. Nel glaucoma primario l'evento iniziale ha luogo a livello dell'angolo irido-corneale (glaucoma ad angolo chiuso e glaucoma congenito) oppure del complesso trabecolato-canale di Schlemm (glaucoma ad angolo aperto). Il glaucoma ad angolo chiuso è associato ad una camera anteriore di ridotte dimensioni, dalla quale può essere ostacolato il drenaggio di umore acqueo per effetto della dilatazione dell'iride. Queste forme hanno spesso un'impronta genetica e sono bilaterali. Il glaucoma secondario è invece conseguenza di preesistenti malattie oculari o sistemiche, quali l'ipertensione arteriosa, che determinano indirettamente l'aumento della pressione intraoculare. Si tratta di manifestazioni sia mono, sia bilaterali, alcune geneticamente determinate, altre acquisite. Indipendentemente dalla tipologia del glaucoma, l'avanzamento della malattia determina la progressiva atrofia delle fibre nervose a livello della papilla ottica. Tale effetto può essere ricondotto a due possibili meccanismi, uno di natura meccanica, l'altro di natura vascolare. Nel primo caso la compressione esercitata dall'aumentata pressione intraoculare è lesiva nei confronti dei fotorecettori; nel secondo caso si osserva una insufficiente perfusione del tessuto, con conseguente necrosi dei componenti nervosi retinici. Quest'ultimo meccanismo giustifica l'insorgenza del cosiddetto glaucoma a bassa tensione, una forma primaria di glaucoma, in cui non si rileva ipertono endo-oculare, e che è probabilmente determinata dall'aumento della sensibilità delle fibre nervose allo stato ipossico.

Il glaucoma è sottoposto a controllo farmacologico mediante somministrazione topica e sistemica di sostanze che riducono la produzione di umore acqueo da parte

dei corpi ciliari o che ne favoriscono il deflusso dalla camera anteriore al canale di Schlemm, un vaso venoso che si immette nella circolazione dell'episclera. È inoltre possibile ricorrere alla via chirurgica mediante iridectomia, nella forma ad angolo chiuso, mentre nella variante ad angolo aperto si effettuano i cosiddetti interventi di chirurgia filtrante, come la trabeculectomia, che, attraverso l'apertura di una fistola sclerale, mette in comunicazione la camera anteriore con gli spazi sottocongiuntivali, favorendo l'efflusso dell'umore acqueo.

3 FARMACOCINETICA OCULARE e MODALITÀ di SOMMINISTRAZIONE dei FARMACI

Attraverso la somministrazione oculare di farmaci è possibile attuare una terapia efficace nei confronti di numerose affezioni morbose a carico dell'occhio. Rispetto alle altre vie di somministrazione essa si caratterizza per la presenza di diverse barriere sia di natura anatomica, sia di carattere fisiologico, proprie del bulbo oculare, e di conseguenza peculiari. Pertanto esistono diverse vie di somministrazione dei farmaci oftalmici, ciascuna delle quali può spesso avvalersi di più forme farmaceutiche, comprese quelle innovative.

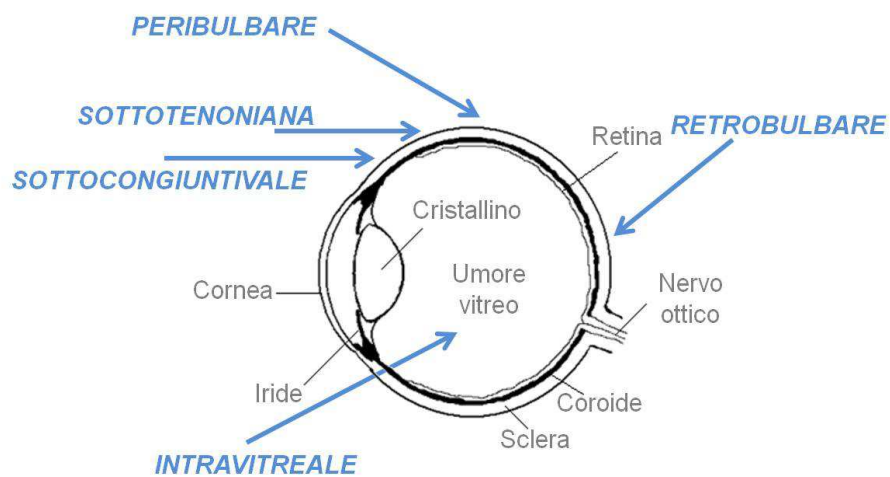


Figura 2. Vie di somministrazione oculare dei farmaci

3.1 Somministrazione topica [24, 31]

La somministrazione oculare di farmaci per via topica (Figura 2), basata sull'impiego di colliri e preparazioni semisolide (unguenti e gel), rappresenta la modalità d'elezione per il trattamento delle patologie del segmento anteriore. Tale via di somministrazione presenta una biodisponibilità della dose applicata inferiore al 5%: ciò dipende dalla presenza di barriere, quali l'epitelio corneale e congiuntivale e dalla perdita precorneale dovuta al drenaggio e al turn-over lacrimale, incrementati in conseguenza dell'applicazione del farmaco. Una consistente frazione di dose instillata (20-80%) è oggetto di assorbimento sistemico da parte della congiuntiva, riccamente vascolarizzata, e della mucosa nasale e naso-faringea, raggiunte attraverso il condotto naso-lacrimale. Infine la biodisponibilità dei farmaci somministrati topicamente risulta influenzata anche dal metabolismo e dall'eliminazione: infatti, a livello dell'epitelio

congiuntivale e corneale, sono espressi numerosi enzimi metabolici che possono contribuire in modo significativo alla riduzione della quota di farmaco disponibile.

L'epitelio corneale si compone di cellule squamose unite tra loro da tight junctions e rappresenta quindi una barriera nei confronti delle sostanze non lipofile, alle quali è preclusa la via trans-cellulare. Tuttavia, poiché è possibile rilevare la presenza di farmaci scarsamente lipofili nella camera anteriore, è ragionevole ipotizzare l'intervento del trasporto attivo e della diffusione facilitata. Le sostanze che diffondono attraverso la cornea (via trans-corneale) raggiungono la camera anteriore concentrandosi nell'umore acqueo. Poiché quest'ultimo effluisce fisiologicamente dalla camera posteriore a quella anteriore, i farmaci possono raggiungere la camera posteriore solamente attraverso l'iride, che dal punto di vista cinetico, costituisce un unico compartimento con l'umore acqueo. I principi attivi possono diffondere dall'iride ai corpi ciliari, dai quali è possibile raggiungere la circolazione sistemica.

L'epitelio congiuntivale mostra una permeabilità superiore rispetto al corneale, ma la significativa vascolarizzazione è causa di un consistente assorbimento sistemico. La diffusione dei farmaci attraverso la congiuntiva e la sclera (via sclero-congiuntivale o extra-corneale), consente agli stessi di raggiungere l'iride, ma anche l'uvea e la retina.

3.1.1 *Inserti oculari*

Una possibile alternativa alle forme farmaceutiche tradizionali è rappresentata dagli inserti congiuntivali. Si tratta di dispositivi sterili, di consistenza solida o semisolida, sottili e talvolta multistrato, caricati o meno con farmaci e caratterizzati da forme e dimensioni tali da poter essere posizionati nel sacco congiuntivale superiore o inferiore. Sono costituiti da supporti polimerici all'interno dei quali il farmaco può essere disperso o disciolto [33]. Rispetto alle preparazioni oftalmiche tradizionali, gli inserti oculari offrono diversi vantaggi, come l'aumento del tempo di contatto con la congiuntiva, il dosaggio accurato (diversamente dai colliri che possono essere instillati in modo improprio dai pazienti), la riduzione dell'assorbimento sistemico attraverso il dotto naso-lacrimale, la possibilità di realizzare un rilascio controllato nel tempo, con conseguente l'aumento della compliance da parte dei pazienti grazie alla diminuzione della frequenza di somministrazione, la maggiore stabilità. Inoltre, gli inserti oftalmici sono versatili e consentono l'impiego di mucoadesivi, promotori di assorbimento, tamponi. Tuttavia possono presentare alcuni svantaggi, tra i quali la percezione di

fastidio, determinato dalla sensazione di corpo estraneo, da parte dei soggetti maggiormente sensibili, interferenza con la vista, difficoltà di applicazione (e rimozione per i dispositivi non biodegradabili), improvvisa fuoriuscita dal sacco congiuntivale, specie durante il sonno [34].

La principale classificazione degli inserti oftalmici, basata sulla loro caratteristiche fisiche, li distingue in *insolubili*, *solubili* e *bioerodibili* [35].

Inserti insolubili

Gli inserti insolubili comprendono sistemi a reservoir e sistemi a matrice. Nei sistemi a reservoir il farmaco (come liquido, gel, colloide, matrice solida) è a contatto con una membrana che ne controlla la velocità di rilascio, il quale può avvenire per diffusione oppure per osmosi. Un inserto a diffusione consiste di un reservoir centrale racchiuso da una membrana microporosa, che consente la diffusione del farmaco, come conseguenza dell'ingresso del fluido lacrimale. Il prodotto di riferimento è Ocusert[®], dispositivo sviluppato con l'intento di mantenere costanti le concentrazioni terapeutiche di pilocarpina nei soggetti affetti da glaucoma; nello specifico la velocità di rilascio è controllata da una membrana costituita da etilvinilacetato [35].

I sistemi a matrice sono principalmente rappresentati dalle lenti a contatto medicate. Questi dispositivi sono costituiti da polimeri che come PHEMA (poli-(2-idrossietilmetacrilato)) o HEMA, co-polimerizzati con acido metacrilico o vinilpirrolidone, formano una struttura tridimensionale capace di trattenere acqua, soluzioni acquose di farmaco o componenti solidi. Il caricamento dell'attivo avviene per adsorbimento dello stesso mediante immersione del dispositivo all'interno di una soluzione ed è condizionato dalla natura idrofila o idrofobica del polimero [35]. Il rilascio del farmaco non è controllato, ma è molto rapido all'inizio e di seguito diminuisce esponenzialmente con il tempo [33].

Inserti solubili

Contrariamente agli inserti insolubili, i sistemi solubili non necessitano di rimozione in seguito ad utilizzo. Essi possono essere costituiti da polimeri naturali (come il collagene) oppure da polimeri sintetici o semi-sintetici (derivati della cellulosa, polivinilalcol). Il farmaco viene in genere adsorbito per immersione del dispositivo in una soluzione che lo contiene; a ciò fa seguito l'essiccamento, che ne consente la conservazione per tempi significativi, e la successiva re-idratazione al momento

dell'uso. La quantità di farmaco caricata dipende dalla capacità dello stesso di disporsi tra le catene polimeriche, nonché dalla concentrazione della soluzione e dalla durata del contatto tra l'inserito e la soluzione stessa. Successivamente all'applicazione del dispositivo sul bulbo oculare il fluido lacrimale determina la progressiva dissoluzione del polimero, così come la diffusione del farmaco dagli spazi interstiziali dai quali è trattenuto. Gli inserti insolubili presentano tuttavia alcuni svantaggi, come la rapida penetrazione del fluido lacrimale all'interno del dispositivo, l'offuscamento della vista dovuto alla deformazione del dispositivo conseguente alla dissoluzione del polimero, il rischio di espulsione dall'occhio. Per ridurre la deformazione del dispositivo si ricorre all'impiego di etil-cellulosa, mentre per limitare il rischio di fuoriuscita dal sacco congiuntivale si utilizzano mucoadesivi quali il carbomer (acido poliacrilico) [35].

Inserti erodibili

Infine gli inserti oculari composti da polimeri erodibili quali i derivati della gelatina e i poliesteri, che vanno incontro a dissoluzione per idrolisi dei legami chimici. Il loro vantaggio è rappresentato dalla possibilità di modulare la velocità di erosione modificando la loro struttura durante la sintesi e aggiungendo tensioattivi anionici o cationici.[35]

3.1.2 Mucoadesione [36, 37]

La parte esposta dell'occhio è rivestita dal film precorneale, un sottile strato fluido avente spessore compreso tra 3 e 10 μm e volume di circa 10 μl . Secondo la teoria dei tre strati, il film lacrimale consiste, procedendo dall'esterno verso l'interno, di uno strato superficiale lipidico, seguito da uno strato centrale acquoso ed infine da uno strato mucoso. Lo strato superficiale lipidico ha uno spessore di 100 nm ed è secreto da ghiandole espresse nelle palpebre; si compone di fosfolipidi, triacilgliceroli, acidi grassi liberi e riduce la velocità di evaporazione dello strato acquoso sottostante, mantenendone inalterata l'osmolarità. Lo strato acquoso, prodotto dalle ghiandole lacrimali, contiene sali inorganici, glucosio, urea, acido ascorbico, proteine, immunoglobuline, albumina, lisozima e glicoproteine. La sua osmolarità è di 310-350 mOsm/kg ed è determinata da ioni inorganici come Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- e da proteine. Il bicarbonato è responsabile anche delle capacità tamponanti che servono a mantenere il pH a 7,4 in condizioni fisiologiche. Lo spessore dello strato di fluido lacrimale è di

circa 3-10 μm . Lo strato più interno è un gel che protegge l'epitelio e facilita il movimento delle palpebre. Il principale costituente è la mucina, una proteina altamente glicosilata, secreta dalle cellule di goblet della congiuntiva. La mucina stabilizza lo strato di muco e ne permette la coesione. Il muco trattiene batteri, corpi estranei, detriti cellulari e può rappresentare una barriera alla diffusione delle macromolecole; inoltre la presenza della mucina, che a pH fisiologico presenta cariche negative grazie ai residui di acido sialico, rende ragione della possibile interazione con composti carichi positivamente ma è soprattutto principale responsabile della mucoadesione.

La mucoadesione è un fenomeno di interazione all'interfaccia tra lo strato di muco che ricopre una superficie biologica ed un polimero, naturale o sintetico; tale interazione permette al polimero di aderire alla superficie biologica per tempi relativamente lunghi. Numerosi i polimeri noti per le loro proprietà mucoadesive proposti per l'applicazione oculare [38]: tra questi polimeri anionici (come l'acido poliacrilico, il carbomer, la carbossimetilcellulosa sodica, l'alginato di sodio, la pectina), polimeri cationici (il chitosano) e non ionici (polivinilalcol, polivinilpirrolidone), metilcellulosa, polossameri. Sufficienti proprietà mucoadesive dipendono dalla capacità del polimero di formare legami idrogeno con lo strato mucoso, con la mucina in modo particolare, e di penetrare in profondità nello strato mucoso stesso. Un polimero mucoadesivo ideale dovrebbe rapidamente interagire con lo strato di muco senza cambiare le proprie caratteristiche fisiche; consentire il rilascio dell'attivo; essere biodegradabile; evitare l'inattivazione degli enzimi presenti in prossimità del sito di rilascio e favorire la penetrazione dell'attivo.

Differenti teorie sono state proposte per descrivere il fenomeno della mucoadesione, ovvero: 1) teoria elettronica (propone il trasferimento di elettroni tra le superficie del polimero e la superficie dello strato mucoso, con la conseguente formazione di un doppio strato elettrico e l'instaurarsi di forze di attrazione); 2) teoria della bagnabilità (tanto più basso è l'angolo di contatto tra il polimero e lo strato di muco, tanto più elevata sarà l'affinità tra i due); 3) teoria di adsorbimento (basata sulla presenza di forze intermolecolari quali legami idrogeno e interazioni di Van der Waals); 4) teoria della diffusione (afferma che le catene del polimero diffondono nel network dello strato mucoso e con esso interagiscono); 5) teoria meccanica (descrive la diffusione del muco negli spazi liberi della struttura tridimensionale del polimero); 6) teoria coesiva (la mucoadesione è principalmente dipendente dalle interazioni intermolecolari tra molecole simili). Complessivamente è possibile affermare che la

mucoadesione è il risultato del contemporaneo instaurarsi di interazioni fisiche e chimiche.

Il processo di mucoadesione può essere suddiviso in due fasi: nella prima fase si determina un contatto tra il polimero e lo strato di muco favorito dalla somiglianza strutturale e dalla bagnabilità; nella fase successiva le catene polimeriche penetrano nello strato di muco e stabiliscono delle interazioni.

3.2 Somministrazione sistemica [31]

La somministrazione per via sistemica è condizionata dalla presenza della barriera emato-oculare, distinta in barriera emato-retinica (o emato-vitrea) ed emato-acquosa. La barriera emato-retinica, formata dall'endotelio dei capillari retinici e dall'epitelio pigmentato della retina, previene la diffusione di macromolecole e di piccole molecole idrofile. La barriera emato-acquosa si compone dell'epitelio del corpo ciliare, a protezione della camera posteriore, e dell'endotelio dei vasi iridei, che impedisce la diffusione di macromolecole nello stroma irideo e nella camera posteriore. Farmaci mediamente e altamente lipofili attraversano facilmente entrambe le barriere, che manifestano la loro diversa selettività nei confronti di sostanze altamente polari, in grado di concentrarsi nell'umore acquoso, ma non nell'umore vitreo. In ogni caso per raggiungere le concentrazioni terapeutiche sarebbe necessario somministrare dosi eccessivamente elevate, con possibili effetti tossici sull'intero organismo.

3.3 Somministrazione intravitrea [6, 10, 39]

La somministrazione intravitrea consiste generalmente in una iniezione che viene praticata in corrispondenza del limbus e che permette di depositare il farmaco direttamente nell'umore vitreo (Figura 2), con conseguente aumento dell'efficacia nel trattamento delle malattie del segmento posteriore. Tuttavia, poiché si tratta di una tecnica particolarmente invasiva, essa è scarsamente tollerata dai pazienti e caratterizzata da possibili effetti collaterali, che sono rari, ma particolarmente severi; inoltre, per alcune patologie, necessita di frequenti somministrazioni. Pertanto, in alternativa alle iniezioni, è possibile ricorrere all'utilizzo di impianti intravitreali, medicazioni solide inserite nella camera vitrea mediante procedura chirurgica, in grado di cedere lentamente il principio attivo in esse contenuto e quindi di ridurre la frequenza

di somministrazione. Tali dispositivi possono essere biodegradabili (Posurdex[®], desametasone) oppure non biodegradabili (Vitrasert[®], ganciclovir; Retisert[®], fluocinolone acetone): in questo caso è necessaria la rimozione chirurgica al termine del trattamento [40]. Sia le iniezioni, sia gli impianti intravitreali sono spesso soggetti a complicazioni quali endoftalmiti, distacco della retina, aumento della pressione intraoculare, emorragie vitreali [40].

In particolare le endoftalmiti sono delle flogosi che possono interessare i tessuti endobulbari in conseguenza di manovre invasive, quali le iniezioni intravitreali o l'inserimento di impianti intraoculari. Nel 25% dei casi tali complicanze sono di natura non infettiva e si attribuiscono ad impurità, disinfettanti, corpi estranei sterili. Nel restante 75% degli eventi l'eziogenesi è batterica, attribuibile, nella maggior parte dei casi, a saprofiti Gram positivi (*St. aureus* e *St. epidermidis*) residenti nella palpebra e nella congiuntiva; raramente si può verificare una contaminazione da parte di specie Gram negative del genere *Pseudomonas* e *Neisseria*, così come anche di miceti. Le endoftalmiti possono essere causa di compromissione funzionale dell'occhio e, talvolta, di perdita anatomica dello stesso [39].

Il distacco della retina consiste invece nella separazione della retina propriamente detta dall'epitelio pigmentato. Tale situazione, alla quale è possibile porre rimedio solamente attraverso un tempestivo intervento chirurgico, può avere cause differenti: tra queste la presenza di tessuto cicatriziale retinico, che provocando la contrazione della retina propriamente detta, ne determina il distacco dall'epitelio.

3.4 Somministrazione trans-sclerale [4]

I paragrafi precedenti evidenziano come la somministrazione topica mediante colliri, pomate oftalmiche, inserti congiuntivali risulti efficace essenzialmente per le affezioni a carico del segmento anteriore; la via sistemica richiede l'utilizzo di dosi di farmaco eccessivamente alte con conseguente incremento della tossicità per l'organismo nel suo complesso; la somministrazione intravitreale, per quanto efficace, risulti oltremodo invasiva. Per questo motivo nel trattamento delle patologie del segmento posteriore dell'occhio si impiegano, o sono in fase di sperimentazione, approcci minimamente invasivi o non invasivi, incentrati sulla via di somministrazione trans-sclerale, ovvero sull'applicazione delle formulazioni farmaceutiche alla sclera, la membrana fibrosa che costituisce la tonaca esterna del bulbo oculare. La

somministrazione trans-sclerale viene effettuata principalmente mediante iniezioni sottocongiuntivali e periorbitali (peribulbare, retrobulbare, sottotenoniana) (Figura 2), le quali, depositando il farmaco in prossimità del proprio sito d'azione, ne comportano un significativo assorbimento. L'assorbimento trans-sclerale di sostanze attive, utili per il trattamento delle malattie del segmento posteriore, è fortemente condizionato dalla presenza di tre tipologie di barriere, classificate come *statiche*, *dinamiche* e *metaboliche* [41].

3.4.1 Barriere statiche [41]

Le barriere statiche sono rappresentate (procedendo dall'esterno verso l'interno) da sclera, coroide e membrana di Bruch, epitelio pigmentato della retina (RPE), ovvero da tutte le membrane in grado di opporsi alla diffusione dei farmaci (Figura 3).

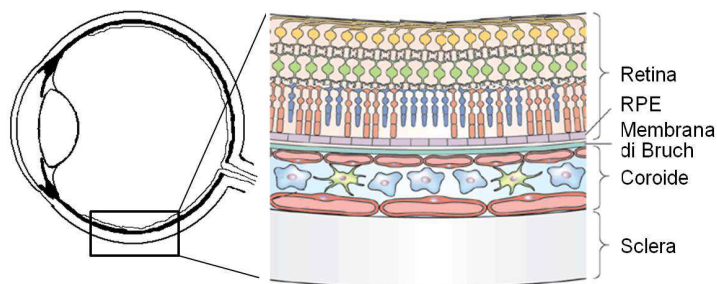


Figura 3. Barriere statiche nella somministrazione trans-sclerale (modificato da [42])

La sclera è una membrana di natura connettivale, costituita principalmente da collagene, con funzione di protezione e sostegno delle varie componenti oculari, oltre ad essere punto di inserzione per i tendini dei muscoli estrinseci dell'occhio. La presenza dei glicosamminoglicani conferisce alla sclera carica negativa a pH fisiologico grazie ai numerosi gruppi fosfato. Diversi sono i fattori in grado di influenzare la permeabilità delle molecole attraverso la sclera, primo fra tutti il peso molecolare: composti ad elevato peso molecolare diffondono con maggiori difficoltà rispetto a molecole di massa inferiore. Tuttavia, il parametro che risulta maggiormente predittivo in termini di permeazione trans-sclerale è rappresentato dal raggio molecolare: proteine di forma globulare possiedono una permeabilità superiore a quella di polimeri lineari di pari peso molecolare.

Al di sotto della sclera si trova il coroide, una membrana connettivale riccamente vascolarizzata che, analogamente alla sclera, si compone di fibre collagene, ma a

differenza della precedente, presenta depositi di melanina, pigmento che può rappresentare un ostacolo alla diffusione dei farmaci a causa della sua tendenza a formare legami con gli stessi [43, 44]. La porzione più profonda del coroide è rappresentata dalla membrana di Bruch, composta da cinque strati e avente uno spessore compreso tra 2 e 4 μm . La membrana di Bruch si pone tra coroide ed epitelio pigmentato della retina e la sua funzione consiste nel connettere la tonaca vascolare alla tonaca nervosa.

Infine, l'epitelio pigmentato della retina (RPE) è un tessuto monostratificato di colore scuro altamente specializzato e posto tra la retina ed il coroide-membrana di Bruch. Le cellule dell'RPE, contenenti melanina, assorbono la luce in eccesso e consentono lo scambio di ossigeno, nutrienti e metaboliti cellulari tra i fotorecettori ed il coroide. Tale trasporto è assai modesto attraverso la via paracellulare a causa della presenza di tight junctions. La permeabilità di sostanze, quali farmaci, attraverso RPE è limitata dalla possibilità di formazione di legami tra le sostanze stesse e le proteine tissutali o la melanina, dalla presenza di trasporto attivo, nonché dalla significativa attività metabolica [45].

Melanina

Le melanine sono una classe di biopolimeri [46] polianionici [44] ubiquitari [47], responsabili della colorazione di animali, piante, funghi e batteri. Nei mammiferi, in particolare, si distinguono la eumelanina (pigmento marrone-nero, costituito principalmente da di-idrossindolo), la feomelanina (pigmento giallo-rosso, ricco in zolfo e formato prevalentemente da benzotiazine) e la neuromelanina (pigmento scuro di aspetto sferico, costituito da un core di feomelanina (20-25% del totale) ed un involucro di eumelanina [48]). La melanogenesi si realizza a partire da L-DOPA (precursore oltre che delle melanine, anche delle catecolamine) in cellule pigmentate specializzate, denominate melanociti ed il pigmento è depositato in organelli subcellulari noti come melanosomi. La biosintesi della melanina è regolata da molteplici fattori (genetici, ambientali ed ormonali [49]) e vede coinvolti numerosi enzimi, tra i quali il ruolo chiave è svolto dalla tirosinasi [50]. Tra gli svariati ruoli posseduti dalla melanina, il principale ha carattere protettivo. Tale funzione si concretizza sia attraverso un meccanismo fisico, sia attraverso un processo biochimico: il pigmento è infatti fotoprotettore, in quanto assorbe le radiazioni UV, riducendone il potenziale dannoso [51], ed al tempo

stesso antiossidante, grazie alla sua capacità di disattivare le specie reattive all'ossigeno (ROS), in grado di danneggiare il DNA [52].

Nell'occhio umano si distinguono due tipi di cellule pigmentate: le cellule dell'epitelio oculare pigmentato, espresse nell'iride, nei corpi ciliari e nel coroide, ed i melanociti uveali, presenti nell'epitelio pigmentato della retina (RPE) e nell'epitelio pigmentato dell'iride. Le prime contengono prevalentemente eumelanina e sono molto più pigmentate dei melanociti uveali, nei quali, invece, sono espresse sia la eumelanina, sia la feomelanina. Nel confronto tra popolazione bianca e nera, se a livello dell'iride si possono osservare differenze quali-quantitative in termini di melanina espressa (ciò influenza il colore dell'iride) [53], al contrario, tali differenze non si riscontrano nell'RPE [54].

Le melanine, compresa quella oculare, sono in grado di legare numerosi farmaci, attraverso la formazione di interazioni di tipo Van der Waals o elettrostatiche e, molto raramente, di legami covalenti. Se, da una parte, la formazione di un complesso irreversibile può rappresentare per il farmaco un ostacolo al raggiungimento del proprio target, dall'altra un legame reversibile può determinare la formazione di un reservoir dal quale il farmaco viene rilasciato lentamente [44]. In quest'ultimo caso la prolungata permanenza del farmaco all'interno dei tessuti oculari può avere un effetto terapeutico o, al contrario, un effetto tossico in funzione delle caratteristiche del farmaco stesso. Generalmente tali complessi si formano con molecole lipofile e basiche, ma anche composti con differenti proprietà chimico-fisiche sono spesso coinvolti in queste interazioni [55]: è il caso del blu di metilene, nei confronti del quale la melanina mostra elevata affinità [56], ma anche di antibiotici (clindamicina, rifampicina, tetracicline), anestetici locali (lidocaina, procaina), beta-bloccanti (propranololo, timololo, carteololo), beta-agonisti (salbutamolo) [43].

3.4.2 *Barriere dinamiche* [41]

L'effetto di barriera dinamica è determinato dalla clearance congiuntivale e corioidea, mediante flusso sanguigno e linfatico, oltre che dai movimenti convettivi dei fluidi oculari (drenaggio oculare) e dai sistemi di trasporto attivo dell'epitelio pigmentato della retina. Se i meccanismi di clearance e di drenaggio oculare possono essere studiati esclusivamente in modelli *in vivo*, a causa della loro assenza in organi e tessuti

isolati, i sistemi di trasporto attivo presenti nell'RPE invece possono essere caratterizzati mediante utilizzo di colture cellulari.

Nello specifico, nonostante le notevoli differenze interspecie in termini di vascolarizzazione, la clearance ematica e quella linfatica sono in grado di influenzare sia l'assorbimento a livello congiuntivale dei farmaci applicati topicamente, sia la distribuzione degli stessi ai tessuti oculari.

Il drenaggio oculare invece, dipende dalla presenza di flussi convettivi che sono in grado di ridurre la disponibilità intraoculare dei farmaci mediante il trasporto di quest'ultimi ai tessuti oculari, dai quali vengono poi rapidamente rimossi per effetto del flusso sanguigno del coroide, dove sono presenti capillari fenestrati.

Infine, di rilievo, il contributo all'effetto di barriera dinamica da parte delle proteine espresse dall'epitelio pigmentato della retina e deputate alla regolazione del trasporto di ioni e soluti nello spazio sub-retinico (porzione compresa tra RPE e retina). Tali trasportatori possono prevenire l'accesso dei farmaci alla retina in quanto li respingono verso il coroide. Trattandosi di proteine, il loro funzionamento dovrebbe seguire la cinetica di Michaelis-Menten, ovvero, ad alte concentrazioni, si dovrebbe assistere alla loro saturazione.

3.4.3 *Barriere metaboliche [41]*

L'occhio, a scopo di difesa nei confronti di agenti esterni, si caratterizza per la presenza di un sistema enzimatico, costituito principalmente da enzimi lisosomiali e da membri della famiglia del citocromo P-450 e particolarmente attivo a livello del corpo ciliare e dell'epitelio pigmentato della retina. La suddetta attività degradativa può essere causa di mancato accesso del farmaco alla tonaca nervosa.

4 STRATEGIE DI PROMOZIONE DELL'ASSORBIMENTO TRANS-SCLERALE

4.1 Approccio fisico

Per aumentare la permeabilità della sclera nei confronti dei farmaci una possibilità consiste nel ricorrere all'impiego di promotori fisici di assorbimento, ovvero i microaghi, la ionoforesi e la ionoforesi.

I **microaghi** sono aghi di dimensioni micrometriche, pieni o cavi, realizzati in vari materiali (acciaio inox, vetro) e in grado di penetrare i tessuti biologici [57]. Inizialmente sviluppati per applicazione cutanea, sono in fase di studio come approccio minimamente invasivo alla somministrazione oculare di farmaci: infatti, poiché penetrano il tessuto solo per qualche centinaia di micrometri, senza attraversarlo completamente, sono in grado di preservare la retina da possibili danni meccanici [57-59]. Nel caso dei microaghi pieni, la loro superficie viene rivestita con una soluzione contenente il farmaco, mentre i microaghi cavi contengono al loro interno la soluzione dell'attivo, che viene iniettata successivamente alla penetrazione del tessuto. L'applicazione dei microaghi alla sclera comporta la formazione di un deposito di farmaco all'interno della sclera stessa, dal quale il farmaco può diffondere verso i tessuti oculari interni.

La sonoforesi, ovvero l'applicazione degli **ultrasuoni** ai tessuti biologici con finalità terapeutiche, è un ulteriore esempio di approccio alternativo per il trattamento delle patologie oculari. Gli ultrasuoni ad una frequenza compresa tra 0,7-3,0 MHz possono migliorare la permeabilità dei tessuti attraverso tre effetti diversi, noto come effetto termico, cavitazione acustica e streaming. In breve, l'effetto termico, dipende dall'aumento della temperatura del fluido a causa dell'assorbimento di energia, la cavitazione consiste nella formazione di bolle nel mezzo: il loro collasso provoca il rilascio di un'onda d'urto che provoca alterazioni strutturali del tessuto. L'effetto cavitazionale è inversamente proporzionale alla frequenza degli ultrasuoni e direttamente proporzionale alla sua intensità. Infine lo streaming acustico è un flusso di corrente sviluppata in un fluido a causa di un'onda sonora [60]. Gli ultrasuoni sono stati ampiamente studiati in ambito transdermico sia per promuovere l'assorbimento di classi diverse di farmaci, sia a scopo diagnostico [61]. Recentemente alcuni ricercatori hanno posto la loro attenzione sulla valutazione della sonoforesi per applicazione

oculare conducendo esperimenti di permeazione trans-corneale e trans-sclerale utilizzando modelli *in vitro* [62, 63].

Infine la **ionoforesi**, che consiste nell'applicazione di corrente di debole intensità e rappresenta un metodo non invasivo, ben tollerato e di facile attuazione. La ionoforesi consente di modulare la dose da somministrare e permette di veicolare il farmaco nella camera anteriore e nel segmento posteriore. Rispetto alle vie precedenti richiede una maggiore frequenza di somministrazione, ma è praticamente priva di effetti collaterali, se si esclude la possibile insorgenza di algesia transitoria.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi relativi all'applicazione della ionoforesi trans-sclerale a molecole di basso peso molecolare, come antibiotici (amikacina [64]), antineoplastici (carboplatino [65], metotressato [66]), beta-bloccanti (mannitolo, timololo [67]), corticosteroidi (metilprednisolone [65], metilprednisolone emisuccinato [68], desametasone fosfato [67]), FANS [69] e paracetamolo [70].

Per contro i dati relativi alla ionoforesi trans-sclerale per promuovere il trasporto di macromolecole sono scarsi e talvolta in conflitto tra loro. Nel primo studio pubblicato su tale argomento è stato valutato l'effetto della ionoforesi sulla permeazione di destrani (aventi un peso molecolare compreso tra 4,4 e 120 kDa e scelti come modello di macromolecole neutre), attraverso sclera umana e suina isolate [70]. I risultati ottenuti indicano che la ionoforesi anodica applicata per 2 ore alla densità di 2,9 mA/cm² è in grado di promuovere il trasporto di tutti i destrani testati dalle 2 alle 6 volte, rispetto alla condizione di diffusione passiva. Altri autori hanno studiato l'applicazione *in vitro* della ionoforesi trans-sclerale alla sclera umana per promuovere l'assorbimento dell'albumina, molecola carica negativamente e scelta come prototipo di proteina, e dell'acido polistirensolfonico (PSS) considerato modello degli oligonucleotidi [71]. L'applicazione della corrente alla densità di 10 mA/cm² ha consentito di osservare la promozione del trasporto trans-sclerale di entrambi i composti. Applicando il medesimo set-up sperimentale gli stessi autori hanno inoltre studiato il comportamento del bevacizumab, anticorpo monoclonale anti-VEGF. Un incremento del coefficiente di permeabilità rispetto alle condizioni passive è stato osservato in conseguenza dell'applicazione della ionoforesi anodica, per effetto dell'elettro-osmosi. Anche la ionoforesi catodica ha prodotto un effetto di promozione che gli autori attribuiscono al meccanismo elettrorepulsivo, sebbene il bevacizumab possa essere considerato una molecola complessivamente neutra.

Relativamente agli oligonucleotidi è stata dimostrata l'elevata mobilità elettroforetica di una sequenza di DNA a singola catena di 51 basi attraverso la sclera umana isolata [72]. Allo stesso tempo sono stati condotti studi *in vivo* sui ratti che hanno dimostrato come l'applicazione della ionoforesi corneo-sclerale catodica sia in grado di promuovere la penetrazione di un oligonucleotide modello nell'occhio [73, 74]. Carenti i dati *in vivo* relativi alla ionoforesi trans-sclerale di proteine: l'unico studio riportato riguarda l'applicazione di ionoforesi a densità 57 mA/cm² in New Zealand white rabbit, per promuovere l'assorbimento trans-sclerale di albumina bovina. Tuttavia, nonostante la sua presenza nella congiuntiva e nella sclera, il permeante non è stato individuato nel corpo vitreo [75].

4.2 Approccio formulativo

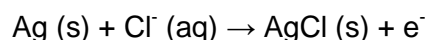
Oltre al ricorso ai promotori fisici è possibile migliorare la somministrazione trans-sclerale di farmaci attraverso un approccio formulativo, basato sull'impiego di piattaforme per il drug delivery ovvero di **Drug Delivery System** (DDS). Attualmente sono in fase di studio o di sviluppo diversi DDS destinati all'applicazione oculare, per il trattamento delle malattie del segmento anteriore e posteriore. Questi device si propongono di minimizzare la degradazione e la perdita del farmaco che a livello oculare precedono la fase di assorbimento, di prevenire gli effetti collaterali, di aumentare la biodisponibilità e di ridurre la frequenza di somministrazione, con conseguente aumento della compliance da parte dei pazienti.

Relativamente al trattamento delle affezioni del segmento posteriore dell'occhio sono in uso o in fase di studio DDS intravitreali e periorculari. Nel primo caso si tratta di impianti polimerici erodibili e non erodibili [40, 76-79], nanoparticelle [80, 81], liposomi [18, 82] ed altri vettori polimerici [83]. Tra i DDS periorculari proposti si annoverano invece idrogel termoresponsivi, sistemi osmotici, sistemi reservoir [11, 81, 82, 84-87]. È evidente che, se il sistema è destinato all'applicazione periorcolare, dovrà mostrarsi capace di rimanere a lungo nel sito di applicazione per garantire il rilascio completo del farmaco caricato. Esempi di studi *in vitro* dei drug delivery system caricati con macromolecole includono idrogel termosensibili utilizzati per incapsulare albumina bovina e anticorpi IgG [88], mentre i dati *in vivo* sono attualmente limitati [89-91].

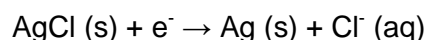
5 IONOFRESI

La ionoforesi è una tecnica non invasiva attraverso la quale, grazie all'applicazione di una corrente elettrica continua e di modesta intensità, è possibile favorire il trasporto attraverso le membrane biologiche di composti biologicamente attivi. Tale tecnica si basa sul principio generale di elettricità per cui le cariche di segno opposto si attraggono, mentre quelle di medesimo segno si respingono [92]. Se la tecnica ionoforetica è da tempo consolidata in ambito transdermico, solamente nell'ultimo decennio essa ha subito un decisivo incremento ed una ottimizzazione in ambito oculare, con lo sviluppo di diversi dispositivi specifici per l'applicazione oftalmica [12].

In generale il dispositivo ionoforetico si compone di un generatore di corrente continua e di due elettrodi, solitamente di argento e cloruro di argento. L'elettrodo di argento costituisce l'anodo, e di conseguenza si ossida, formando, con la soluzione di cloruro in cui è immerso, il cloruro d'argento, sale insolubile che si deposita sull'elettrodo stesso:



Al contrario il catodo, a propria volta immerso in soluzione salina, è rappresentato dall'elettrodo di cloruro d'argento che, riducendosi, dà luogo ad argento:



Nell'applicazione *in vivo* gli elettrodi si definiscono attivo (o reservoir) e dispersivo (o indifferente). L'elettrodo attivo è in contatto con il deposito di farmaco da veicolare e, a seconda dell'utilizzo come anodo o catodo, si parla rispettivamente di ionoforesi anodica e catodica.

5.1 Meccanismi di trasporto [12]

In seguito ad applicazione ionoforetica il composto è oggetto di tre differenti meccanismi di trasporto, ciascuno dei quali contribuisce in modo variabile al trasporto totale. Ciò è funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della molecola impiegata, dei

fattori formulativi ed elettrici, delle proprietà della barriera alla quale il composto è applicato. In particolare:

$$J = J_{ER} + J_{EO} + J_P \quad \text{Equazione 1}$$

dove J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) rappresenta il flusso totale di farmaco che attraversa la membrana, J_{ER} il contributo dato dall'elettrorepulsione, J_{EO} il contributo dato dal flusso elettro-osmotico, mentre J_P il flusso passivo.

L'applicazione di un campo elettrico ad una membrana porosa determina, come mostrato in Figura 4, un flusso di ioni attraverso la membrana stessa e contemporaneamente, ma in direzione opposta, un flusso costituito dai contro-ioni presenti nel tessuto: ciò permette di conservare l'elettroneutralità del sistema. Tale fenomeno, noto come *elettrorepulsione*, è il risultato dell'interazione fra il campo elettrico applicato e gli ioni presenti in soluzione.

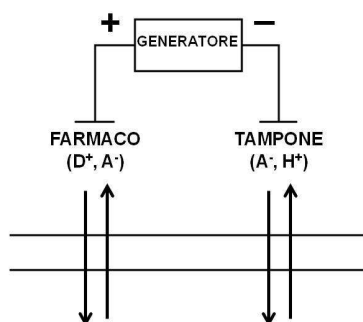


Figura 4. Schema di un sistema ionoforetico

L'elettrorepulsione è il meccanismo di trasporto predominante nel caso di farmaci in forma ionizzata, ed il suo contributo al trasporto totale è descritto dal parametro J_{ER} :

$$J_{ER} = \frac{zDFC}{RT} \frac{dE}{h} \quad \text{Equazione 2}$$

dove z rappresenta la valenza elettrica delle specie ioniche, D (cm^2/h) il coefficiente di diffusione delle specie ioniche attraverso la membrana (inversamente proporzionale al raggio molecolare), F la costante di Faraday (C/mol), C ($\mu\text{g}/\text{ml}$) la concentrazione del farmaco, R ($\text{J}/\text{K mol}$) la costante dei gas, T (K) la temperatura assoluta, dE (J/C) la

differenza di potenziale elettrico, h (cm) lo spessore della membrana. In presenza di farmaci carichi positivamente a pH fisiologico l'effetto elettrorepulsivo è indotto dall'utilizzo di un anodo quale elettrodo attivo; al contrario, se il farmaco presenta cariche negative l'elettrorepulsione si indurrà per applicazione di ionoforesi catodica (catodo quale elettrodo attivo).

Così come l'elettrorepulsione è il meccanismo di trasporto predominante per le specie ionizzate, l'*elettro-osmosi* lo è per i composti neutri e per quelle macromolecole che, anche se cariche, sono caratterizzate da un basso rapporto carica/massa. Il flusso elettro-osmotico (*EO*), infatti, è un flusso convettivo di solvente che si genera quando una differenza di potenziale viene applicata ai lati di una membrana porosa e carica elettricamente. Poiché è un flusso di solvente, è in grado di trascinare con sé tutti i composti in soluzione, indipendentemente dalla loro carica elettrica. In particolare, essendo le membrane biologiche cariche negativamente per valori di pH maggiori di 4, il flusso elettro-osmotico si muove in direzione anodo-catodo analogamente ai contro-ioni cationici.

Infine contribuisce al trasporto totale del farmaco il flusso diffusivo J_p , che è funzione del gradiente di concentrazione del farmaco stesso, nonché dei coefficienti di ripartizione e di diffusione. In particolare:

$$J_p = K D \frac{\Delta C}{h} \qquad \text{Equazione 3}$$

dove K è il coefficiente di ripartizione, D (cm^2/h) il coefficiente di diffusione, ΔC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) la differenza di concentrazione alle due estremità della membrana, avente spessore h (cm).

Se è assodato che l'applicazione della ionoforesi alla pelle è in grado di aumentarne reversibilmente la permeabilità [93], non sono riportate in letteratura analoghe evidenze per la sclera.

5.2 Fattori che influenzano il trasporto ionoforetico [94]

Tra i fattori predominanti che influenzano la ionoforesi, si annoverano le proprietà chimico-fisiche del farmaco (come le dimensioni, il raggio molecolare, la lipofilia, il pK_a), i fattori formulativi (quali il veicolo, le caratteristiche del tampone, le condizioni di pH, la viscosità del mezzo disperdente, la concentrazione), i fattori elettrici (la presenza di ioni, per esempio del tampone, con conseguente fenomeno della competizione ionica; la tipologia degli elettrodi; l'intensità ed il tipo di corrente), i fattori biologici (come spessore e integrità del tessuto utilizzato), la durata del trattamento.

In particolare, nella ionoforesi il flusso elettrorepulsivo attraverso la membrana risulta direttamente proporzionale al rapporto tra la carica e la massa del permeante ed inversamente proporzionale allo spessore delle membrane stesse. Poiché esiste una relazione lineare tra la concentrazione del farmaco ed il flusso, così come tra il flusso elettrorepulsivo e l'intensità di corrente applicata, la ionoforesi permette, attraverso la modulazione dell'intensità di corrente applicata e della concentrazione, il controllo della dose somministrata.

Un altro parametro di rilievo è il pH, che influenza la ionizzazione del farmaco e la carica della membrana. Per evitare variazioni di pH in conseguenza del passaggio di corrente si utilizzano elettrodi di argento e di cloruro d'argento, perché, rispetto agli elettrodi inerti di platino o di zinco, non danno luogo ad elettrolisi dell'acqua. Quando vengono utilizzati gli elettrodi inerti, si ricorre quindi all'uso di sistemi tampone, che tuttavia non sono privi di svantaggi. Infatti, insieme ad altri eccipienti, quali conservanti, antiossidanti e stabilizzanti, possono mettere a disposizione ioni e contro-ioni, che, rispetto alle molecole del farmaco, si caratterizzano generalmente per minori dimensioni e maggiore mobilità. Ciò è causa del fenomeno noto come competizione ionica, responsabile della riduzione del flusso ionoforetico del farmaco.

5.3 Tollerabilità [9]

Per verificare la tollerabilità della ionoforesi trans-sclerale sono stati condotti studi *in vivo* su volontari sani. In particolare risultano ben tollerate esposizioni, su di un'area di $0,5 \text{ cm}^2$, fino a $3,0 \text{ mA}$, per 20 minuti oppure a $1,5 \text{ mA}$ per 40 minuti. Tuttavia la tecnica non risulta totalmente priva di effetti collaterali, seppure poco frequenti e transitori, quali sensazione di bruciore e dolore lieve, e comunque direttamente correlati all'intensità di corrente utilizzata e alla durata del trattamento. Infatti, sebbene

non si rilevano significative alterazioni a carico dell'occhio, i soggetti sottoposti a trattamento operato con intensità di corrente di 4 mA per 20 minuti, su una superficie di 0,5 cm², hanno riferito sensazione di bruciore in corrispondenza del sito di applicazione dell'elettrodo.

6 IDROGEL

Gli idrogel sono reticoli polimerici tridimensionali idrofili capaci di assorbire grandi quantità di acqua o di fluidi biologici. La struttura reticolata dell'idrogel è costituita da omopolimeri o da copolimeri ed è insolubile per la presenza di legami chimici o fisici. Essi mostrano compatibilità termodinamica con l'acqua, che ne consente il rigonfiamento (swelling). Numerose sono le applicazioni in ambito medico e farmaceutico in quanto gli idrogel sono affini ai tessuti corporei grazie alla loro natura idrofila e alla loro capacità di intrappolare nel reticolo tridimensionale polimerico grandi quantità di acqua: ciò rende ragione della loro biocompatibilità. Inoltre la consistenza gommosa assicura un ridotto stress meccanico nei confronti dei tessuti con i quali entrano in contatto [95].

Il caricamento degli idrogel con i farmaci può avvenire dopo la loro formulazione, per immersione in una soluzione contenente l'attivo, il quale diffonde passivamente nel reticolo tridimensionale del gel, oppure, più frequentemente, il farmaco viene aggiunto durante la formulazione. Nel caso dell'applicazione oculare risulta vantaggiosa l'associazione con polimeri mucoadesivi che aumentano la durata del contatto tra il dispositivo e la superficie oculare, con conseguente aumento delle probabilità di successo terapeutico. Il farmaco può essere liberato dall'idrogel tramite diffusione passiva dovuta al gradiente di concentrazione, ma caratteristica peculiare di questi sistemi è di rilasciare il farmaco in seguito a stimoli specifici quali la variazione della temperatura, del pH, di concentrazione di specifici analiti oppure in seguito all'applicazione di campi elettrici o magnetici.

6.1 Effetto dell'applicazione della corrente elettrica agli idrogel [96]

Alcuni idrogel modificano la loro struttura in seguito all'applicazione di corrente elettrica. Tale comportamento è riferibile agli idrogel preparati a partire da polielettroliti, cioè polimeri che contengono numerosi gruppi ionizzabili lungo la catena, e può essere sfruttato per favorire il rilascio di farmaco. Infatti, grazie alla modulazione dell'intensità di corrente, alla durata degli impulsi e all'intervallo fra gli impulsi stessi, è possibile controllare il rilascio dell'attivo nel tempo. I polimeri più frequentemente impiegati sono polianionici o policationici, raramente polielettroliti anfoteri. Possono essere naturali (es. agarosio, acido ialuronico) o sintetici (es. acrilato, metacrilato).

Per valutare la sensibilità degli idrogel nei confronti della corrente essi vengono posti a contatto con uno o entrambi gli elettrodi, oppure possono essere immersi in un solvente conduttore come una soluzione salina. A seguito dell'applicazione di un campo elettrico gli idrogel sensibili alla corrente, in genere, vanno incontro a sineresi, fenomeno macroscopico caratterizzato da un deswelling, cioè una riduzione di peso tempo-dipendente, causato dall'espulsione di liquidi, altri rigonfiano (swelling), raramente erodono.

6.1.1 *Sineresi indotta dalla corrente elettrica*

Per sineresi si intende la fuoriuscita di acqua dall'idrogel che può avvenire in seguito all'applicazione di corrente elettrica. Questo fenomeno dipende principalmente dalla carica trasportata attraverso il gel, più che dal voltaggio applicato; inoltre non c'è una relazione lineare tra intensità di corrente e sineresi. Il processo è reversibile poiché, a seguito della rimozione del campo elettrico, il gel riassorbe il volume di liquido perso precedentemente e rigonfia. I meccanismi principali attraverso i quali si può giustificare la sineresi degli idrogel a seguito di applicazione di corrente sono tre: l'instaurarsi di un gradiente di stress meccanico; l'alterazione del pH in corrispondenza degli elettrodi; l'elettro-osmosi di acqua accoppiata all'elettroforesi.

Gradiente di stress meccanico: nell'idrogel sono presenti delle cariche fisse e i rispettivi contro-ioni mobili. In un idrogel polianionico per esempio, gli ioni H^+ mobili migrano verso il catodo, mentre i gruppi carichi negativamente delle catene vengono attratti verso l'anodo. Il gel è perciò sottoposto ad uno stress meccanico maggiore all'anodo e minore al catodo. Questo gradiente di stress meccanico contribuisce alla sua deformazione.

Alterazione del pH in corrispondenza degli elettrodi: applicando corrente elettrica ad un mezzo acquoso si ha l'elettrolisi dell'acqua, che comporta un abbassamento del pH all'anodo ed un innalzamento al catodo. Nel caso di un gel polianionico, la formazione di protoni all'anodo determina la protonazione dei gruppi anionici del polimero e quindi alla sua neutralizzazione. Di conseguenza viene alterata la densità di carica della catena, che porta ad una riduzione delle forze repulsive tra catene adiacenti; l'avvicinamento delle catene tra loro comporta la riduzione degli spazi intercatena con conseguente fuoriuscita di acqua che causa deswelling all'anodo. Con meccanismo analogo un gel policationico va incontro a sineresi al catodo, in

corrispondenza del quale gli ioni OH^- generati deprotonano e neutralizzano i gruppi carichi positivamente sulle catene.

Elettro-osmosi indotta da elettroforesi: l'applicazione di corrente elettrica determina la migrazione dei contro-ioni mobili (che normalmente neutralizzano la carica del polimero) verso l'elettrodo di carica opposta, generando una pressione osmotica che trascina acqua (flusso elettro-osmotico). Per esempio, in un gel polianionico, i contro-ioni carichi positivamente migrano verso il catodo favorendo così il movimento dell'acqua.

6.1.2 *Swelling indotto dalla corrente*

È un fenomeno più raro della sineresi indotta da corrente elettrica ed è stato dimostrato solo per alcuni polimeri come PMAA (polimetacrilato).

6.1.3 *Erosione indotta dalla corrente*

È stato dimostrato per alcuni idrogel composti da due differenti polimeri solubili in acqua come PEO (polietilenoossido) e PMAA. Questi interagiscono tra loro tramite legami idrogeno e ionici. Se vengono sottoposti a corrente elettrica, al catodo l'elettrolisi dell'acqua forma ioni OH^- che innalzano il pH (>5,4) e causano la distruzione dei legami e la conseguente disintegrazione del complesso nei due polimeri che lo compongono. Come il processo della sineresi anche quello dell'erosione dipende in modo non lineare dall'intensità del campo elettrico applicato; diversamente dalla sineresi, l'erosione è un processo irreversibile.

CAPITOLO II

SCOPO DELLA TESI

Scopo di questa tesi di dottorato è stato lo studio della ionoforesi trans-sclerale come approccio non invasivo per la somministrazione di farmaci biotecnologici efficaci nel trattamento delle patologie del segmento posteriore dell'occhio. Tale tecnica è proposta come un'alternativa alle attuali vie di somministrazione, prima fra tutte l'iniezione intravitreale, scarsamente tollerata e soggetta a severi, se pur rari, effetti collaterali.

Il lavoro si è articolato in tre parti.

Nella prima parte l'attenzione si è focalizzata sullo studio e sulla caratterizzazione dei tessuti oculari suini allo scopo di valutarne la comparabilità con i corrispondenti tessuti umani; sono stati quindi messi a punto dei modelli *in vitro* utili per la determinazione delle proprietà di barriera di sclera, coroide e membrana di Bruch, con particolare attenzione al ruolo della melanina.

La seconda parte è consistita nello studio della ionoforesi trans-sclerale come possibile approccio terapeutico non invasivo per aumentare la permeazione attraverso i tessuti oculari. Poiché numerosi farmaci, impiegati in terapia o in fase di studio, sono macromolecole di origine biotecnologica, sono stati selezionati quali composti modello un destrano ad alto peso molecolare, tre oligonucleotidi a singola catena ed un anticorpo monoclonale umanizzato. La valutazione dell'effetto di promozione del trasporto dei composti testati da parte della ionoforesi trans-sclerale si è concretizzata attraverso l'esecuzione di esperimenti *in vitro* basati sull'impiego di tessuti oculari animali e umani, preceduti da esperimenti mirati a stabilire la capacità dei composti stessi di permeare la sclera e le altre barriere statiche in condizioni passive.

Infine, la terza parte del lavoro è stata dedicata alla preparazione ed alla caratterizzazione di idrogel quali piattaforme per il rilascio di macromolecole, controllato dalla ionoforesi. Come modello di macromolecola proteica è stata impiegata albumina di siero bovino.

CAPITOLO III

PRIMA PARTE

La prima parte del lavoro ha riguardato la caratterizzazione dei tessuti oculari suini ed il loro confronto con i corrispondenti tessuti umani. Quindi sono stati messi a punto dei modelli *in vitro* che permettono lo studio delle barriere oculari nella somministrazione trans-sclerale di farmaci, con particolare riguardo al ruolo della melanina.

1 MATERIALI e METODI

1.1 MATERIALI

- Amikacina solfato (Lisapharma, Italia): peso molecolare 781,77 g/mol.
- Tripsina tipo I da pancreas bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 24 kDa; attività 8550 BAEE u/mg proteina (3 unità BAEE corrispondono ad 1 unità USP).
- Blu di metilene soluzione 0,05% p/v in acqua (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): cloruro di 3,7-bis-(dimetilammino)-fenazationio, peso molecolare 319,85 g/mol; pKa 3,8; LogP -0,9.
- Levofloxacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 361,37 g/mol; pK_{a1} 5,2, pK_{a2} 6,2; pK_{a3} 8,2; LogD -1,5.
- Propranololo cloridrato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 295,84 g/mol (peso molecolare della base libera 259,35 g/mol); pK_a 9,5; LogP 3,10; LogD 1,27.
- Hepes (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): acido 2-[4-(2-idrossietil)piperazin-1-il]-etansolfonico, peso molecolare 238,30 g/mol; intervallo di tamponamento 6,8-7,2.
- Melanina estratta da *Sepia officinalis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa).
- Melanina sintetica (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa).
- H₃PO₄ 85% (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): acido orto-fosforico, peso molecolare 98,0 g/mol.

- Acido citrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 192,12 g/mol.
- NaOH (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): idrossido di sodio, peso molecolare 39,997 g/mol.
- NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia): cloruro di sodio, peso molecolare 58,44 g/mol.
- KH_2PO_4 anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): fosfato di potassio monobasico, peso molecolare 136,09 g/mol.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): fosfato di sodio dibasico dodecaidrato, peso molecolare 358,14 g/mol (peso molecolare del sale anidro 141,96 g/mol).
- CaCl_2 (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia): cloruro di calcio, peso molecolare 110,99 g/mol.
- Citrato di sodio bi-idrato (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): peso molecolare 294,10 g/mol (peso molecolare del sale anidro 258,12 g/mol).
- Dimetilsolfossido (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 78,13 g/mol.
- Acido acetico glaciale (Merck, Darmstadt, Germania): peso molecolare 60,05 g/mol.
- Metanolo per HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 32,04 g/mol.
- Acetonitrile per HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 41,05 g/mol.

1.1.1 Soluzioni tampone

- Tampone HEPES, costituito da hepes (acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil] etansolfonico; Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa) 25 mM e NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia) 9 g/l, disciolti in acqua demineralizzata; la soluzione viene portata a pH 7,4 con NaOH (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 5M.
- Tampone PBS (Phosphate Buffered Saline), costituito da KH_2PO_4 anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa) 0,19 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 5,98 g/l e NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia) 8,8 g/l disciolti in acqua demineralizzata; la soluzione viene portata a pH 8 con NaOH (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 1M.

1.2 METODI

1.2.1 *Bulbi oculari suini*

I bulbi oculari suini utilizzati, reperiti presso un macello locale, sono stati espianati da animali di razza Large White e Duroc, destinati all'alimentazione umana e pertanto aventi circa 10-11 mesi di età e peso compreso tra 145 e 190 kg. Gli occhi, conservati in bagno di ghiaccio subito dopo l'espianato, sono stati trasportati entro due ore in laboratorio, dove si è provveduto alla rimozione del tessuto muscolare circostante ed alla disinfezione della superficie esterna mediante immersione, per 10 secondi, in soluzione di amikacina 0,3% p/v. La dissezione del bulbo oculare, a seconda della procedura sperimentale adottata, è stata effettuata sull'organo fresco oppure congelato.

1.2.1.1 *Dissezione del bulbo oculare suino fresco*

Il bulbo oculare viene inciso in senso circolare con l'ausilio di un bisturi a livello del limbo (circa 5 mm al di sotto della cornea) (Figura 5a) per separare il segmento anteriore da quello posteriore (Figura 5b).

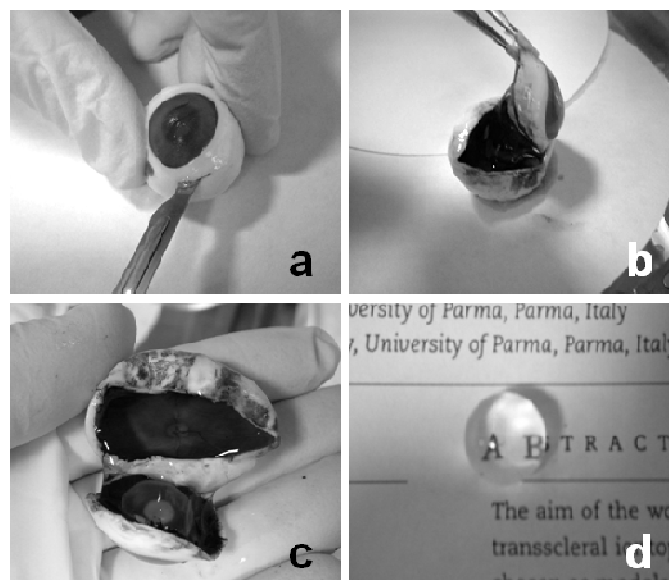


Figura 5. Dissezione del bulbo oculare suino fresco: (a) incisione circolare del bulbo; (b) sollevamento della camera anteriore; (c) bulbo dopo rimozione del corpo vitreo; (d) cristallino

Il segmento anteriore rimane integro e la sua rimozione consente l'estrazione dal bulbo dell'intero umore vitreo (Figura 5c). Dal segmento anteriore è possibile isolare il cristallino, per incisione della capsula che lo contiene (Figura 5d), mentre di complessa realizzazione risulta il prelievo dell'umore acqueo. Dal bulbo oculare, privato di camera anteriore e di umore vitreo, vengono quindi rimossi retina ed RPE, quest'ultimo mediante adsorbimento su carta da filtro imbibita di una soluzione di sodio cloruro 0,9% p/v. In questo modo si dispone di un tri-strato formato da sclera, coroide e membrana di Bruch (S-CH-BM), che può essere separato nel monostrato rappresentato dalla sclera (S) e nel bi-strato composto da coroide e membrana di Bruch (CH-BM), difficilmente separabili l'uno dall'altra [97]. Da ciascun bulbo oculare è possibile ricavare, mediante l'uso di forbici, un numero di frammenti di tessuto compreso tra 2 e 4 da utilizzare per esperimenti di permeazione in celle di diffusione verticale di tipo Franz. I tessuti sono stati isolati ed utilizzati entro poche ore dall'espianto degli occhi, ad eccezione della sclera isolata, che in taluni casi è stata utilizzata successivamente al congelamento (congelamento del tessuto fresco alla temperatura di -80°C per 24 ore, quindi conservazione a -20°C fino al momento dell'impiego).

Il coroide suino si presenta generalmente pigmentato, ma, in taluni casi, mostra una pigmentazione parziale o addirittura assente, come mostrato in Figura 6.

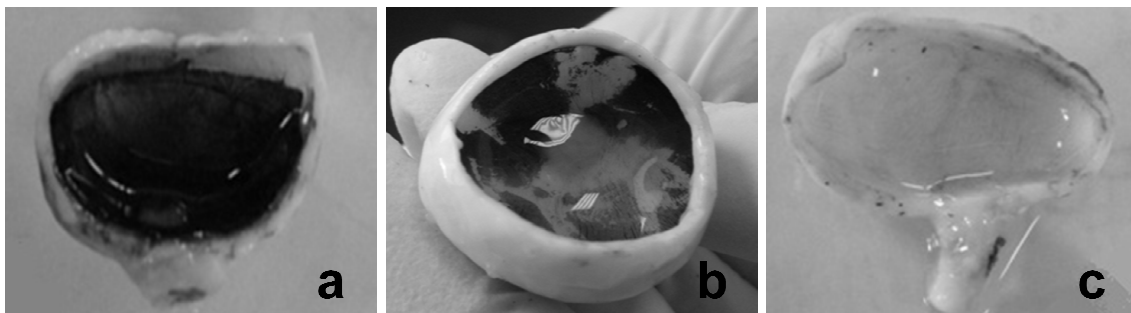


Figura 6. Bi-strato coroide-membrana di Bruch (CH-BM): (a) completamente pigmentato; (b) parzialmente pigmentato; (c) completamente privo di pigmento

Pertanto, al fine di poter valutare il contributo della melanina nell'effetto di barriera alla permeazione, sono stati impiegati sia tessuti pigmentati (Figura 6a), sia tessuti privi di pigmento (Figura 6c). Va precisato inoltre che esiste una correlazione tra la pigmentazione del coroide e quella della sclera corrispondente: la sclera suina, infatti, si presenta completamente bianca quando il coroide è privo di pigmentazione.

1.2.1.2 Dissezione del bulbo oculare suino congelato

L'operazione di dissezione del bulbo oculare suino congelato è stata condotta in bagno di ghiaccio, per rallentare il processo di scongelamento dei tessuti. Mediante l'uso di un bisturi viene praticata un'incisione sulla sclera in senso circolare a 3 mm di distanza dalla cornea. La cornea viene quindi sollevata, lasciando visibile, al di sotto dell'umore acqueo, iride e cristallino (Figura 7a). L'umore acqueo si presenta come un frammento di ghiaccio, di forma lenticolare (Figura 7b), mentre il cristallino appare come una piccola sfera di colore bianco (Figura 7c). Una volta rimossa la camera anteriore si procede con l'estrazione del corpo vitreo come massa compatta, dall'aspetto di una sfera di ghiaccio, sulla cui superficie sono visibili frammenti di RPE e porzioni di retina (Figura 7d). Infine vengono separati, con l'ausilio di una pinzetta, la retina (Figura 7e) ed il coroide (Figura 7f).

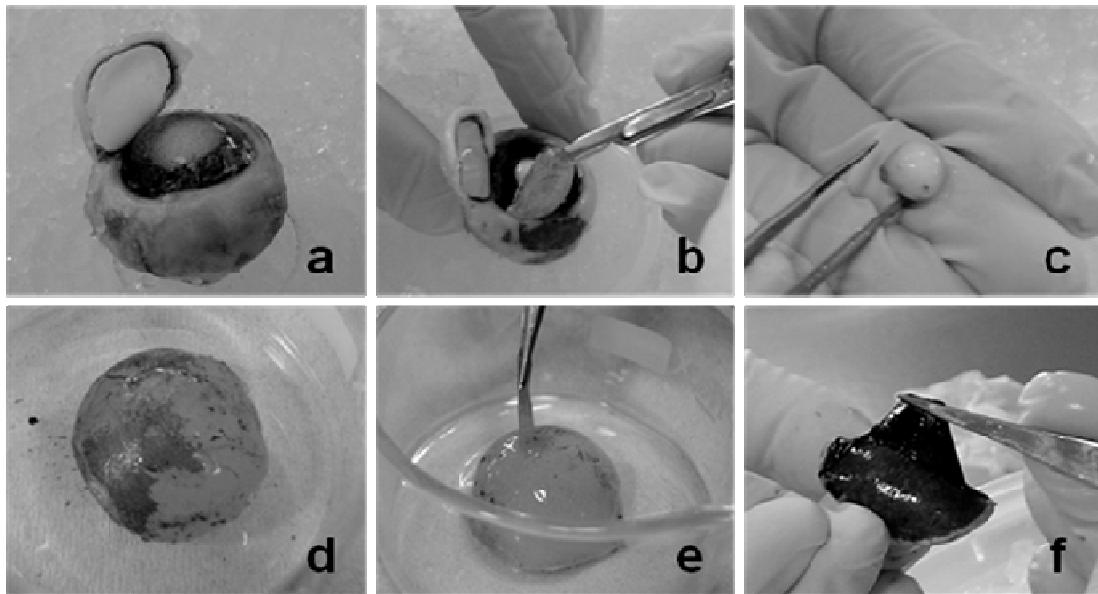


Figura 7. Dissezione del bulbo oculare suino congelato: (a) sollevamento della cornea; (b) rimozione di umore acqueo; (c) cristallino; (d) corpo vitreo rivestito da frammenti di RPE e di retina; (e) rimozione della retina; (f) separazione del coroide dalla sclera

1.2.2 Caratterizzazione dei tessuti oculari

I tessuti isolati da bulbo oculare fresco o congelato, sono stati trasferiti in provette pre-tarate e sono stati pesati; il loro volume è stato calcolato considerando la densità pari a 1 g/ml. Lo spessore di sclera e coroide-membrana di Bruch sono stati determinati mediante uno spessimetro digitale con una sensibilità di 0,001 mm (Absolute Digimatic 547-401, Mitutoyo, Milano, Italia).

1.2.2.1 Istologia

Le sezioni istologiche sono state preparate ed analizzate presso la Sezione di Istologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università degli Studi di Parma. Il tessuto costituito da sclera e coroide scuro o trasparente è stato fissato per immersione in soluzione di formaldeide al 10%, tamponata a pH 7,2.

I campioni sono stati inclusi quindi in paraffina, sezionati mediante microtomo in slice dello spessore di 6 μ m; come coloranti sono state utilizzate ematossilina di Harris ed eosina. Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio ottico Nikon

Eclipse 80i, dotato di fotocamera Nikon Digital Sight DS-2Mv connessa ad un software NIS-Elements F.

1.2.3 *Melanine*

1.2.3.1 *Estrazione della melanina oculare suina*

L'estrazione della melanina oculare suina si realizza a partire dal doppio strato corioide e membrana di Bruch pigmentato, isolato dal bulbo oculare suino come indicato nel paragrafo 1.2.1.1. Il tessuto viene utilizzato dopo conservazione alla temperatura di -20°C per un periodo di tempo non superiore ai 180 giorni.

Metodo chimico

L'estrazione per via chimica della melanina oculare suina è stata condotta mediante il metodo del sodio idrossido [98], con l'apporto di alcune modifiche. In particolare una quantità pari a circa 80 mg di tessuto (peso umido) costituito da corioide e membrana di Bruch è stata posta in vial da microreazione di volume pari a 2 ml e addizionata di 660 µl di una miscela formata da sodio idrossido 1M e dimetilsolfossido in rapporto 10:1 (v/v). Il vial è stato sottoposto a riscaldamento alla temperatura di 80°C per 120 minuti. A seguito di raffreddamento è stato possibile osservare la separazione di un precipitato solido che, isolato dal surnatante, è stato sospeso in 1 ml di acqua distillata. Tale sospensione è stata centrifugata a 12000 rpm per 15 minuti; il precipitato ripreso con 1 ml di acqua distillata e centrifugato per tre cicli consecutivi è stato quindi isolato e trasferito in essiccatore (disidratante CaCl₂, a temperatura ambiente) fino al raggiungimento di un peso costante. Dal surnatante, neutralizzato con acido acetico 50%, si è separato un precipitato scuro che, una volta isolato, è stato aggiunto al precedente nell'essiccatore.

Metodo enzimatico

L'estrazione della melanina oculare suina è stata effettuata modificando il metodo proposto da Pitkänen [99] e applicato ai bulbi oculari bovini: quale enzima proteolitico la subtilisina tipo VIII è stata sostituita da tripsina di tipo I, estratta da pancreas bovino, attiva su analogo substrato. Nel dettaglio, il tessuto pigmentato

costituito da circa 1 grammo di corioide e membrana di Bruch è stato sminuzzato con forbici ed immerso in 3 ml di PBS a pH 8, pH ottimale per l'attività proteolitica dell'enzima (in particolare è stato utilizzato un volume di PBS pari a 0,25 ml per corioide-membrana di Bruch isolati da ciascun bulbo oculare). Sono stati quindi aggiunti 0,215 ml di una soluzione di tripsina tipo I in PBS a pH 8, alla concentrazione di 5 mg/ml in modo che l'attività finale della tripsina fosse 1000 USP/ml. La miscela è stata incubata a 37°C per due ore e sottoposta ogni 10 minuti ad agitazione manuale. Quindi l'enzima è stato inattivato per riscaldamento della miscela a 100°C per 30 minuti. La digestione enzimatica è stata ripetuta una seconda volta mediante aggiunta di 0,215 ml di tripsina in PBS a pH 8 alla concentrazione di 5,33 mg/ml (attività finale dell'enzima 1000 USP/ml). Al termine la miscela è stata filtrata sottovuoto con carta da filtro su imbuto Büchner, utilizzando come soluzione di lavaggio PBS a pH 8. La sospensione ottenuta è stata centrifugata a 12000 rpm per 15 minuti; il precipitato, dopo essere stato separato dal surnatante, è stato essiccato in essiccatore (disidratante CaCl₂) a temperatura ambiente. I granuli di melanina ottenuti sono stati conservati a -20°C.

1.2.3.2 Caratterizzazione delle melanine mediante Dynamic Light Scattering

La melanina isolata dai tessuti oculari suini, così come la melanina sintetica e quella commerciale, estratta da *Sepia officinalis*, sono state caratterizzate in termini di dimensione e indice di polidispersità mediante Dynamic Light Scattering (DLS). Le analisi sono state condotte presso il Dipartimento di Fisica dell'Università degli Studi di Parma, utilizzando uno strumento Zeta Plus con software 90Plus Particle Sizing, ver. 3.60 (Brookhaven Instrument Corporation, Holtsville, NY, Usa).

Le condizioni di analisi sono state le seguenti: temperatura 25°C; lunghezza d'onda di 658 nm; angolo 90°; indice di rifrazione 1,33; viscosità 0,89 cP. Ogni misura ha avuto una durata di 2 minuti ed è stata ripetuta sei volte. Le analisi sono state effettuate su sospensioni di melanina ottenute per agitazione manuale (melanina da *Sepia officinalis*) o in seguito a sonicazione a 37°C per 20 minuti (melanina oculare suina estratta e melanina sintetica). La melanina oculare è stata analizzata sia prima, sia dopo l'essiccamento.

1.2.3.3 Studi di legame

Il metodo impiegato per lo studio di legame *in vitro* tra la melanina oculare suina estratta ed i composti modello è stato modificato da Pitkänen [99] e Potts [100]. In particolare una quantità di melanina pari a $1,5 \pm 0,05$ mg è stata posta all'interno di un vial di vetro di volume 1,5 ml. Per disperdere la polvere sono stati addizionati 0,75 ml di tampone HEPES; quindi per semplice agitazione manuale nel caso della melanina di *Sepia officinalis*, in seguito a sonicazione alla temperatura di 37°C per un tempo di 20 minuti, relativamente alla melanina oculare suina ed a quella sintetica, si è ottenuta una sospensione, alla quale è stato successivamente aggiunto un volume di 0,75 ml di soluzione costituita dal ligando solubilizzato in tampone HEPES. Le concentrazioni finali dei singoli composti testati sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Condizioni sperimentali degli studi di legame *in vitro*

<i>Ligando</i>	<i>Melanina</i>	<i>Concentrazioni di ligando utilizzate (μM)</i>
blu di metilene	oculare suina	78,2; 156,3; 245,9; 390,8; 577,3; 781,6
	<i>Sepia officinalis</i>	
	sintetica	
levofloxacina	oculare suina	7,5; 17,5; 25; 50; 100; 200; 300; 500
	<i>Sepia officinalis</i>	
propranololo	oculare suina	7,5; 17,5; 25; 50; 100; 200; 300; 500
	<i>Sepia officinalis</i>	

La sospensione è stata quindi mantenuta sotto agitazione mediante ancoretta magnetica a temperatura ambiente per 1 ora oppure per una notte. Al termine è stata centrifugata a 12000 rpm per 15 minuti ed il surnatante, una volta isolato dal precipitato, è stato filtrato con filtri di cellulosa rigenerata di porosità 0,45 μ m ed analizzato per la quantificazione del ligando libero. Ciascuna condizione è stata replicata almeno tre volte.

1.2.3.4 Calcolo dei parametri di binding

Il calcolo dei parametri di binding si è basato sull'isoterma di Langmuir riportata in Equazione 4,

$$B = \frac{B_{\max} * [L]}{K_d + [L]} \quad \text{Equazione 4}$$

dove B (nmol/mg) rappresenta la quantità di composto legato per milligrammo di melanina, L (μM) la concentrazione di composto libero, non legato alla melanina, B_{\max} (nmol/mg) corrisponde alla quantità massima di composto che si lega ad ogni milligrammo di melanina, mentre K_d (μM) è la costante di dissociazione all'equilibrio.

1.2.4 Esperimenti di permeazione

Gli esperimenti di permeazione passiva *in vitro* sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticale di tipo Franz (DISA, Milano, Italia), mostrata in Figura 8, con superficie di permeazione di $0,2 \text{ cm}^2$ (nel caso del bi-strato CH-BM) oppure di $0,6 \text{ cm}^2$ (relativamente alla sclera isolata e al tri-strato S-CH-BM). La cella di Franz si compone di due elementi: il compartimento superiore, del volume di circa 1 ml, rappresenta il donatore, mentre quello inferiore, del volume di circa 4 ml, è il ricevente. Il tessuto viene collocato fra i due compartimenti, con la porzione sclerale orientata verso il donatore.

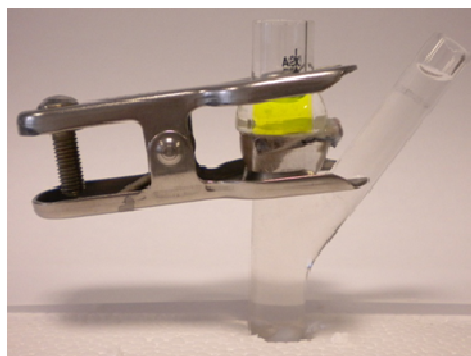


Figura 8. Cella di diffusione verticale di tipo Franz

Gli esperimenti sono stati eseguiti in un bagno termostato ad una temperatura di 37°C. La soluzione ricevente, preventivamente de gasata, è stata mantenuta sotto agitazione, in modo che la concentrazione risultasse omogenea in tutti i suoi punti. Per monitorare il flusso di permeante sono stati effettuati prelievi di ricevente, di volume pari a 0,3 ml, a tempi definiti.

Le condizioni utilizzate durante gli esperimenti di permeazione dei diversi permeanti sono riassunte in Tabella 2. Il tampone HEPES è stato impiegato sia nel compartimento donatore, per diluire (relativamente al blu di metilene) o solubilizzare (nel caso di levofloxacina e propranololo) i permeanti utilizzati, sia nel compartimento ricevente. Gli esperimenti sono stati replicati dalle cinque alle sei volte.

Tabella 2. Condizioni sperimentali relative agli esperimenti di permeazione

<i>Permeante</i>	<i>Concentrazione (mg/ml)</i>	<i>Tessuto</i>
blu di metilene	0,5	CH-BM <i>pigmentato</i>
		CH-BM <i>non pigmentato</i>
	0,1	CH-BM <i>pigmentato</i>
		CH-BM <i>non pigmentato</i>
levofloxacina	0,5	CH-BM <i>pigmentato</i>
		CH-BM <i>non pigmentato</i>
	0,1	CH-BM <i>pigmentato</i>
		CH-BM <i>non pigmentato</i>
		S
		S-CH-BM <i>pigmentato</i>
		S-CH-BM <i>non pigmentato</i>
		CH-BM <i>pigmentato</i>
	0,01	CH-BM <i>non pigmentato</i>
		CH-BM <i>pigmentato</i>
propranololo	0,5	CH-BM <i>pigmentato</i>
		CH-BM <i>non pigmentato</i>
	0,1	CH-BM <i>pigmentato</i>
		CH-BM <i>non pigmentato</i>
	0,01	S
		S-CH-BM <i>pigmentato</i>
		S-CH-BM <i>non pigmentato</i>
		S-CH-BM <i>pigmentato</i>

Inoltre, allo scopo di verificare eventuali interferenze analitiche da parte dei tessuti, sono stati effettuati esperimenti di controllo utilizzando tampone HEPES quale soluzione donatrice.

A partire dai risultati sperimentali sono stati calcolati il flusso (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$), come coefficiente angolare della retta di regressione in condizioni di steady-state, ed il Lag Time (min), come intercetta di tale retta sull'asse delle ascisse. Il coefficiente di permeabilità (P , cm/s) è stato calcolato come rapporto tra il flusso totale di farmaco (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) e la concentrazione del farmaco nel compartimento donatore (c_D , $\mu\text{g}/\text{ml}$), ovvero:

$$P = \frac{J}{c_D} \quad \text{Equazione 5}$$

1.2.5 Metodiche analitiche

1.2.5.1 Metodo analitico per la quantificazione di blu di metilene

L'analisi quantitativa di blu di metilene è stata condotta mediante spettrofotometria UV-Vis, utilizzando un rivelatore Jasco V-570 (Easton, Pennsylvania, Usa). La lunghezza d'onda di assorbimento del blu di metilene è pari a 665 nm. La retta di calibrazione, compresa nell'intervallo di concentrazione tra 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, è stata ottenuta analizzando soluzioni di blu di metilene in tampone HEPES. È stata inoltre valutata la possibile interferenza analitica da parte del tessuto impiegato.

1.2.5.2 Metodo analitico per la quantificazione di levofloxacina

L'analisi quantitativa di levofloxacina è stata effettuata mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizzando una pompa isocratica Perkin Elmer serie 200ISO, rivelatore spettrofotometrico UV-Vis Perkin Elmer serie LC290 oppure Shimadzu SPD-20ALC (Kyoto, Japan), interfaccia Perkin Elmer e software Perkin Elmer Turbochrom Workstation. La lunghezza d'onda di analisi era 294 nm, il volume di iniezione 100 μl ; la colonna utilizzata è stata una C18 Simmetry300[®], 5 μm , 4,6x250 mm (Waters, Milford, Usa). La fase mobile era costituita da tampone citrato 0,01M pH 3,5:metanolo:acetonitrile (70:17:13 v/v/v). L'analisi è stata effettuata a temperatura

ambiente ed il flusso era pari ad 1 ml/min. Il tempo medio di ritenzione è stato di 5 minuti. Il limite di quantificazione, ottenuto analizzando soluzioni di levofloxacin in tampone HEPES, corrisponde a 0,05 µg/ml. È stata inoltre valutata la possibile interferenza analitica da parte dei tessuti impiegati.

1.2.5.3 Metodo analitico per la quantificazione di propranololo

L'analisi quantitativa di propranololo è stata effettuata mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizzando una pompa isocratica Perkin Elmer serie 200ISO, rivelatore spettrofotometrico UV-Vis Perkin Elmer serie LC290 oppure Shimadzu SPD-20ALC (Kyoto, Japan), interfaccia Perkin Elmer e software Perkin Elmer Turbochrom Workstation. La lunghezza d'onda di analisi era di 225 nm, il volume di iniezione 100 µl; la colonna utilizzata era una C18 µBondapak™, 10 µm, 300x3,90 mm (Waters, Milford, Usa). La fase mobile era costituita da acetonitrile:H₃PO₄ 0,2% (30:70 v/v). L'analisi è stata effettuata a temperatura ambiente ed il flusso era pari ad 1,3 ml/min; il tempo medio di ritenzione era di 7 minuti. Il limite di quantificazione, ottenuto analizzando soluzioni di propranololo in tampone HEPES, corrisponde a 0,02 µg/ml. È stata inoltre valutata la possibile interferenza analitica da parte dei tessuti impiegati.

1.2.6 Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati replicati dalle tre alle sei volte ed i risultati sono stati espressi come media±errore standard della media (sem). Le differenze statistiche sono state determinate mediante test T di Student oppure ANOVA, seguita dal test di Bonferroni, e considerate significative con p<0,05.

2 RISULTATI e DISCUSSIONE

2.1 Caratterizzazione del bulbo oculare suino

In Tabella 3 sono riportati i dati sperimentali ottenuti dall'analisi macroscopica del bulbo oculare suino, a confronto con i dati di letteratura relativi al bulbo oculare umano.

Tabella 3. Caratteristiche specifiche dei tessuti oculari suini ed umani

		<i>Bulbo oculare suino (dati sperimentali)</i>	<i>Bulbo oculare umano (dati di letteratura)</i>
Bulbo oculare	Lunghezza asse anatomico	23,17±0,37 mm	21-28 mm [97]
	Peso	8,01±0,08 g	7 g [22]
Umore acqueo	Volume	186,18±16,78 µl	199±48 µl [101]
	Peso	499,41±14,74 mg	210 mg
Cristallino	Spessore	4,75±0,25 mm	4 mm [102]
	Diametro	9,00±1,50 mm	10 mm [102]
Coroide	Peso	80,12±5,24 mg	-
	Spessore	53,57±2,51 µm	84-194 µm ^(a) [103]
	Aspetto	generalmente pigmentato; parzialmente o completamente non pigmentato nel 5-10% dei casi	pigmentato [102]
Retina	Peso	217,82±13,34 mg	326 mg
Umore vitreo	Volume	3,53±0,08 ml	4 ml
Sclera	Spessore	1,25±0,25 mm	0,59±0,08 mm [104]
	Aspetto	generalmente pigmentata, soprattutto in corrispondenza delle arterie ciliari	non pigmentata [102]

^(a) lo spessore del coroide diminuisce linearmente passando da 194 µm della prima decade di vita a 84 µm della decima decade

È evidente come i bulbi oculari suini ed umani siano paragonabili relativamente a peso e lunghezza dell'asse anatomico, così come per i volumi di umore acqueo ed umore vitreo. Il cristallino suino possiede spessore e diametro simili, mentre si distingue da quello umano per il peso più elevato. La retina suina ed umana risultano comparabili, nonostante il dato di letteratura faccia riferimento ad una sola determinazione; il corioide suino, in analogia con il corioide umano, è privo di *tapetum lucidum* [105], ma si mostra più sottile, sebbene sia da notare che quello umano è soggetto ad una progressiva e lineare diminuzione dello spessore età-dipendente [103]. Dal punto di vista della sclera, lo spessore della suina è pari a $1,25 \pm 0,25$ mm, ovvero circa il doppio di quello della sclera umana, che equivale a $0,59 \pm 0,08$ mm [104]. Pertanto le differenze più significative tra i due modelli sperimentali sono da ricondurre essenzialmente al differente spessore della sclera stessa. In virtù della comparabilità anatomica (peraltro riportata anche da altri autori [105-107]), i tessuti oculari suini, così come il bulbo oculare suino nella sua interezza, possono quindi a ragione essere impiegati quali modello *in vitro* per lo studio della somministrazione oculare dei farmaci.

2.2 Corioide suino

Si è osservato sperimentalmente che alcuni bulbi oculari suini mostrano il corioide trasparente: tale peculiarità è spesso correlata con la colorazione chiara dell'iride. L'analisi istologica ha confermato che la mancanza di pigmentazione, è dovuta all'assenza dei granuli di melanina a livello del corioide (Figura 9).

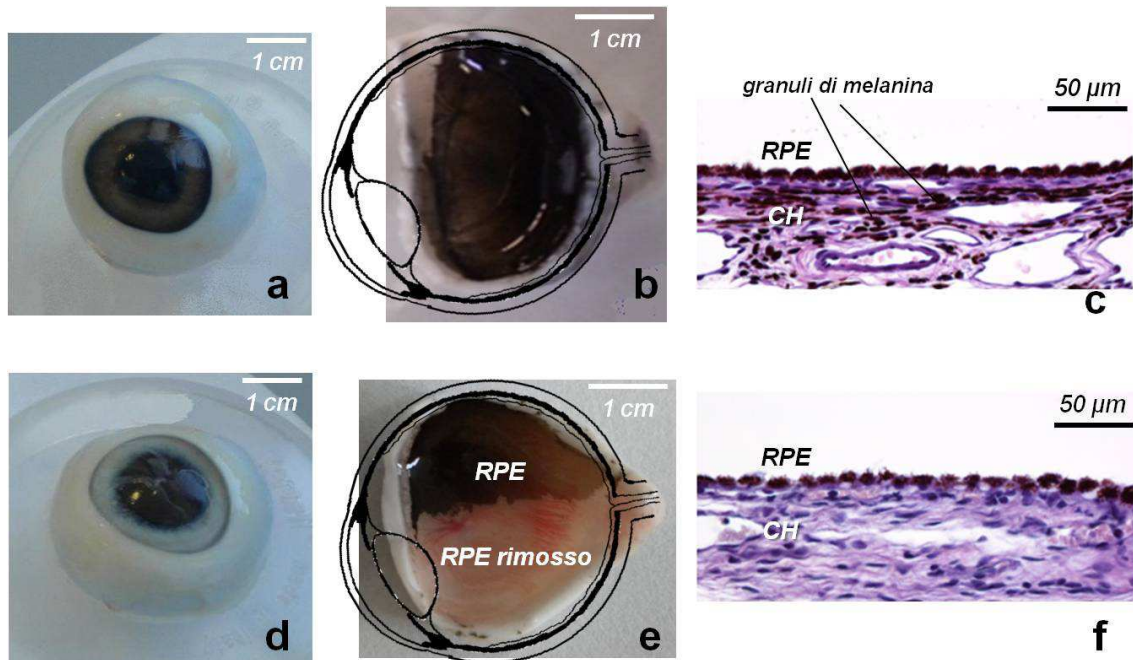


Figura 9. Confronto fra un bulbo oculare con iride scura e coroide pigmentato (a), (b) ed un bulbo oculare con iride chiara e coroide non pigmentato (d), (e). Le immagini al microscopio mostrano come i granuli di melanina dell'RPE siano presenti in entrambi i tessuti (c), (f), mentre siano completamente assenti nel coroide trasparente (f)

È interessante notare come i bulbi oculari esaminati, nonostante l'assenza di melanina nella membrana coroidea, non possano essere considerati albinici, data la presenza di pigmento a livello dell'RPE: ciò è evidente non solo dal punto di vista macroscopico (Figura 9e), ma anche attraverso l'osservazione al microscopio (Figura 9f), dalla quale risulta che il coroide chiaro differisce dal coroide scuro esclusivamente per la presenza della melanina. Tale fenomeno spontaneo, riportato anche in letteratura [108], si manifesta con una frequenza non trascurabile: l'incidenza è infatti compresa tra il 5% ed il 10%.

2.3 Melanine

2.3.1 Estrazione della melanina oculare suina

L'isolamento della melanina per via chimica, mediante modifica del metodo del sodio idrossido [98], non ha prodotto risultati soddisfacenti, dal momento che la procedura si è rivelata scarsamente riproducibile. Peraltro, alcuni autori, riferiscono che l'estrazione per via chimica condotta applicando condizioni eccessivamente drastiche sia in grado di modificare il pigmento dal punto di vista strutturale [109].

Apprezzabili sono stati i risultati ottenuti attraverso l'estrazione della melanina per digestione enzimatica dei tessuti oculari. Diverse sono le metodiche riportate in letteratura, così come le tipologie di enzimi impiegate [110-112]. Si è scelto di seguire una procedura che è il risultato della modifica del metodo proposto da Pitkänen [99] ed impiegato per l'estrazione della melanina da bulbi oculari bovini. Il fattore critico dell'estrazione è rappresentato dall'enzima, una proteasi attiva nell'isolamento dei mitocondri, rappresentata da subtilisina di tipo A. Tale enzima è stato, nel nostro caso, sostituito da tripsina di tipo I estratta da pancreas bovino: analogamente alla subtilisina appartiene alle proteasi impiegate per l'isolamento dei mitocondri ed il suo utilizzo nell'estrazione della melanina dall'iride bovina è stato riportato in letteratura [111].

Da ciascun bulbo oculare suino sono stati isolati circa 3,0 mg di melanina (peso del pigmento dopo essiccamento). Altri autori ottengono mediamente 2,04 mg di melanina per bulbo oculare suino, mediante estrazione per via chimica del pigmento da corioide-membrana di Bruch ed iride [113].

La caratterizzazione in termini di dimensione e distribuzione della melanina oculare estratta, così come della melanina da *Sepia officinalis* e sintetica è stata effettuata mediante Dynamic Light Scattering. I risultati ottenuti, riportati in Tabella 4, mostrano significative differenze in termini di dimensioni tra i granuli di diversa origine, così come anche tra i granuli di melanina oculare estratta, prima e dopo il processo di essiccamento.

Tabella 4. Risultati ottenuti dall'analisi delle melanine mediante Dynamic Light Scattering

<i>Melanina</i>	<i>Indice di polidispersità</i>	<i>Diametro effettivo (μm)</i>	<i>Average countrate (kcps)</i>
oculare suina, pre essiccamento	0,245	0,93	167,8
oculare suina, post essiccamento	0,468	19,50	101,6
<i>Sepia officinalis</i>	0,416	3,10	62,3
sintetica	0,283	0,94	86,0

In letteratura sono riportate le dimensioni, determinate mediante diffrattometria laser previa sonicazione del campione, dei granuli di melanina oculare bovina estratta per via enzimatica: il diametro è compreso tra 0,2 e 10 μm , con una moda di 1,9 μm [99]. Altri autori [114] riportano per lo stesso tipo di melanina, ma sottoposta a liofilizzazione dopo estrazione meccanica, diametri medi compresi tra 0,06 e 1150 μm , con moda a 0,5, 195 e 440 μm . Il confronto con la melanina oculare suina è complesso a causa della diversa specie animale da cui il pigmento è stato estratto.

Per i granuli di melanina sintetica, analizzati mediante diffrattometria laser, è descritto sia un range dimensionale compreso tra 0,3 e 50 μm [99], con una moda di 1,1 μm , sia un intervallo compreso tra 0,2 e 6 μm [114]. Tali valori possono essere considerati in linea con quanto ottenuto sperimentalmente in questo lavoro.

Relativamente ai granuli di melanina estratta da *Sepia officinalis* le dimensioni ottenute, pari a 3 μm , trovano una corrispondenza in letteratura [114] dove viene riportato un diametro medio compreso tra 0,06 e 52 μm , con una moda di 12,4 μm , determinato mediante diffrattometria laser. Altri autori [115], riferiscono un diametro medio compreso tra 2 e 20 μm , con una moda di 6 μm , determinato, mediante microscopia elettronica a scansione, sulla melanina estratta da *Sepia officinalis* e commercializzata dalla Sigma. Tali dimensioni sono dovute alla formazione di aggregati che, osservati al microscopio elettronico, si presentano come granuli di aspetto sferico. Tali aggregati sono da considerarsi degli artefatti, non presenti naturalmente e conseguenza della metodica basata sull'impiego dello spray-drying. Sulla base di queste considerazioni è possibile ipotizzare che la differenza dimensionale tra la melanina oculare estratta non essiccata e quella essiccata sia da attribuirsi al processo di essiccamento e conservazione a -20°C . Questa metodica di preparazione e conservazione potrebbe giustificare la variazione dimensionale causata

dalla formazione di aggregati (analogamente a quanto accade per la melanina di *Sepia officinalis*), stabili al trattamento di sonicazione al quale sono stati sottoposti prima dell'analisi.

2.3.2 Studi di legame con le melanine

Con l'intento di allestire e convalidare un modello di binding *in vitro* basato sull'impiego di melanina isolata, tra le numerose sostanze note in letteratura per la loro attitudine a formare complessi con la melanina stessa, sono stati individuati quali composti modello il blu di metilene [56], la levofloxacinina [116, 117] ed il propranololo [118]. La scelta di tali molecole è da ricondursi in particolare alle differenti proprietà chimico-fisiche possedute, nonché all'interesse che esse suscitano in ambito oculare. Infatti il blu di metilene è un composto che recenti evidenze sperimentali indicano come agente neuroprotettore, potenzialmente utile nel trattamento di alcune affezioni retiniche [119]; la levofloxacinina è presa in considerazione da parte degli oftalmologi, sia per l'efficacia terapeutica nei confronti delle affezioni del segmento anteriore dell'occhio, sia per la tossicità oculare che è conseguenza del suo accumulo [117]; il propranololo appartiene alla classe dei beta-bloccanti, ampiamente utilizzati nel trattamento del glaucoma [120].

I risultati sperimentali ottenuti dagli studi di legame realizzati con melanina oculare suina estratta e con melanina da *Sepia officinalis*, sono stati rielaborati utilizzando l'isoterma di Langmuir, come riportato in Figura 10. Al contrario la melanina sintetica non ha permesso di raccogliere risultati per l'impossibilità di isolare il pigmento dalla soluzione contenente il farmaco libero, alle condizioni di centrifugazione impiegate.

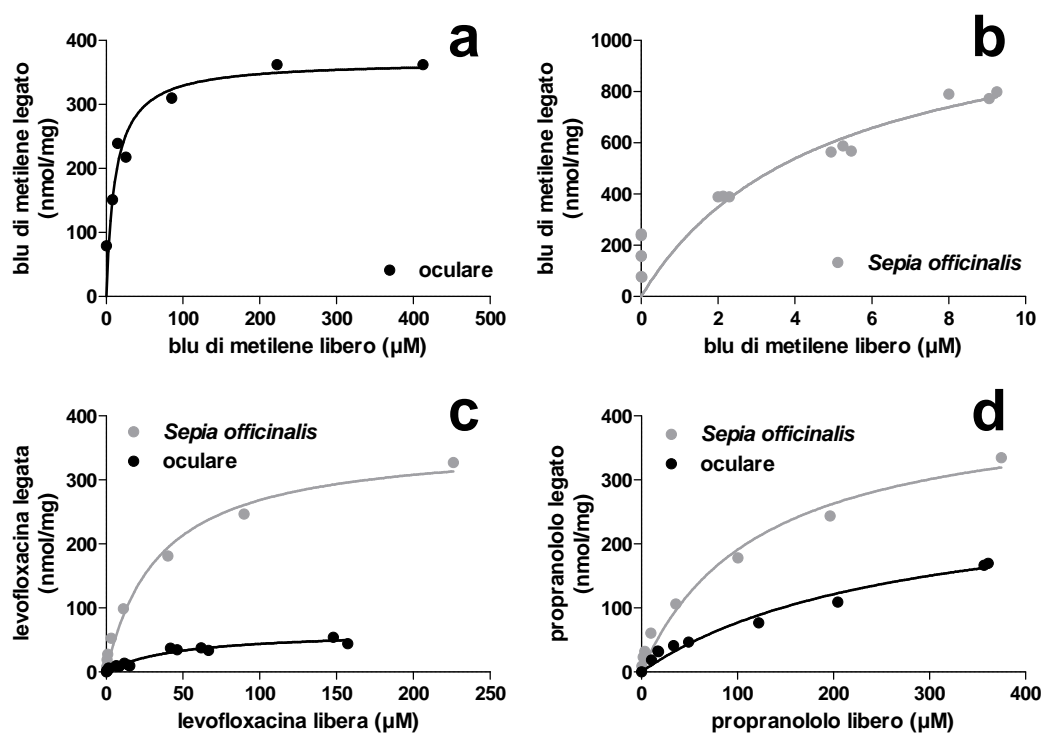


Figura 10. Isotherme di Langmuir riferite al legame del blu di metilene con melanina oculare (a) e melanina di *Sepia officinalis* (b); levofloxacina (c) e propranololo (d) con melanina di *Sepia officinalis* (●) e melanina oculare suina (●)

Utilizzando l'Equazione 4 sono stati inoltre calcolati i valori di B_{max} e K_d (riportati in Tabella 5), per tutti e tre i composti rispetto alle due specie di melanina. Nella rielaborazione è stato considerato un solo sito di legame con il pigmento: infatti, sebbene sia noto come la melanina disponga di diversi siti di legame, la sua eterogeneità così come l'impossibilità di predire le diverse modalità di interazione con le molecole utilizzate, ne rende difficile la determinazione del numero [114].

Tabella 5. Parametri di binding

Composto	Melanina	B_{max} (nmol/mg)	Errore standard B_{max}	K_d (μM)	Errore standard K_d	R^2
blu di metilene	oculare suina	370	15	13	3	0,975
	da <i>Sepia officinalis</i>	1178	317	5	22.8	0,793
levofloxacina	oculare suina	67	14	51	18	0,936
	da <i>Sepia officinalis</i>	361	26	34	8	0,982
propranololo	oculare suina	286	50	272	91	0,969
	da <i>Sepia officinalis</i>	423	49	122	36	0,975

B_{max} e K_d sono stati calcolati rispetto ad un solo sito di legame [114]

È possibile affermare che tutti e tre i composti impiegati mostrano differente affinità rispetto ai due tipi di melanina. Sia per il blu di metilene che per la levofloxacina ed il propranololo, infatti, i valori di B_{max} riferiti al pigmento estratto da *Sepia officinalis* (1178, 361 e 423 nmol/mg, rispettivamente) appaiono più elevati rispetto a quanto calcolato per la melanina oculare (370, 67 e 286 nmol/mg, rispettivamente). È comunque necessario sottolineare che la rielaborazione mediante isoterma di Langmuir, sia nel caso della melanina oculare, sia nel caso della melanina da *Sepia officinalis*, risulta affetta da un significativo errore standard (Tabella 5). La differente affinità mostrata dai due tipi di pigmento può trovare una spiegazione sia nelle differenze strutturali possedute da melanine provenienti da diverse fonti, sia nelle minori dimensioni dei granuli di melanina di *Sepia officinalis*, evidenziate mediante DLS (Tabella 4), ovvero nella maggiore area superficiale esposta e quindi nel maggior numero dei siti di legame a disposizione, rispetto alla melanina oculare.

Se si confrontano fra di loro i tre composti, nonostante la loro affinità relativa, definita dal reciproco di K_d sia la stessa per entrambi i tipi di melanina, ovvero blu di metilene > levofloxacina > propranololo, si osserva una differente capacità legante nei confronti dei due pigmenti. Ciò è da attribuirsi probabilmente alle diverse proprietà chimico-fisiche dei composti e quindi al diverso tipo di interazione che si instaura con il

pigmento. Infatti, se il blu di metilene viene adsorbito sulla superficie della melanina [100], la levofloxacina dà luogo ad interazioni elettrostatiche e, in minor misura, ad interazioni idrofobiche e di Van der Waals [121], mentre, per il propranololo, le modalità di interazione non sono state ancora completamente chiarite. In ogni caso l'interazione tra i farmaci e la melanina è generalmente di natura complessa [44].

2.4 Esperimenti di permeazione

Sebbene gli studi di binding *in vitro* rappresentino un utile strumento per valutare l'affinità della melanina nei confronti dei farmaci, tuttavia i loro risultati non sono predittivi poiché la melanina risulta completamente isolata dal tessuto e non è possibile valutare aspetti cinetici e metabolici [44]. Allo scopo di sviluppare un modello *in vitro* utile a valutare non solo l'effetto di barriera statica di corioide e membrana di Bruch, ma soprattutto in grado di mettere in evidenza il contributo a tale effetto da parte della melanina, si è proceduto con l'esecuzione di esperimenti di permeazione attraverso il bi-strato corioide-membrana di Bruch sia pigmentato, sia completamente privo di pigmento. I risultati della permeazione sono stati quindi confrontati con quelli ottenuti dalla realizzazione di analoghi esperimenti, nei quali il tessuto impiegato è stato la sclera oppure il tri-strato, quest'ultimo sia con il corioide pigmentato, sia depigmentato. Sono state impiegate le stesse molecole di basso peso molecolare, utilizzate negli studi di binding.

2.4.1 Studi di permeazione attraverso corioide e membrana di Bruch

Come evidenziato dalle immagini al microscopio riportate nel paragrafo 2.2, il corioide chiaro differisce dal corioide scuro esclusivamente per la presenza della melanina: il confronto tra i profili di permeazione ottenuti applicando il medesimo composto ad entrambi i tessuti, consente quindi di rivelare il potenziale effetto barriera alla diffusione da parte del pigmento.

Nel caso del blu di metilene, sono state testate due differenti concentrazioni, ovvero 0,5 e 0,1 mg/ml; i rispettivi profili di permeazione sono riportati nella Figura 11a e 11b, mentre i parametri calcolati sono proposti in Tabella 6.

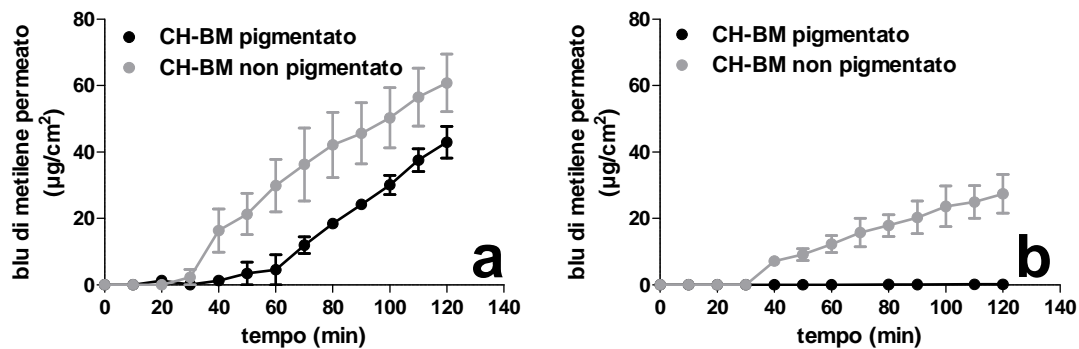


Figura 11. Profili di permeazione del blu di metilene 0,5 mg/ml (a) e 0,1 mg/ml (b) attraverso CH-BM

Quando la concentrazione della soluzione donatrice è 0,5 mg/ml (Figura 11a), il flusso attraverso CH-BM pigmentato (J pari a $37,8 \pm 8,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$), non risulta statisticamente differente ($p=0,07$) rispetto al flusso attraverso il tessuto non pigmentato (J pari a $30,6 \pm 0,32 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$). Ciononostante esiste una marcata differenza nel Lag Time, che passa da circa 11 minuti per il corioide non pigmentato a 50 minuti per il corioide pigmentato (Tabella 6).

La diffusione del blu di metilene è tuttavia fortemente influenzata dalla presenza di melanina quando la concentrazione della soluzione è 0,1 mg/ml (Figura 11b): infatti il flusso calcolato è pari a $15,6 \pm 3,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ attraverso CH-BM non pigmentato (Lag Time 11 minuti), mentre è nullo in presenza di pigmentazione ($p < 0,001$). Tale risultato può essere spiegato dalla formazione di interazioni stabili tra la melanina e lo stesso blu di metilene, che viene quindi trattenuto all'interno del bi-strato e che alla concentrazione di 0,1 mg/ml non è in grado di saturare completamente i siti di legame della melanina stessa, a differenza di quanto accade a concentrazioni cinque volte superiori. È interessante notare che il Lag Time attraverso il bi-strato privo di pigmento è sempre diverso da zero. Ciò dimostra come il corioide, sebbene il suo spessore sia contenuto, in quanto di poco superiore a $50 \mu\text{m}$ (Tabella 3), rappresenti di per sé un ostacolo alla permeazione del blu di metilene, indipendentemente dalla presenza di melanina. Tale evidenza potrebbe essere ricondotta alla presenza di cariche positive sulla molecola a pH 7,4 ed alla disposizione del blu di metilene ad accumularsi nei tessuti, come dimostra l'intensa colorazione del bi-strato al termine dell'esperimento.

Tabella 6. Parametri di permeazione attraverso CH-BM

<i>Permeante</i>	<i>Concentrazione (mg/ml)</i>	<i>Tessuto</i>	<i>P (cm/s)</i>	<i>Lag Time (min)</i>
blu di metilene	0,5	CH-BM pigmentato	$(2,1 \pm 0,48) \cdot 10^{-5}$	49±9
		CH-BM non pigmentato	$(1,9 \pm 0,16) \cdot 10^{-5}$	11±7*
	0,1	CH-BM pigmentato	0	-
		CH-BM non pigmentato	$(4,3 \pm 0,94) \cdot 10^{-5*}$	11±1*
levofloxacina	0,5	CH-BM pigmentato	$(3,48 \pm 1,00) \cdot 10^{-5}$	0
		CH-BM non pigmentato	$(4,84 \pm 1,01) \cdot 10^{-5}$	0
	0,1	CH-BM pigmentato	$(5,97 \pm 0,79) \cdot 10^{-5}$	0
		CH-BM non pigmentato	$(6,19 \pm 0,01) \cdot 10^{-5}$	0
	0,01	CH-BM pigmentato	0	-
		CH-BM non pigmentato	$(1,21 \pm 0,33) \cdot 10^{-4 a*}$	0*
propranololo	0,5	CH-BM pigmentato	$(7,7 \pm 0,00) \cdot 10^{-5}$	0
		CH-BM non pigmentato	$(8,1 \pm 0,26) \cdot 10^{-5}$	0
	0,1	CH-BM pigmentato	$(5,21 \pm 0,35) \cdot 10^{-5}$	25±7
	0,01	CH-BM pigmentato	$(2,9 \pm 0,70) \cdot 10^{-5}$	34±6
		CH-BM non pigmentato	$(4,9 \pm 0,19) \cdot 10^{-5}$	0*

* statisticamente significativo rispetto al tessuto pigmentato ($p < 0,05$)

^a calcolato tra 20 e 80 minuti

Sono stati condotti esperimenti di permeazione attraverso il bi-strato CH-BM pigmentato e non pigmentato utilizzando la levofloxacina. Sono state utilizzate tre differenti concentrazioni: 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml. Dai grafici riportati in Figura 12 risulta evidente come per le prime due concentrazioni non vi sia differenza tra i profili di permeazione attraverso il corioide pigmentato e non pigmentato. Quando invece la concentrazione di levofloxacina è ridotta a 0,01 mg/ml il trasporto è rilevabile solo attraverso il corioide non pigmentato; tale evidenza sta ad indicare che la

concentrazione di levofloxacină utilizzata non è sufficiente a saturare tutti i siti di legame del pigmento.

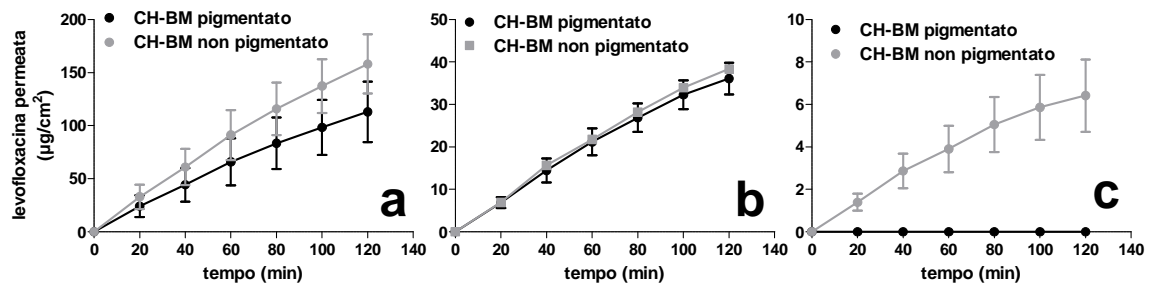


Figura 12. Profilo di permeazione della levofloxacină attraverso CH-BM pigmentato e non pigmentato: concentrazione della soluzione donatrice 0,5 mg/ml (a), 0,1 mg/ml (b) e 0,01 mg/ml (c)

Risulta importante notare che utilizzando concentrazioni superiori di levofloxacină 0,5 e 0,1 mg/ml, i profili di permeazione (Figure 12a e 12b) attraverso il tessuto pigmentato e non pigmentato sono indistinguibili (come si evince anche dai coefficienti di permeabilità riportati in Tabella 6), a conferma della possibilità di saturazione del pigmento da parte della levofloxacină.

Esperimenti di permeazione attraverso corioide e membrana di Bruch sono stati effettuati anche utilizzando il propranololo come permeante. I profili riportati in Figura 13 sono relativi allo studio della permeazione passiva attraverso il bi-strato pigmentato (quindi in presenza di melanina), utilizzando propranololo cloridrato a concentrazione 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml (concentrazioni espresse come propranololo base).

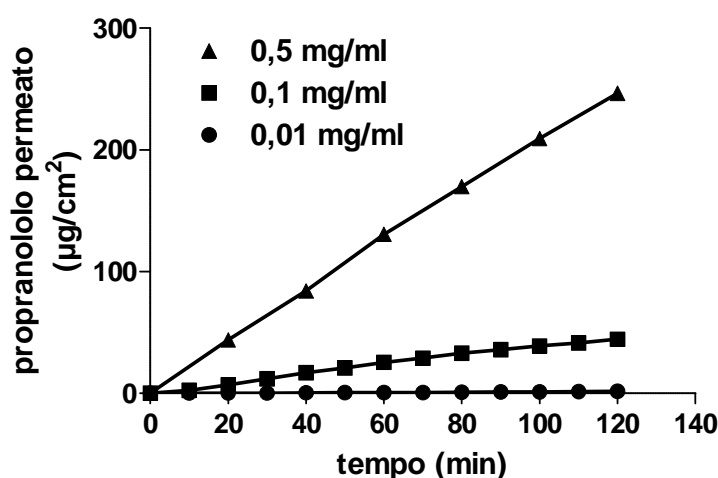


Figura 13. Profili di permeazione del propranololo a concentrazione 0,5, 0,1 e 0,01 mg/ml attraverso CH-BM pigmentato

Il propranololo diffonde facilmente attraverso il bi-strato CH-BM: infatti, indipendentemente dalla concentrazione, i coefficienti di permeabilità sono dell'ordine di 10^{-5} cm/s (Tabella 6), in accordo con i dati di letteratura [122].

Il Lag Time, pari a zero quando la concentrazione del donore è 0,5 mg/ml, è di circa 25 e 34 minuti, rispettivamente per le concentrazioni di 0,1 e 0,01 mg/ml (Tabella 6). Questo comportamento potrebbe essere dovuto alla capacità della melanina di legarsi al farmaco: quando tutti i siti di legame della melanina sono stati completamente saturati dal propranololo, la sua concentrazione nella soluzione ricevente aumenta in maniera lineare. L'ipotesi è stata confermata effettuando uno studio di permeazione attraverso bi-strato non pigmentato. Infatti, se alla concentrazione di 0,5 mg/ml il profilo di permeazione del propranololo attraverso il corioide non pigmentato è di fatto paragonabile a quello attraverso il tessuto pigmentato (Figura 14a), diverso è invece il risultato quando la concentrazione è 0,01 mg/ml. Come mostrato dal grafico (Figura 14b), la presenza di melanina ha un ruolo sostanziale nella definizione del profilo di permeazione: il coefficiente di permeabilità relativo al tessuto non pigmentato rimane sostanzialmente invariato, ma il Lag Time che caratterizza il profilo del corioide non pigmentato è in questo caso uguale a zero.

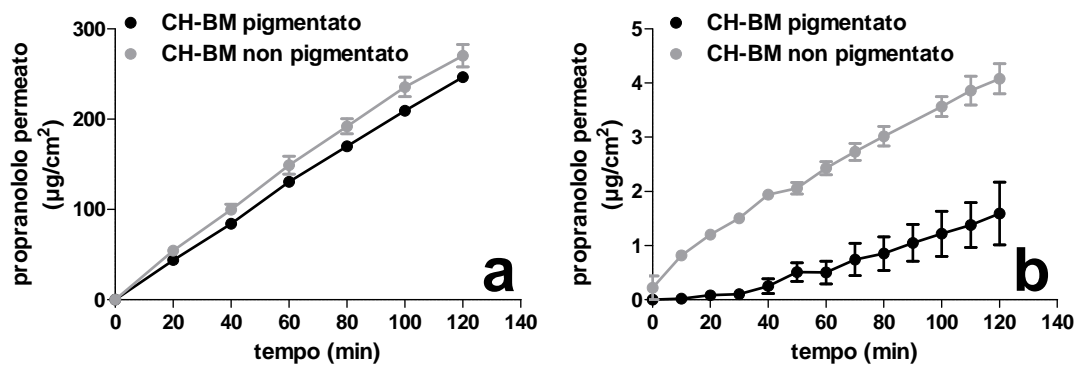


Figura 14. Profilo di permeazione del propranololo 0,5 mg/ml (a) e 0,01 mg/ml (b) attraverso CH-BM pigmentato e non pigmentato

I dati ottenuti con levofloxacina e propranololo indicano che, per entrambi i farmaci, la permeazione risulta ostacolata dalla presenza di melanina nel tessuto. È inoltre importante notare che, nel confronto fra i due farmaci, i dati di permeazione non sono in accordo con i dati di legame che indicavano una massima capacità legante (B_{max}) più elevata per il propranololo (286 nmol/mg, corrispondenti a circa 74 $\mu\text{g}/\text{mg}$ di melanina) rispetto alla levofloxacina (67 nmol/mg, corrispondenti a circa 24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ di melanina). Questa differenza di affinità per la melanina, negli esperimenti di binding e in quelli di permeazione, potrebbe essere correlata alla diversa disponibilità dei siti di legame sulla melanina nelle due differenti condizioni sperimentali. Infatti, è possibile che la melanina estratta dal corioide disponga di nuovi siti di legame che potrebbero invece risultare schermati quando il pigmento si trova all'interno del melanosoma [44, 122]. Questo renderebbe ragione della minore affinità per la melanina che si nota negli esperimenti di permeazione con il propranololo.

2.4.2 Studi di permeazione attraverso sclera e sclera, corioide e membrana di Bruch

Sono stati effettuati esperimenti di permeazione utilizzando la sclera isolata ed il tri-strato S-CH-BM allo scopo di stabilire quanto la pigmentazione del corioide contribuisca all'effetto barriera complessivo, determinato dalle singole membrane oculari che i farmaci debbono attraversare in seguito alla somministrazione trans-sclerale. Gli studi di permeazione hanno riguardato levofloxacina e propranololo e,

relativamente al tri-strato, sono stati condotti impiegando sia tessuti con coroide pigmentato, sia con coroide non pigmentato.

Gli esperimenti di permeazione della levofloxacin sono stati realizzati utilizzando una soluzione avente concentrazione 100 $\mu\text{g/ml}$. Tale concentrazione non aveva determinato differenze statisticamente significative nei profili di permeazione attraverso il bi-strato CH-BM pigmentato-non pigmentato (paragrafo 2.4.1). al contrario, come si evince dalla Figura 15 e dall'osservazione dei parametri sperimentali calcolati riportati in Tabella 7, esiste una differenza di permeabilità tra il tri-strato con coroide pigmentato e quello con coroide non pigmentato, ad indicare un effetto barriera da parte della melanina.

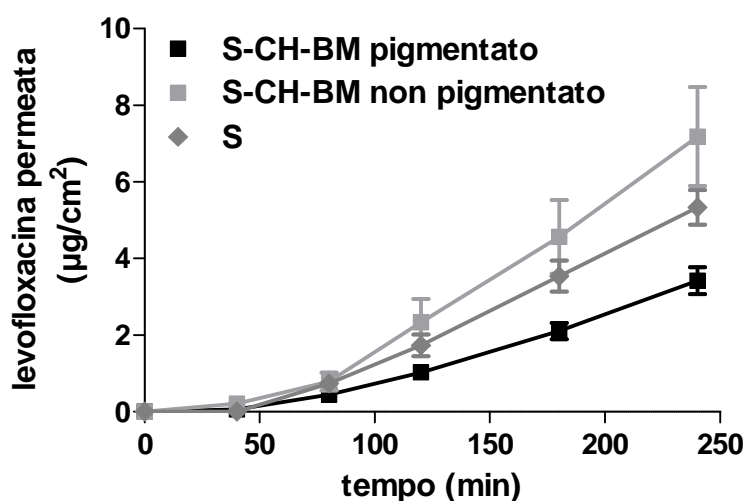


Figura 15. Profilo di permeazione della levofloxacin attraverso sclera e S-CH-BM con coroide pigmentato e non pigmentato

A conferma di ciò il risultato ottenuto applicando il farmaco alla sclera isolata: in questo caso il profilo di permeazione è paragonabile a quello ottenuto con il tri-strato che presenta il coroide non pigmentato.

Tabella 7. Permeazione attraverso sclera isolata e S-CH-BM

Permeante	Concentrazione (mg/ml)	Tessuto	P (cm/s)	Lag Time (min)
levofloxacin	0,1	S	$(5,07 \pm 0,24) \cdot 10^{-6}$	63±7
		S-CH-BM pigmentato	$(4,12 \pm 0,54) \cdot 10^{-6}$	87±3
		S-CH-BM non pigmentato	$(7,65 \pm 0,52) \cdot 10^{-6}$ (*)	58±3 (*)
propranololo	0,01	S	$(5,96 \pm 0,97) \cdot 10^{-6}$	76±9
		S-CH-BM pigmentato	$(5,92 \pm 2,12) \cdot 10^{-6}$ (a)	173±5
		S-CH-BM non pigmentato	$(6,11 \pm 1,34) \cdot 10^{-6}$	72±13 (*)

(*) statisticamente significativo rispetto al tessuto pigmentato (p<0,05)
(a) calcolato tra 180 e 240 minuti

Nel caso del propranololo è stata utilizzata una soluzione avente una concentrazione di 0,01 mg/ml. I profili di permeazione sono riportati in Figura 16, mentre i parametri di permeazione sono presentati in Tabella 7.

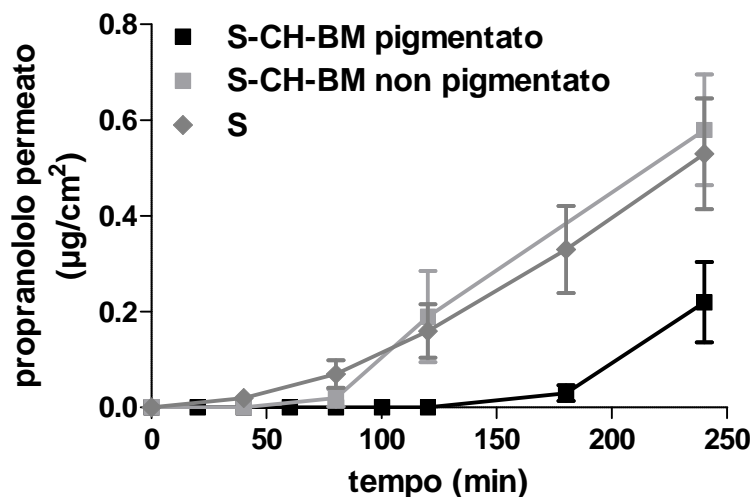


Figura 16. Profilo di permeazione del propranololo attraverso sclera isolata e S-CH-BM con corioide pigmentato e non pigmentato

Il confronto fra i profili di permeazione mostra come la presenza di un corioide pigmentato modifichi sostanzialmente il Lag Time (che passa da 76 a 173 minuti) rispetto alla sclera isolata. I dati ottenuti attraverso il tri-strato SC-CH-BM non

pigmentato sottolineano come questo aumento del Lag Time sia da imputare non tanto alla struttura del corioide stesso, quanto alla presenza di melanina.

3 CONCLUSIONI della PRIMA PARTE

La caratterizzazione dei tessuti oculari suini, che si è concretizzata nell'osservazione sperimentale delle loro proprietà anatomiche, permette di affermare che il bulbo oculare suino rappresenta un ottimo modello animale *in vitro* per lo studio della somministrazione trans-sclerale di farmaci. Infatti i dati sperimentali raccolti relativi ai tessuti suini risultano paragonabili ai corrispondenti riferiti all'uomo e riportati in letteratura.

Particolare attenzione è stata posta nei confronti del coroide, una membrana vascolare che può rappresentare un ostacolo reale alla diffusione dei farmaci. Tale effetto barriera dipende sia da ragioni di carattere fisiologico, ovvero dalla circolazione ematica e linfatica, sia dai caratteri anatomici, cioè dalla presenza della membrana di Bruch, così come anche dalla significativa pigmentazione. La melanina, in particolare, può giocare un ruolo non trascurabile nell'ostacolare la permeazione trans-sclerale dei farmaci nei confronti dei quali mostra affinità. Risulta quindi di fondamentale importanza l'impiego di modelli *in vitro* che, analogamente a quello messo a punto e basato sull'utilizzo di tessuti animali naturalmente pigmentati e non pigmentati, consentano di valutare l'eventuale interazione tra la melanina ed i farmaci somministrati per via trans-sclerale.

L'applicazione al modello di composti noti in letteratura per la loro affinità nei confronti della melanina, ha consentito di evidenziare che la melanina rappresenta una barriera saturabile, pertanto è ipotizzabile che il suo effetto possa essere superato con somministrazione di dosi di carico oppure con somministrazioni multiple.

CAPITOLO IV

SECONDA PARTE

Nella seconda parte del lavoro l'attenzione è stata rivolta alla valutazione della ionoforesi trans-sclerale come possibile promotore di assorbimento di macromolecole.

Sono stati selezionati quali composti modello, un destrano di 40 kDa, tre oligonucleotidi a singola catena aventi un peso molecolare compreso tra 4 e 11 kDa ed un anticorpo monoclonale umanizzato di 149 kDa. Esperimenti mirati a stabilire la capacità dei composti stessi di permeare la sclera e le altre barriere statiche in condizioni passive, hanno preceduto la valutazione dell'effetto di promozione del trasporto da parte della ionoforesi trans-sclerale.

1 MATERIALI e METODI

1.1 MATERIALI

- Avastin[®] soluzione iniettabile 25 mg/ml. (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germania): bevacizumab, anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF, prodotto con la tecnologia del DNA ricombinante. Si presenta come soluzione trasparente o leggermente opalescente, da incolore a marrone chiaro; il pH è pari a 6,2. La composizione per 4 ml di soluzione è la seguente: bevacizumab 100 mg; α,α -trealosio diidrato 240 mg; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 23,2 mg; Na_2HPO_4 4,8 mg; polisorbato 20 1,6 mg; H_2O per preparazioni iniettabili [123]. pI 8,4 ottenuto mediante isoelectric focusing [124].
- FD-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): fluoresceina isotiocianato-destrano, peso molecolare 39 kDa; grado di sostituzione 0,007 moli di FITC/moli di glucosio; raggio di Stokes 4,5 nm; solubilità in acqua 50 mg/ml; lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione della fluoresceina isotiocianato coniugata, rispettivamente 490 e 520 nm.

- FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): fluoresceina 5(6)-isotiocianato, peso molecolare 389,38 g/mol.
- Hepes (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil] etansolfonico, peso molecolare 238,30 g/mol; intervallo di tamponamento 6,8-8,2.
- H₃PO₄ 85% (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): acido orto-fosforico, peso molecolare 98,0 g/mol.
- NaOH (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): idrossido di sodio, peso molecolare 39,997 g/mol.
- NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia): cloruro di sodio, peso molecolare 58,44 g/mol.
- KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): cloruro di potassio, peso molecolare 74,55 g/mol.
- KH₂PO₄ anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): fosfato di potassio monobasico, peso molecolare 136,09 g/mol.
- Na₂HPO₄·12H₂O (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): fosfato di sodio dibasico dodecaidrato, peso molecolare 358,14 g/mol (peso molecolare del sale anidro 141,96 g/mol).
- Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, Germania); carbonato di calcio, peso molecolare 105,99 g/mol.
- NaHCO₃ (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia): bicarbonato di calcio, peso molecolare 84,01 g/mol.
- Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa).
- Sodio azide (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 65,01 g/mol.
- Metanolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 32,04 g/mol.
- Cloroformio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): peso molecolare 119,38 g/mol.

1.1.1 *Oligonucleotidi*

Sono stati utilizzati oligonucleotidi a singola catena sintetizzati presso il Centre for Drug Research dell'Università di Helsinki (Helsinki, Finlandia). Nello specifico un oligonucleotide 12-mer (sequenza: 5'-GTT CCA TTC ATA-3'; peso molecolare 3595,4

Da), un 24-mer (sequenza: 5'-ACC TGG GAC ATC GTT CCA TTC ATA-3'; peso molecolare 7287,8 Da) ed un 36-mer (sequenza: 5'-ACC TGG GAC ATC GTT CCA TTC ATA GTT CCA TTC ATA-3'; peso molecolare 10945,2 Da). Il peso molecolare di ciascuna delle tre sequenze è stato calcolato utilizzando il software OligoCalculator ver. 3.26, disponibile on-line [125]. Gli oligonucleotidi sono sostituiti in posizione 5' con fluoresceina: le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione sono 485 e 535 nm rispettivamente. Ciascuna delle sequenze di DNA in soluzione acquosa, dopo la sintesi è stata conservata in provette di polipropilene, alla temperatura di +4°C, protetta dalla luce.

1.1.2 Soluzioni tampone

- Tampone HEPES, costituito da hepes (acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil] etansolfonico; Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa) 25 mM e NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia) 9 g/l, disciolti in acqua demineralizzata; la soluzione viene portata a pH 7,4 con NaOH (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 5M. La forza ionica è 0,154M. Inoltre sono state preparate soluzioni di hepes 25 mM aventi un contenuto di NaCl inferiore (forza ionica 0,019M) e superiore (forza ionica 0,194M).
- Tampone PBS (Phosphate Buffered Saline), costituito da KH_2PO_4 anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa) 0,19 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 5,98 g/l e NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia) 8,8 g/l disciolti in acqua demineralizzata; la soluzione viene portata a pH 7,4 con H_3PO_4 85% (Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia). La forza ionica è pari a 0,194M.
- Tampone PB (Phosphate Buffer), costituito da KH_2PO_4 anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa) 0,19 g/l, e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 5,98 g/l disciolti in acqua demineralizzata; la soluzione viene portata a pH 7,4 con H_3PO_4 85% (Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia). La forza ionica è pari a 0,043 M.

1.2 METODI

1.2.1 *Quantificazione degli oligonucleotidi*

La quantificazione degli oligonucleotidi sintetizzati presso il Centre for Drug Research dell'Università di Helsinki è stata realizzata mediante lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm dei campioni in acqua demineralizzata. L'analisi è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis Varian Cary 100 conc, software Cary Win UV (Varian, Usa). Le concentrazioni delle soluzioni, espresse come µg/ml e come µM sono state calcolate mediante il software OligoCalculator ver. 3.26 disponibile on-line [125]. Lo stesso software ha permesso il calcolo del peso molecolare di ciascuna delle tre sequenze di DNA.

1.2.2 *Coniugazione di bevacizumab con fluoresceina isotiocianato (FITC)*

Per poter analizzare quantitativamente il bevacizumab è stato necessario procedere alla sua coniugazione con una sostanza fluorescente, quale fluoresceina isotiocianato. A tale proposito è stato messo a punto un protocollo di coniugazione che permetta di disporre di un coniugato stabile nel tempo [126-128]. La reazione di coniugazione è stata effettuata aggiungendo goccia a goccia 250 µl di una soluzione di FITC a concentrazione 1-4 mg/ml in tampone bicarbonato 0,1M, a pH 9, ad 1 ml di soluzione di bevacizumab a concentrazione 5-10 mg/ml, ottenuta per diluizione di Avastin® nello stesso tampone. La soluzione così ottenuta è stata lasciata incubare per 2 ore, con o senza moderata agitazione, a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce, per permettere la formazione del legame tioureico tra il gruppo isotiocianato e le funzioni amminiche libere dell'anticorpo.

Trascorso il tempo di incubazione il prodotto di coniugazione ottenuto è stato purificato per separazione dalla FITC non reagita: a tale scopo ci si è avvalsi della cromatografia di esclusione dimensionale, ricorrendo all'uso di una colonna di volume pari a 9,1 ml, pre-impaccata con gel Sephadex® G-25M (Sigma, St. Louis, Usa). La colonna, conservata in frigorifero in presenza di una soluzione 0,05% di sodio azide in tampone fosfato, è stata preventivamente equilibrata con 30 ml di PBS.

Si è proceduto alla fase di separazione applicando sulla parte superiore della colonna la miscela di reazione e di seguito l'eluente (PBS, complessivamente 10 ml).

In questo modo è stato possibile raccogliere frazioni separate di soluzione del volume di circa 1 ml ciascuna, che sono state analizzate mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro UV-Vis Jasco V-570 (Easton, Usa) per misurarne l'assorbanza a 280 nm, in modo da selezionare quelle che effettivamente contenevano il coniugato. Le frazioni selezionate sono state unite ed analizzate per determinare il rapporto molare F/P (FITC/proteina), nonché la concentrazione di bevacizumab nella soluzione finale. Ciò attraverso la misura dell'assorbanza del coniugato alle lunghezze d'onda di 280 nm (A_{280}) e di 495 nm (A_{495}) e dell'assorbanza a 280 nm di una soluzione di bevacizumab alla concentrazione di 1 mg/ml ($E_{280}^{0,1\%}$). Il rapporto molare (Molar F/P) si ricava dalla seguente formula:

$$\text{Molar F/P} = \frac{MW_{Ac}}{MW_{FITC}} * \frac{Conc_{FITC}}{Conc_{Ac}} \quad \text{Equazione 6}$$

essendo MW_{Ac} ed MW_{FITC} rispettivamente il peso molecolare del bevacizumab e della fluoresceina isotiocianato. Tale formula equivale a:

$$\text{Molar F/P} = \frac{A_{495} * C}{A_{280} - (0,35 * A_{495})} \quad \text{Equazione 7}$$

dove $C = \frac{MW_{Ac} * E_{280}^{0,1\%}}{MW_{FITC} * 195}$ (195 è il valore dell'assorbanza a 490 nm di una soluzione 1 mg/ml di FITC complessata a pH 13), mentre il prodotto ($0,35 * A_{495}$) è il fattore di correzione per l'assorbanza di FITC a 280 nm.

La concentrazione di bevacizumab è facilmente calcolabile dalla relazione:

$$\text{Conc}_{Ac}(\text{mg/ml}) = \frac{A_{280} - (0,35 * A_{495})}{E_{280}^{0,1\%}} \quad \text{Equazione 8}$$

Il coniugato in tampone PBS è stato conservato sia in provette eppendorf di polipropilene, sia in vial di vetro borosilicato, alla temperatura di +4°C, protetto dalla luce.

1.2.3 Verifica della stabilità dei coniugati

Thin Layer Chromatography (TLC)

Con l'obiettivo di verificare l'eventuale presenza di FITC libera, in soluzione con bevacizumab-FITC in seguito a derivatizzazione, nonché la stabilità del coniugato al termine degli esperimenti di permeazione (in condizioni passive ed in presenza di ionofresi) si è ricorsi all'utilizzo della cromatografia su strato sottile (TLC), con sviluppo ascendente.

La fase stazionaria utilizzata è stata gel di silice 60 F₂₅₄, supportato da una lastrina di alluminio (Merck, Darmstadt, D); la fase mobile utilizzata era costituita da una miscela di cloroformio e metanolo in rapporto 1:1. La FITC, impiegata come standard, è stata solubilizzata in tampone bicarbonato 0,1M e depositata sulla lastrina a concentrazioni comprese tra 1 ng/μl e 25 ng/μl, in volumi di 1 μl mediante un capillare di vetro graduato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa). La visualizzazione del cromatogramma è avvenuta per esposizione della lastrina a radiazione UV della lunghezza d'onda di 254 nm, dopo completa evaporazione dell'eluente. Il limite di quantificazione della fluoresceina isotiocianato rilevato è stato di 2,5 ng.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Soluzioni di bevacizumab e di bevacizumab-FITC in PBS sono state caratterizzate in termini di dimensione, indice di polidispersità e potenziale zeta mediante Dynamic Light Scattering (DLS). Le misure sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco dell'Università di Torino (Torino, Italia), utilizzando uno strumento Nanoseries Zetasizer, ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) e presso il Dipartimento di Fisica dell'Università degli Studi di Parma, utilizzando uno strumento Zeta Plus con software 90Plus Particle Sizing, ver. 3.60 (Brookhaven Instrument Corporation, Holtsville, NY, Usa).

Le condizioni di analisi sono state le seguenti: temperatura 25°C; lunghezza d'onda di 658 nm; angolo 90°; indice di rifrazione 1,33; viscosità 0,89 cP. Ogni misura ha avuto una durata di 2 minuti ed è stata ripetuta sei volte.

1.2.4 Tessuti

1.2.4.1 Tessuti oculari suini

Sono stati adoperati sclera e tri-strato costituito da sclera, coroide e membrana di Bruch, isolati come descritto nel paragrafo 1.2.1.1 del Capitolo III da bulbi oculari suini freschi e congelati.

1.2.4.2 Sclera bovina

I bulbi oculari bovini, utilizzati presso i laboratori del Centre for Drug Research dell'Università di Helsinki (Helsinki, Finlandia), provenivano da un macello di Kuopio (Finlandia). I bulbi oculari freschi sono stati sottoposti a dissezione, analogamente a quanto descritto nel paragrafo 1.2.1.1 del Capitolo III, per l'isolamento della sclera. Quest'ultima è stata quindi congelata alla temperatura di -80°C per 24 ore e successivamente conservata a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

La sclera bovina utilizzata, a differenza di quanto osservato per la sclera suina, presentava sempre un'intensa pigmentazione, così come del resto il corrispondente coroide.

1.2.4.3 Sclera umana

I frammenti di sclera umana sono stati ricavati da anelli corneo-sclerali scartati dopo l'isolamento della cornea destinata al trapianto e forniti dalla Banca della Cornea di Bologna, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Oftalmologia dell'Università di Parma. Tali frammenti, aventi generalmente un'area inferiore ad 1 cm², sono stati congelati all'origine in azoto liquido e quindi conservati alla temperatura di -20°C per non oltre due settimane dall'espianto. Per realizzare gli esperimenti di permeazione sono stati congelati a temperatura ambiente e quindi privati di congiuntiva e coroide mediante una spatolina. La sclera isolata è stata immersa in soluzione fisiologica fino al momento dell'esperimento.

1.2.4.4 *Bulbo oculare suino intero*

Sono stati utilizzati bulbi oculari suini interi e freschi, ovvero entro due ore dal momento dell'espianto da animali macellati per l'alimentazione umana. Gli occhi, come precedentemente descritto nel paragrafo 1.2.1 del Capitolo III, sono stati trasportati in laboratorio in bagno di ghiaccio, privati del tessuto muscolare circostante e disinfettati esternamente per breve immersione in una soluzione di amikacina 0,3% p/v.

1.2.5 *Esperimenti di permeazione*

1.2.5.1 *Tessuto isolato*

Gli esperimenti di permeazione *in vitro* sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticale di tipo Franz (DISA, Milano, Italia), con superficie di permeazione pari a 0,6 cm², come descritto nel paragrafo 1.2.4 del Capitolo III. Quali tessuti sono stati impiegati sclera umana, suina e bovina isolate, oppure il tri-strato formato da sclera, corioide e membrana di Bruch (S-CH-BM) di origine suina.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in un bagno termostato ad una temperatura di 37°C. La soluzione ricevente era mantenuta sotto agitazione, in modo che la concentrazione fosse omogenea in tutti i suoi punti. Per monitorare il flusso di permeante sono stati effettuati prelievi di ricevente, di volume pari a 0,3 ml, a tempi definiti.

Sono stati condotti sia esperimenti per valutare il flusso in condizioni di permeazione passiva, sia in presenza di ionofresi, anodica o catodica.

Negli esperimenti ionoforetici le celle sono state collegate ad un generatore che fornisce corrente continua e costante (Iono 1, Cosmic, Pesaro, I). Come anodo si è utilizzato un elettrodo di argento, come catodo un elettrodo di cloruro di argento. Poiché il contatto diretto fra gli elettrodi e le molecole in esame causa la degradazione di quest'ultime, i due elettrodi sono stati immersi in una soluzione di cloruro di potassio di concentrazione 2M, a propria volta posta a contatto con le soluzioni donatrice e ricevente mediante ponti salini, costituiti da un tubo di silicone del diametro di 2 mm, contenente agar al 2% in cloruro di potassio a concentrazione 1M. L'intensità di corrente è stata monitorata attraverso un amperometro (Italia HT 1100A multimeter).

A partire dai risultati sperimentali sono stati calcolati il flusso (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$), come coefficiente angolare della retta di regressione in condizioni di steady-state, ed il Lag Time (min), come intercetta di tale retta sull'asse delle ascisse. Il coefficiente di permeabilità (P , cm/s) è stato calcolato come rapporto tra il flusso totale di farmaco (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) e la concentrazione del farmaco nel compartimento donatore (c_D , $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Negli esperimenti di permeazione in presenza di ionoforesi è stato calcolato l'Enhancement Factor definito come il rapporto tra il coefficiente di permeabilità in presenza di ionoforesi rispetto al coefficiente di permeabilità in condizioni passive.

FD-40

La Tabella 8 riporta le condizioni sperimentali utilizzate negli esperimenti di permeazione del destrano attraverso sclera suina fresca o scongelata; ogni condizione è stata replicata dalle cinque alle sei volte.

Tabella 8. Condizioni sperimentali relative agli esperimenti di permeazione di FD-40 (concentrazione 0,5 mg/ml) attraverso la sclera suina isolata

Veicolo		Sclera Suina	Condizioni di Permeazione
Tampone	Forza Ionica (M)		
HEPES	0,154	decongelata	Passiva, 120 min
		fresca	Passiva, 300 min
			Ionoforesi anodica 0,3 mA, 120 min
			Ionoforesi anodica 1 mA, 120 min
			Ionoforesi anodica 1,75 mA, 120 min
			Ionoforesi anodica 3 mA, 120 min
			Ionoforesi anodica 4,2 mA, 120 min
HEPES	0,194	fresca	Ionoforesi anodica 1,75 mA, 120 min
HEPES	0,019	fresca	Ionoforesi anodica 1,75 mA, 120 min
PBS	0,194	fresca	Passiva, 120 min
			Ionoforesi anodica 1,75 mA, 120 min
PB	0,043	fresca	Passiva, 120 min
			Ionoforesi anodica 1,75 mA, 120 min

È stato altresì valutato il trasporto di FD-40 (concentrazione del donore pari a 0,5 mg/ml in tampone HEPES) attraverso tessuto fresco rappresentato dal tri-strato sclera, corioide e membrana di Bruch, sia in condizioni passive, sia applicando ionoforesi

anodica. Per escludere possibili effetti dannosi sul tri-strato da parte della corrente, è stato valutato l'eventuale incremento della permeabilità del tessuto; a tale scopo sono stati condotti esperimenti di permeazione passiva della durata di cinque ore attraverso il tri-strato al quale era stata precedentemente applicata corrente elettrica per due ore. Sono stati inoltre effettuati esperimenti per valutare il possibile ruolo della sclera come reservoir di farmaco: in questo caso, dopo due ore di permeazione passiva o ionoforetica, la soluzione di FD-40 è stata rimossa dal compartimento donatore ed il campionamento del compartimento ricevente è proseguito per altre tre ore.

Oligonucleotidi

È stata valutata la permeabilità della sclera bovina nei confronti di tre oligonucleotidi a singola catena, di differente peso molecolare. Successivamente è stato studiato l'effetto della ionoforesi trans-sclerale, sia anodica, sia catodica, sul trasporto delle molecole stesse. In tutti i casi la concentrazione dell'oligonucleotide è stata di 0,25 mg/ml, mentre il tampone HEPES è stato impiegato sia nel compartimento donatore, sia nel compartimento ricevente.

Infine, con l'intento di dimostrare la comparabilità tra la sclera bovina e la sclera suina, sono stati condotti esperimenti di permeazione passiva utilizzando l'oligonucleotide 24-mer come modello. Le condizioni sperimentali sono state riassunte in Tabella 9.

Tabella 9. Condizioni sperimentali relative agli esperimenti di permeazione degli oligonucleotidi: in tutti i casi la concentrazione del permeante è pari a 0,25 mg/ml e la soluzione ricevente è rappresentata da tampone HEPES

<i>Oligonucleotide</i>	<i>Concentrazione (mg/ml)</i>	<i>Sclera</i>	<i>Condizioni di Permeazione</i>
12-mer	0,25	bovina	Passiva, 300 min
			Ionoforesi anodica e catodica 1,75 mA (densità 2,9 mA/cm ²), 120 min; quindi passiva fino a 300 min
24-mer	0,25	bovina	Passiva, 300 min
			Ionoforesi anodica e catodica 1,75 mA (densità 2,9 mA/cm ²), 120 min; quindi passiva fino a 300 min
		suina pigmentata	Passiva, 300 min
		suina non pigmentata	Passiva, 300 min
36-mer	0,25	bovina	Passiva, 300 min Ionoforesi anodica e catodica 1,75 mA (densità 2,9 mA/cm ²), 120 min; quindi passiva fino a 300 min

Bevacizumab

Gli esperimenti di permeazione per valutare il trasporto passivo e ionoforetico del bevacizumab attraverso la sclera umana isolata sono stati condotti utilizzando bevacizumab coniugato con FITC ed hanno avuto una durata di 2 ore: le condizioni sperimentali sono riportate in Tabella 10.

Tabella 10. Condizioni sperimentali relative allo studio di permeazione di bevacizumab-FITC attraverso sclera umana isolata

<i>bevacizumab-FITC</i>		<i>Condizioni di Permeazione</i>
<i>Concentrazione (mg/ml)</i>	<i>Veicolo</i>	
2,67±0,14	PBS	Passiva, 120 min
		Ionoforesi anodica 2,3 mA, 120 min
		Ionoforesi catodica 2,3 mA, 120 min
		Passiva, 30 min
		Ionoforesi anodica 2,3 mA, 30 min

Sono stati inoltre condotti esperimenti passivi e con ionoforesi anodica della durata di 30 minuti per valutare la distribuzione del farmaco nel tessuto in conseguenza di una breve applicazione della corrente: in questo caso la sclera è stata immediatamente congelata in azoto liquido al termine dell'esperimento. Le sezioni istologiche sono state preparate ed analizzate presso la Sezione di Istologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università degli Studi di Parma. I frammenti di sclera sono stati fissati e sezionati con un microtomo (8 µm; Reichert-Jung Frigocut 2700, Nussloch, Germany): il sezionamento è stato condotto procedendo dalla faccia corioidea (a contatto con la soluzione ricevente) verso l'episclera (rivolta alla soluzione donatrice), per evitare la contaminazione dei campioni. Le immagini sono state raccolte utilizzando un microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i), dotato di un filtro a fluorescenza (465-495 nm) e di fotocamera (Nikon Digital Sight DS-2Mv) connessa ad un software (NIS-Elements F).

1.2.5.2 *Bulbo oculare suino intero*

Negli esperimenti di permeazione condotti su bulbo oculare suino intero, l'occhio fresco è stato incollato mediante colla cianoacrilica ad un supporto forato di polipropilene. Il supporto è stato quindi fissato su di un becher contenente acqua deionizzata e posto in bagno termostato a 37°C per mantenere la temperatura fisiologica ed un adeguato grado di idratazione. Il supporto è stato quindi riempito con una soluzione donatrice di FD-40 in HEPES a concentrazione 4 mg/ml (dose infinita) in modo tale da garantire un'area di contatto con la sclera (superficie di permeazione) pari a 3,75 cm² (Figura 17).

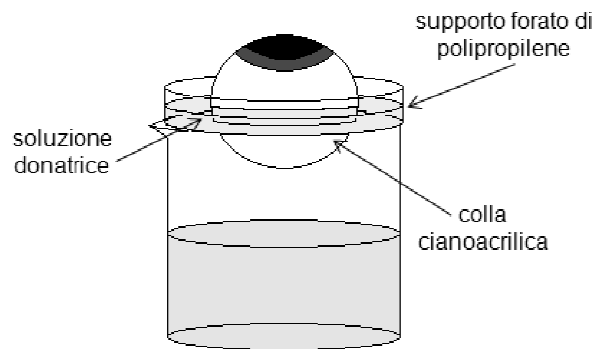


Figura 17. Rappresentazione schematica del set-up utilizzato per la permeazione attraverso il bulbo oculare suino intero

Gli esperimenti, della durata di trenta minuti o di due ore, sono stati effettuati sia in condizione di permeazione passiva, sia in presenza di ionoforesi anodica. In quest'ultimo caso un disco di gel di agar 2% p/v in cloruro di potassio a concentrazione 2M (diametro 25 mm, spessore 3 mm) è stato interposto tra il catodo di cloruro di argento avente forma circolare e diametro 25 mm (IOMED, Salt Lake City, Usa), e la sclera in corrispondenza del polo posteriore dell'occhio; l'anodo di Ag è stato connesso al donatore attraverso un ponte salino, costituito da un tubo di silicone del diametro di 2 mm, contenente agar al 2% p/v in cloruro di potassio alla concentrazione 1M (una rappresentazione schematica è riportata in Figura 18). Per prevenire la dispersione della corrente sulla superficie della sclera, è stato posto uno strato sottile di grasso di silicone intorno al catodo ed alla colla cianoacrilica. La corrente, applicata con intensità

di 4 mA, ovvero con densità di $1,07 \text{ mA/cm}^2$, è stata monitorata attraverso un amperometro (Italia HT 1100A multimeter).

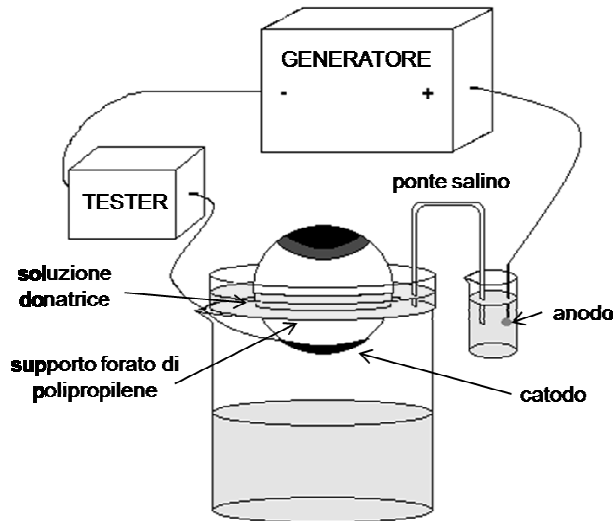


Figura 18. Rappresentazione schematica del set-up utilizzato per la permeazione attraverso il bulbo oculare suino intero in presenza di ionofresi

Al termine dell'esperimento di permeazione, la soluzione donatrice è stata rimossa ed il bulbo oculare è stato immediatamente congelato a -80°C per bloccare la diffusione. Trascorse 24 ore, in corrispondenza della superficie di permeazione, è stato incollato del Parafilm[®] per prevenire la contaminazione dei tessuti durante le operazioni di separazione degli stessi; quindi il bulbo è stato conservato alla temperatura di -20°C per almeno altre 24 ore, al termine delle quali si è proceduto con la dissezione del bulbo congelato per l'isolamento di corpo vitreo, retina e coroide (seguendo la procedura indicata al paragrafo 1.2.1.2 del Capitolo III), per poter procedere all'estrazione ed alla quantificazione di FD-40.

I singoli tessuti sono stati pesati; a retina e coroide sono stati aggiunti 0,6 ml di PBS per disporre di un volume adeguato per effettuare l'estrazione, avvenuta mediante centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti e successiva filtrazione del surnatante con filtri PVDF Millex[®]-HV, di porosità $0,45 \mu\text{m}$. I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante fluorimetria.

1.2.6 *Metodiche analitiche*

1.2.6.1 *Metodo analitico per la quantificazione di FD-40*

L'analisi quantitativa di FD-40 è stata condotta mediante fluorimetria utilizzando un rivelatore di fluorescenza serie 200A Perkin Elmer (Waltham, Usa) e RF-10AXL Shimadzu (Kyoto, JAPAN). La lunghezza d'onda di eccitazione della fluoresceina isotiocianato coniugata è pari a 490 nm, mentre quella di emissione è di 520 nm. La retta di calibrazione di FD-40, compresa nell'intervallo di concentrazione tra 3,1 ng/ml e 400,0 ng/ml, è stata ottenuta analizzando soluzioni di FD-40 sciolto nei diversi veicoli utilizzati per gli esperimenti di permeazione (HEPES, PBS e PB).

È stato inoltre determinata per ciascun tessuto la relativa auto-fluorescenza, il cui valore è stato successivamente sottratto all'intensità di fluorescenza misurata per ciascun campione.

1.2.6.2 *Metodo analitico per la quantificazione di oligonucleotidi*

Le analisi per la quantificazione degli oligonucleotidi sono state condotte presso il Centre for Drug Research dell'Università di Helsinki (Helsinki, Finlandia), utilizzando un lettore a fluorescenza Viktor² 1420 (Wallac) Perkin Elmer (Waltham, Usa). La lunghezza d'onda di eccitazione della fluoresceina coniugata è pari a 485 nm, mentre quella di emissione è di 535 nm.

La retta di calibrazione, ottenuta analizzando soluzioni standard dei singoli oligonucleotidi in HEPES, è compresa nell'intervallo di concentrazione tra 34,7 e 1000 ng/ml per il 12-mer, tra 7,5 e 750 ng/ml per il 24-mer e tra 30,25 e 1210 ng/ml nel caso del 36-mer. È stata inoltre valutata la possibile interferenza analitica da parte del tessuto impiegato.

1.2.6.3 *Metodo analitico per la quantificazione di bevacizumab*

L'analisi quantitativa di bevacizumab marcato con fluoresceina isotiocianato è stata condotta mediante fluorimetria utilizzando un rivelatore di fluorescenza serie 200A Perkin Elmer (Waltham, Usa). La lunghezza d'onda di eccitazione della

fluoresceina isotiocianato coniugata è pari a 490 nm, mentre quella di emissione è di 520 nm. L'interferenza analitica della sclera umana è stata valutata attraverso l'esecuzione di esperimenti di permeazione in cui il compartimento donatore è stato riempito con soluzione fisiologica.

1.2.7 Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati replicati dalle tre alle sei volte relativamente ai tessuti umani e suini, mentre dalle tre alle quattro volte per quanto concerne i tessuti bovini. I risultati sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{errore standard della media (sem)}$; le differenze statistiche sono state determinate mediante test T di Student oppure ANOVA, seguita dal test di Bonferroni, e considerate significative con $p < 0,05$.

2 **RISULTATI e DISCUSSIONE**

2.1 FD-40

Precedenti lavori sperimentali hanno dimostrato la permeabilità della sclera nei confronti di macromolecole [10, 129], così come anche l'effetto di promozione dell'assorbimento da parte della ionoforesi trans-sclerale [70, 71]. Di particolare rilievo la dimostrazione della capacità della ionoforesi trans-sclerale anodica di promuovere la diffusione di macromolecole neutre per effetto del flusso elettro-osmotico indotto nel tessuto [70, 130]. Tuttavia il trasporto ionoforetico è influenzato da diversi fattori, tra i quali la composizione del veicolo e l'intensità della corrente applicata. Quindi, con lo scopo di indagare l'effetto dei fattori formulativi sulla ionoforesi trans-sclerale, sono stati condotti esperimenti di permeazione *in vitro* attraverso i tessuti oculari. Come permeante è stato selezionato FD-40, in virtù del suo elevato peso molecolare (39 kDa) e della sua neutralità, che lo rendono un modello per alcuni composti biotecnologici di impiego terapeutico nel trattamento delle affezioni retiniche.

2.1.1 *Meccanismi di trasporto ionoforetico*

La ionoforesi anodica è in grado di promuovere il trasporto trans-sclerale di FD-40 grazie all'induzione di un flusso elettro-osmotico nella sclera: infatti l'FD-40 è un composto neutro e pertanto non soggetto ad elettrorepulsione. Il flusso elettro-osmotico, definito come un flusso convettivo di solvente che si genera in una membrana porosa e carica come conseguenza dell'applicazione di una differenza di potenziale, nel caso della sclera si muove in direzione anodo-catodo (ovvero, nel caso di applicazione della ionoforesi anodica ad un tessuto montato in una cella di Franz, dal compartimento donatore al compartimento ricevente). La ragione risiede nel fatto che la sclera è una membrana porosa che a valori di pH superiori a 5 risulta completamente carica negativamente, essendo il suo punto isoelettrico circa 3 [70].

2.1.1.1 *Effetto della corrente*

In un primo momento le permeazioni trans-sclerali, sia in condizioni passive, sia in presenza di ionoforesi anodica (elettrodo di argento, anodo, a contatto del compartimento donatore e contro-elettrodo di cloruro di argento, catodo, a contatto del

compartimento ricevente), sono state condotte solubilizzando FD-40 in tampone HEPES per studiare l'effetto dell'intensità di corrente sul trasporto.

In presenza di tampone HEPES, come indicato in Tabella 8, è stato valutato l'effetto dell'intensità di corrente sul flusso trans-sclerale a cinque differenti valori, ovvero 0,3; 1; 1,75; 3 e 4,2 mA (densità rispettive 0,5; 1,7; 2,9; 5 e 7 mA/cm²). I flussi ed i coefficienti di permeabilità (calcolati applicando l'Equazione 5) sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11. Parametri relativi alla permeazione trans-sclerale di FD-40 (concentrazione 0,5 mg/ml)

Veicolo		Condizioni di Permeazione	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	P *10 ⁻⁷ (cm/s)	EF
Tampone	Forza Ionica (M)				
HEPES	0,154	Passiva, 120 min ^a	0,57±0,32	3,15±1,70	-
		Passiva, 120 min	0,48±0,19	2,68±1,05	-
		Ionofresi anodica 0,3 mA, 120 min	0,025±0,005	0,14±0,03	1
		Ionofresi anodica 1 mA, 120 min	0,13±0,04	0,70±0,23	1
		Ionofresi anodica 1,75 mA, 120 min	2,70±0,36	15,0±1,90	3,9±0,5
		Ionofresi anodica 3 mA, 120 min	2,48±0,71	13,8±3,94	3,6±1,0
		Ionofresi anodica 4,2 mA, 120 min	5,96±1,37	33,1±7,60	8,7±2,0
HEPES	0,194	Ionofresi anodica 1,75 mA, 120 min	0,54±0,07	3,01±0,01	1
PBS	0,194	Passiva, 120 min	0,68±0,12	3,78±0,67	-
		Ionofresi anodica 1,75 mA, 120 min	0,69±0,14	3,84±0,79	1
PB	0,043	Passiva, 120 min	0,13±0,02	0,74±0,13	-
		Ionofresi anodica 1,75 mA, 120 min	1,71±0,42	9,51±2,34	3,5±0,9

^a decongelata

La Figura 19 riporta i valori di Enhancement Factor, calcolato come rapporto tra il coefficiente di permeabilità in condizioni ionoforetiche ed in condizioni passive, in funzione dell'intensità (mA) e della densità di corrente (mA/cm²).

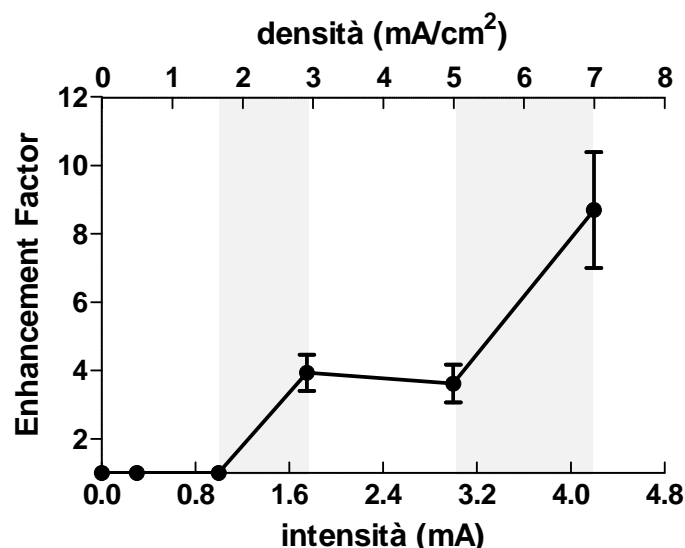


Figura 19. Enhancement Factor di FD-40 in funzione dell'intensità e della densità di corrente

Risulta evidente come non intercorra una relazione lineare tra il flusso transclerale di FD-40 e l'intensità di corrente; al contrario sembra esistere una corrente soglia compresa tra 1 e 1,75 mA (densità di corrente compresa tra 1,7 e 2,9 mA/cm²), al di sotto della quale non si osserva alcuna promozione del trasporto rispetto alle condizioni passive. Inoltre per densità comprese tra 3 e 5 mA/cm² l'Enhancement Factor risulta costante e aumenta invece per densità superiori: la ragione di questo comportamento non è chiara.

Allo stesso tempo sembra esserci un ulteriore step tra 3 e 4,2 mA (pari a densità di corrente di 5 e 7 mA/cm² rispettivamente), per il quale, allo stato attuale, non sono state trovate spiegazioni.

2.1.1.2 Effetto del veicolo

La valutazione dell'influenza del veicolo sul trasporto trans-sclerale ionoforetico di una macromolecola neutra è stata condotta considerando il tampone HEPES a pH 7,4

e l'intensità di corrente di 1,75 mA come riferimento. I profili di permeazione in condizione passiva e ionoforetica (anodica, intensità 1,75 mA) sono proposti in Figura 20a.

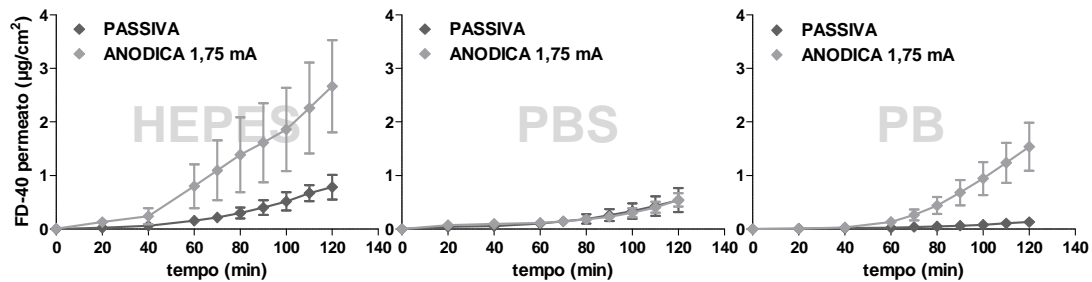


Figura 20. Profili di permeazione passiva e ionoforetica (anodica, 2,9 mA/cm²) attraverso sclera suina isolata di FD-40 in HEPES, PBS e PB

Il tampone HEPES è stato inizialmente sostituito con PBS, in entrambi i compartimenti della cella di Franz: i profili ottenuti sono riportati in Figura 20b. A differenza di quanto osservato in presenza di HEPES, la ionoforesi anodica non è in grado di promuovere il trasporto di FD-40 quando il veicolo è PBS. Questo comportamento potrebbe essere dovuto sia al tipo di tampone (PBS anziché HEPES), sia alla forza ionica (0,194M per il PBS, rispetto a 0,154M per l'HEPES): entrambi i fattori, infatti, influenzano il flusso elettro-osmotico [131-133]. L'effetto del tipo di tampone si basa su di una considerazione che deriva dall'ambito transdermico, secondo la quale alcuni sali possono interagire con le cariche negative della membrana, responsabile del flusso elettro-osmotico, riducendolo [132]. Relativamente alla forza ionica è noto dall'equazione di Helmholtz-Smoluchowski, che il flusso elettro-osmotico è inversamente proporzionale alla radice quadrata della concentrazione degli ioni [131]. Per stabilire quale dei due fattori fosse alla base del comportamento dell'FD-40 osservato sperimentalmente, sono state effettuate delle permeazioni in cui il veicolo era PB (ovvero tampone fosfato privo di NaCl, con una forza ionica di 0,043M): i profili ottenuti, riportati in Figura 20c, mostrano un aumento del trasporto per effetto della ionoforesi.

Rendendo la forza ionica del tampone HEPES uguale al PBS (0,194M, per aumento della quantità di NaCl disciolta), non si osserva alcuna promozione del trasporto ionoforetico (vedi Tabella 11). Riducendo la forza ionica dell'HEPES a

0,019M la resistenza della soluzione aumenta a tal punto da non rendere possibile l'esecuzione dell'esperimento ionoforetico.

Alla luce di quanto osservato si può pertanto concludere che il trasporto ionoforetico trans-sclerale è influenzato non dalla tipologia del tampone, ma piuttosto dalla forza ionica.

2.1.2 Permeazione di FD-40 attraverso sclera, coroide e membrana di Bruch

Il tampone HEPES e la ionoforesi anodica ad intensità di 1,75 mA sono stati selezionati come condizioni per effettuare esperimenti di permeazione volti ad indagare il trasporto post-ionoforetico. Infatti il tampone HEPES con forza ionica pari a 0,154M è il veicolo che consente di ottenere il più elevato Enhancement Factor nel trasporto di FD-40. L'intensità di corrente di 1,75 mA è stata invece preferita a 4,2 mA, sebbene l'effetto di promozione indotto sia relativamente inferiore, poiché quest'ultima avrebbe comportato una densità di corrente di 7 mA/cm², eccessivamente elevata stando agli studi di tollerabilità condotti *in vivo* sull'uomo [9].

Poiché la sclera non è l'unica barriera al trasporto dei farmaci, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il tri-strato, formato, oltre che dalla sclera, anche da coroide e membrana di Bruch. Infatti, nonostante il loro spessore limitato (circa 53 µm nel caso dell'occhio suino, tra 84 e 194 µm nell'uomo [103]), coroide e membrana di Bruch sono considerate un ostacolo rilevante, specie nei confronti di composti idrofili [134]. Esperimenti preliminari di permeazione passiva *in vitro* condotti per confrontare il trasporto passivo di FD-40 attraverso la sclera ed il tri-strato hanno confermato questo ruolo di barriera, come si evince dalla Figura 21.

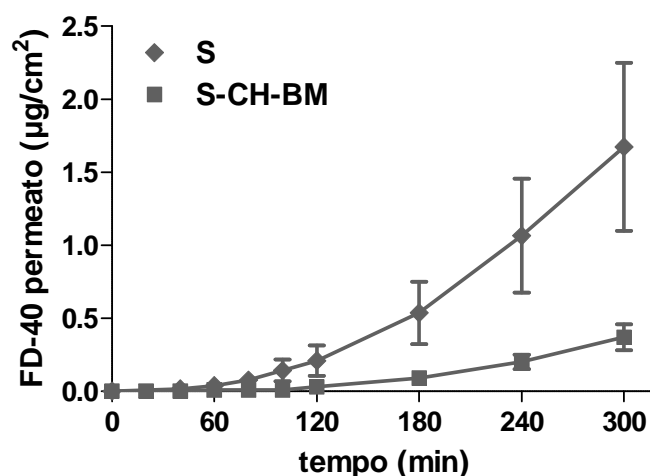


Figura 21. Profili di permeazione passiva di FD-40 attraverso la sclera e S-CH-BM

Quindi è stato effettuato l'esperimento di permeazione di FD-40 in presenza di ionoforesi anodica. L'applicazione della corrente ha avuto una durata di due ore, trascorse le quali si è proseguito nel campionamento del ricevente fino alla quinta ora. I profili ottenuti (Figura 22) mostrano come la ionoforesi anodica sia in grado di promuovere il trasporto di FD-40 e soprattutto come questa promozione perduri anche successivamente all'interruzione della corrente.

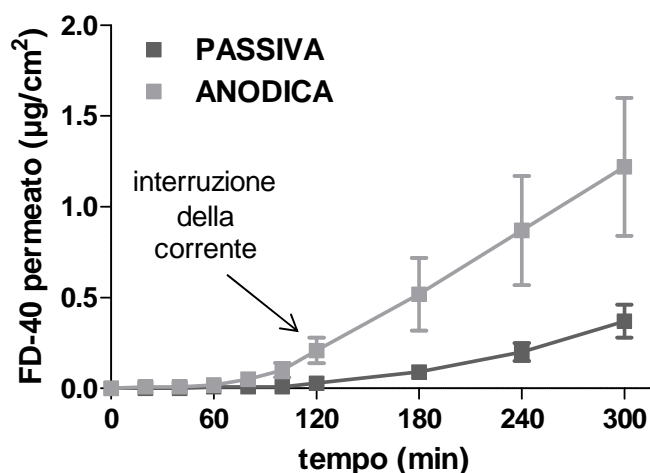


Figura 22. Profili di permeazione attraverso S-CH-BM di FD-40 in condizioni passive e ionoforetiche (anodica, 2,9 mA/cm², 2 ore)

Allo scopo di spiegare tale comportamento, è possibile formulare due differenti ipotesi. La prima ipotesi è relativa alla capacità da parte della corrente elettrica applicata di modificare la permeabilità del tri-strato, come accade nel caso della pelle [93]; la seconda ipotesi invece, attribuisce al tessuto la funzione di deposito nei confronti del permeante, nella fattispecie FD-40. Con l'intendimento di verificare l'attendibilità di entrambe le ipotesi, sono stati allestiti due esperimenti.

Nel primo caso il tri-strato è stato preliminarmente sottoposto a ionofresi mediante applicazione di corrente anodica di densità $2,9 \text{ mA/cm}^2$ (intensità $1,75 \text{ mA}$), per un periodo di due ore. Trascorso questo tempo, si è proceduto all'esperimento di permeazione passiva della durata di 5 ore. Come mostrato in Figura 23 il relativo profilo di permeazione è paragonabile a quelli ottenuti effettuando gli esperimenti di permeazione passiva attraverso il tessuto non trattato: in altri termini, la corrente non è in grado di modificare la permeabilità della sclera, nemmeno temporaneamente.

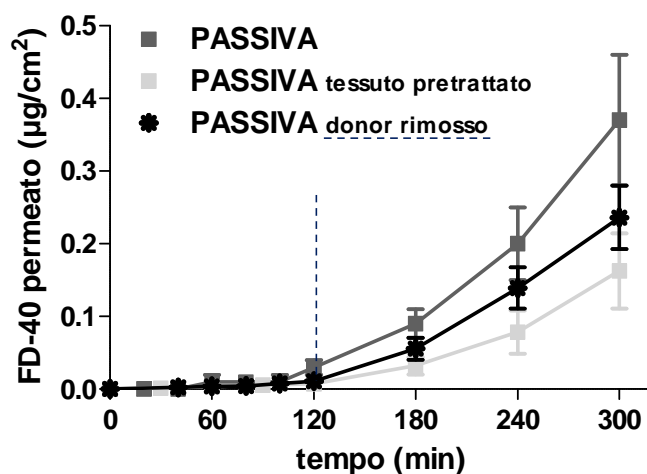


Figura 23. Profili passivi di FD-40 attraverso S-CH-BM; al tessuto pretrattato è stata applicata corrente per 2 ore prima dell'esperimento

Nel secondo caso la soluzione donatrice è stata rimossa dopo due ore di applicazione della ionofresi anodica ed il campionamento del compartimento ricevente è proseguito per le successive tre ore. La Figura 24 mostra come il profilo post-ionoforetico, ottenuto dopo la rimozione del donator, sia del tutto sovrapponibile a quello ottenuto mantenendo FD-40 a contatto con il tessuto dopo l'interruzione della corrente.

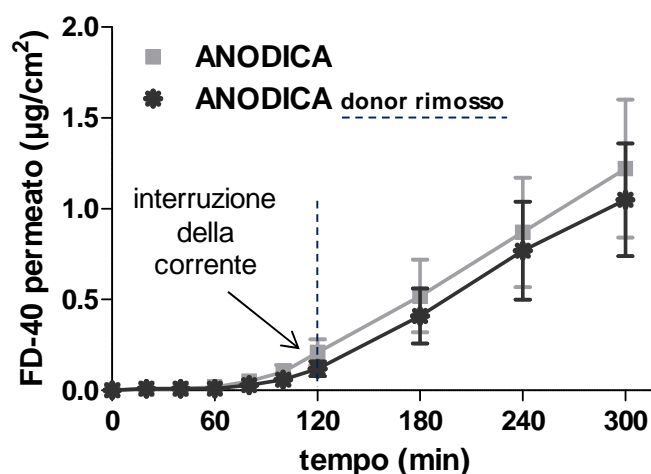


Figura 24. Profili ionoforetici di FD-40 attraverso S-CH-BM; la corrente (anodica, 2,9 mA/cm²) è stata interrotta dopo 2 ore. In un caso la soluzione donatrice è stata rimossa dopo 2 ore

Ciò indica che la diffusione di FD-40 nella fase post-ionoforetica dipende dal destrano precedentemente accumulato nella membrana. Tale “effetto reservoir”, probabilmente da attribuire al carattere idrofilo proprio sia dell’FD-40, sia della sclera, potrebbe rivelarsi utile nel caso di un’applicazione *in vivo*, per prolungare la promozione del trasporto anche in seguito a rimozione della corrente. Peraltro, la proprietà reservoir è evidente anche in condizioni di permeazione passiva (Figura 22), sebbene il suo effetto finale sia meno evidente.

2.1.3 Permeazione di FD-40 attraverso bulbo oculare suino intero

Allo scopo di approfondire le conoscenze relative alla permeazione trans-sclerale di molecole ad alto peso molecolare promossa dalla ionoforesi, è stato messo a punto un modello *in vitro* più complesso rispetto ai tessuti isolati, rappresentato dal bulbo oculare suino intero fresco. Nonostante tale modello sia privo della congiuntiva e non sia in grado di riprodurre le barriere dinamiche (in particolare la clearance coroidea), risulta comunque adeguato per lo studio delle barriere statiche. Il modello consente inoltre la stima della ripartizione nei tessuti oculari delle molecole depositate sulla superficie sclerale. Infatti, attraverso gli esperimenti condotti sul bulbo oculare suino intero è possibile valutare non solo la quantità di FD-40 permeata attraverso la sclera,

ma anche la sua distribuzione, sia in seguito a diffusione passiva, sia come conseguenza dell'applicazione di ionoforesi anodica.

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando il sistema descritto al paragrafo 1.2.5.2; la soluzione donatrice, applicata alla superficie sclerale per trenta minuti oppure per due ore, era rappresentata da FD-40 alla concentrazione di 4 mg/ml in veicolo HEPES. Nel caso della permeazione promossa dalla ionoforesi anodica la densità di corrente era pari a $1,07 \text{ mA/cm}^2$ (intensità 4 mA).

Considerando i volumi di retina, coroide e vitreo, determinati sperimentalmente e indicati in Tabella 3, è possibile riportare i valori come concentrazione di FD-40 nei singoli tessuti. I risultati ottenuti dopo 30 minuti o 2 ore di diffusione passiva di FD-40 mostrano un gradiente di concentrazione tra coroide, retina e umore vitreo, molto più marcato tra coroide e retina ($p < 0,05$) (Figura 25).

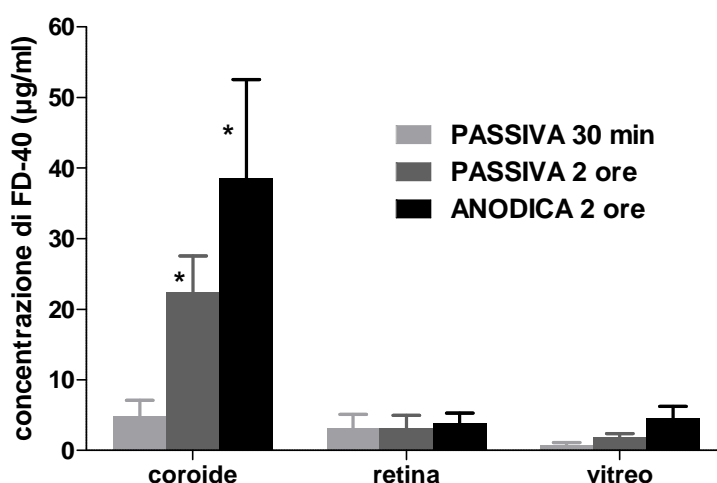


Figura 25. Concentrazione di FD-40 in coroide, retina e corpo vitreo dopo permeazione di 30 minuti o 2 ore in condizione passiva e di 2 ore in condizione ionoforetica (anodica, $1,07 \text{ mA/cm}^2$) di una soluzione a concentrazione 4 mg/ml. * statisticamente significativo dalla passiva a 30 minuti

Questa evidenza è ad ulteriore supporto dell'ipotesi, secondo la quale, il coroide costituirebbe una barriera alla permeazione molto più efficiente della sclera nei confronti delle molecole idrofile [134]. Inoltre non è completamente da escludere il contributo dell'RPE, che potrebbe esercitare un parziale ruolo attivo, dal momento che nel bulbo oculare suino esso è considerato vitale fino a 2 ore dopo l'espianto [135]. È

comunque necessario sottolineare che il modello è privo della circolazione coroidea e congiuntivale e pertanto l'accumulo di FD-40 potrebbe essere sovrastimato.

L'applicazione della ionoforesi anodica per 30 minuti non è in grado di aumentare l'accumulo di FD-40 nei tessuti, mentre se il contatto con la corrente si protrae fino a due ore si osserva un aumento dell'accumulo del destrano nel coroide e nel corpo vitreo (se paragonato all'esperimento passivo di due ore), come illustrato in Figura 26.

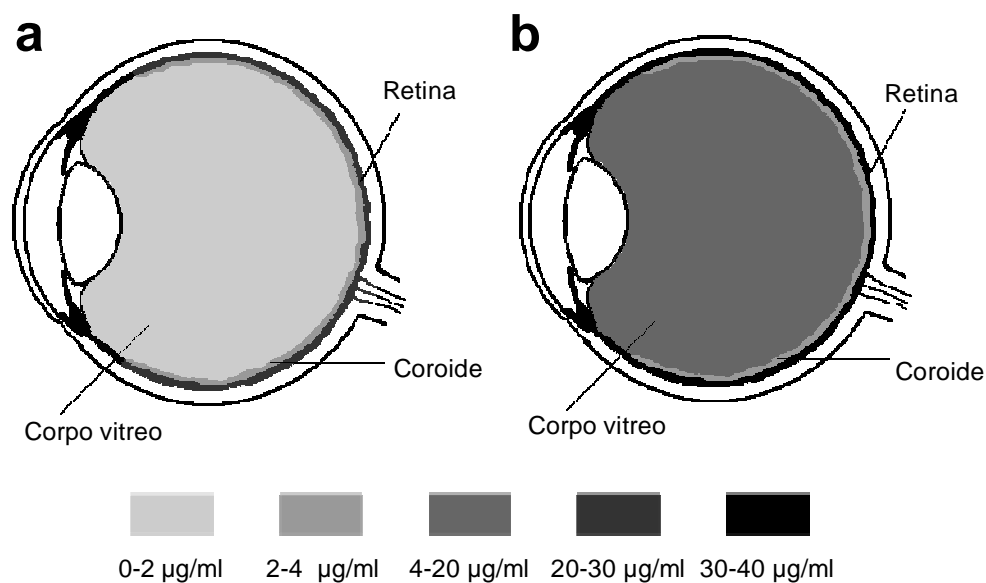


Figura 26. Concentrazione di FD-40 nei singoli tessuti oculari dopo permeazione 2 ore in condizione passiva (a) e ionoforetica (b) (anodica, 1,07 mA/cm²) di una soluzione a concentrazione 4 mg/ml

L'aumento dell'accumulo non è però in accordo con quanto osservato negli esperimenti di permeazione attraverso la sclera, dove l'Enhancement Factor, dopo due ore di applicazione della ionoforesi anodica ad una simile intensità, è pari a 9 (Tabella 11). È necessario però sottolineare che, anche se l'intensità di corrente applicata è la stessa per entrambi gli esperimenti, la densità di corrente è differente: 2,9-7 mA/cm² per la sclera isolata rispetto a 1 mA/cm² per il bulbo oculare suino intero. In letteratura la ionoforesi trans-sclerale è riportata spesso in termini di intensità di corrente applicata, sebbene la driving force sia probabilmente la densità di corrente, poiché la forza del campo elettrico dipende dalla densità di corrente stessa, come descritto nell'equazione di Nernst-Planck [136]. La scarsa efficacia della ionoforesi applicata al

bulbo oculare suino intero può quindi trovare una spiegazione nel fatto che la densità di corrente si trovi ben al di sotto della soglia individuata utilizzando la sclera, come descritto nel paragrafo 2.1.1.1.

2.2 Oligonucleotidi

Gli acidi nucleici sono caratterizzati da un elevato potenziale terapeutico, dal momento che costituiscono lo strumento della terapia genica, ma possono anche svolgere il ruolo di farmaci.

Le patologie su base genetica possono essere trattate mediante la terapia genica, che consiste nell'introduzione di materiale genetico nelle cellule bersaglio dell'organismo. L'occhio è particolarmente adatto a questo tipo di approccio terapeutico, per una serie di ragioni: principalmente perché rispetto ad altri organi è facilmente accessibile, le sue dimensioni sono contenute, ma soprattutto perché sono numerosi i geni coinvolti nelle patologie oculari. Per questa ragione attualmente ci sono svariati studi clinici in corso. La trasduzione delle cellule oculari può essere condotta sia attraverso l'uso di vettori virali, sia con vettori non virali: in questo caso il DNA può essere nudo oppure complessato con lipidi o polimeri cationici. Il materiale genetico viene introdotto nell'occhio attraverso diverse vie iniettive, in primis l'iniezione sottocongiuntivale e l'intravitreale [137].

Di notevole interesse clinico in ambito oculare, la recente introduzione di oligonucleotidi come agenti terapeutici. Alla fine degli anni novanta, infatti, è stato approvato da parte dell'FDA e dell'EMA, il fomivirsen (Vitravene™), un oligonucleotide antisense di 21 basi da somministrare per iniezione intravitreale nel trattamento delle retiniti da citomegalovirus nei pazienti con immunodeficienza acquisita [138]. Successivamente le stesse autorità regolatorie hanno autorizzato l'impiego di pegaptanib (Macugen®), un aptamero ad RNA dotato di attività anti-VEGF₁₆₅, nel trattamento della forma essudativa della degenerazione maculare senile [139].

2.2.1 *Esperimenti di permeazione attraverso sclera la bovina*

Sono stati utilizzati tre oligonucleotidi modello a singola catena, di differente lunghezza (12-mer, 24-mer e 36-mer). Gli esperimenti sono stati condotti presso i

laboratori del Centre for Drug Research dell'Università di Helsinki (Helsinki, Finlandia), utilizzando quale tessuto animale modello la sclera bovina isolata. Sono stati inizialmente condotti esperimenti di permeazione *in vitro* in condizioni passive (come indicato in Tabella 9). La sclera bovina si è dimostrata permeabile agli oligonucleotidi impiegati, come è possibile osservare dai profili di permeazione riportati in Figura 27 e dai parametri di permeazione in Tabella 12, riferiti ad esperimenti della durata di 5 ore.

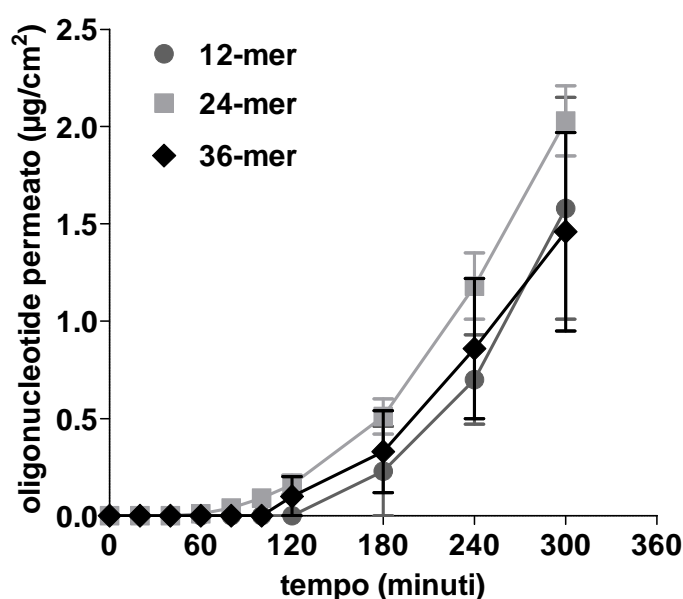


Figura 27. Profili di permeazione passiva degli oligonucleotidi attraverso la sclera bovina isolata

In tutti e tre i casi il Lag Time risulta essere superiore a 2 ore e quindi molto elevato, se per esempio viene raffrontato a macromolecole neutre come il bevacizumab (un anticorpo monoclonale con attività anti-VEGF; peso molecolare 149 kDa) ed FD-40 (destrano di peso molecolare pari a 39 kDa), per i quali il Lag Time in condizioni di permeazione passiva è rispettivamente di 30 minuti (paragrafo 2.3) e di 40 minuti (paragrafo 2.1). Ciò è probabilmente da attribuirsi alla presenza sullo scheletro degli oligonucleotidi di cariche negative (oggetto di repulsione da parte delle cariche dello stesso segno presenti nella matrice extracellulare della sclera), nonché alla diversa origine dei tessuti utilizzati.

Shuler [140] ha condotto studi di permeazione passiva *in vitro* attraverso la sclera umana isolata utilizzando un oligonucleotide a singola catena costituito da 24

basi, marcato con fluoresceina ed avente la medesima sequenza del 24-mer impiegato. Il coefficiente di permeabilità, calcolato dopo 24 ore, risulta essere pari a $(7,6\pm 1,8)\cdot 10^{-7}$ cm/s, paragonabile a quanto ottenuto in questo lavoro per la sclera bovina ($8,47\cdot 10^{-7}\pm 0,51\cdot 10^{-7}$ cm/s) e la sclera suina ($9,37\cdot 10^{-7}\pm 0,13\cdot 10^{-7}$ cm/s), dopo 5 ore di permeazione.

Tabella 12. Parametri riferiti agli esperimenti di permeazione *in vitro* degli oligonucleotidi attraverso sclera bovina isolata

	<i>Tipo di permeazione</i>	<i>J (μg/cm²h)</i>	<i>P * 10⁻⁷(cm/s)</i>	<i>Lag Time (min)</i>
12-mer	Passiva (*)	0,68±0,17	7,51±1,93	171,1±10,3
	Anodica 1,75 mA (*)	1,12±0,21	12,40±2,38	152,2±1,2
	Catodica 1,75 mA (**)	2,47±0,51	27,44±5,71	60,4±3,5
24-mer	Passiva (*)	0,76±0,05	8,47±0,51	142,8±7,5
	Anodica 1,75 mA (*)	0,83±0,14	9,27±1,58	158,4±2,1
	Anodica 3,0 mA (*)	0,62±0,18	6,93±2,00	168,5±6,3
	Catodica 1,75 mA (**)	3,04±0,77	33,80±8,56	61,8±6,7
	Catodica 3,0 mA (**)	2,07±0,68	23,00±7,60	53,4±8,9
36-mer	Passiva (*)	0,56±0,15	6,27±1,69	152,1±13,8
	Anodica 1,75 mA (*)	0,50±0,17	5,56±1,94	170,3±10,6
	Catodica 1,75 mA (**)	2,64±1,11	29,3±12,4	74,3±13,2

(*) parametri calcolati a 5 ore
(**) parametri calcolati a 2 ore

Allo scopo di valutare il possibile effetto di promozione dell'assorbimento transclerale degli oligonucleotidi stessi, sono stati condotti esperimenti di permeazione *in vitro* in presenza di ionoforesi. Come atteso, l'applicazione della ionoforesi anodica non ha determinato una promozione del trasporto rispetto alle condizioni passive, mentre l'inversione della polarità consente di promuovere in modo significativo il trasporto

attraverso la barriera (Figura 28 e Tabella 12). Tale evidenza trova spiegazione nella natura del tessuto e nelle caratteristiche degli oligonucleotidi. Infatti la sclera è un tessuto poroso e carico negativamente a pH fisiologico, per effetto della presenza di residui di glicosamminoglicani: l'applicazione di ionofresi anodica determina l'instaurarsi di un flusso convettivo di solvente (flusso elettro-osmotico) in direzione anodo-catodo. Contemporaneamente, gli oligonucleotidi presentano dei gruppi fosfato, carichi negativamente a pH 7,4 e quindi l'applicazione di ionofresi catodica ne promuove il trasporto per effetto elettrorepulsivo. Poiché gli oligonucleotidi sono carichi, l'effetto elettrorepulsivo è preponderante rispetto all'elettro-osmosi: di conseguenza è possibile osservare una promozione del trasporto solo in presenza di ionofresi catodica, mentre con la ionofresi anodica non si osserva permeazione prima delle 2 ore, analogamente alle condizioni passive.

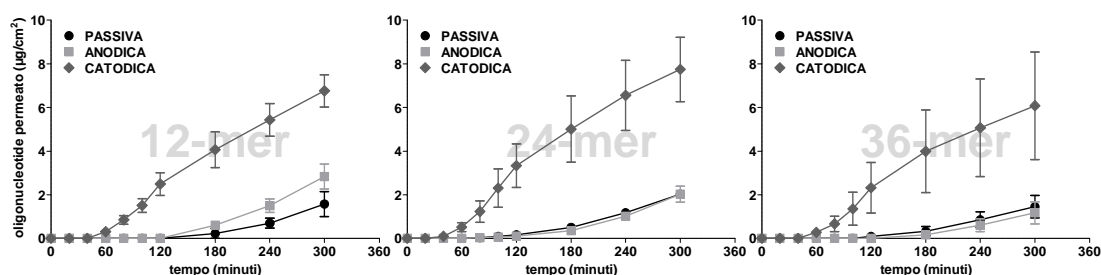


Figura 28. Profili di permeazione dei tre oligonucleotidi testati in condizioni passive e ionoforetiche ($2,9 \text{ mA/cm}^2$)

È interessante notare come non vi siano sostanziali differenze nel trasporto dei tre oligonucleotidi attraverso la sclera bovina, sia in condizioni passive, che in presenza di ionofresi anodica e catodica (Figura 28). In presenza di ionofresi, infatti, il rapporto carica/massa, driving force della permeazione, si può considerare costante per tutte e tre le sequenze. La diversità dei pesi molecolari risulta di fatto ininfluenza. Ciò può essere attribuito principalmente all'elevata porosità della sclera, ma anche alle diverse sequenze di basi che costituiscono ognuno dei tre oligonucleotidi, che può determinare l'assunzione di differenti conformazioni con conseguenti effetti sulla densità di carica superficiale, così come anche sul raggio idrodinamico. È noto infatti che la conformazione dei polielettroliti e la loro diffusività è funzione della forza ionica e della concentrazione del polielettrolita stesso [19, 20]. L'evidenza che i pesi molecolari non costituiscono un fattore discriminante per la diffusione degli oligonucleotidi

attraverso la sclera è in contrasto con i risultati riportati in letteratura e riferiti all'applicazione di ionoforesi catodica per promuovere l'assorbimento transdermico di tre oligonucleotidi, aventi lunghezza confrontabile (10-mer, 20-mer, 30-mer) a quelli utilizzati in questo lavoro. Infatti, in quel caso, il flusso in condizioni di stato stazionario risulta inversamente proporzionale alla lunghezza della sequenza oligonucleotidica [141]. È però importante sottolineare la sostanziale differenza di permeabilità dei due tessuti, che rende probabilmente ragione di questa discrepanza.

Negli esperimenti di ionoforesi catodica non è riscontrabile un "effetto reservoir", come evidenziato nel caso di macromolecole neutre quale FD-40 (paragrafo 2.1): infatti, dopo rimozione della corrente (trascorsi 120 minuti dall'inizio dell'esperimento) si osserva un'immediata riduzione della pendenza della curva (Figura 29).

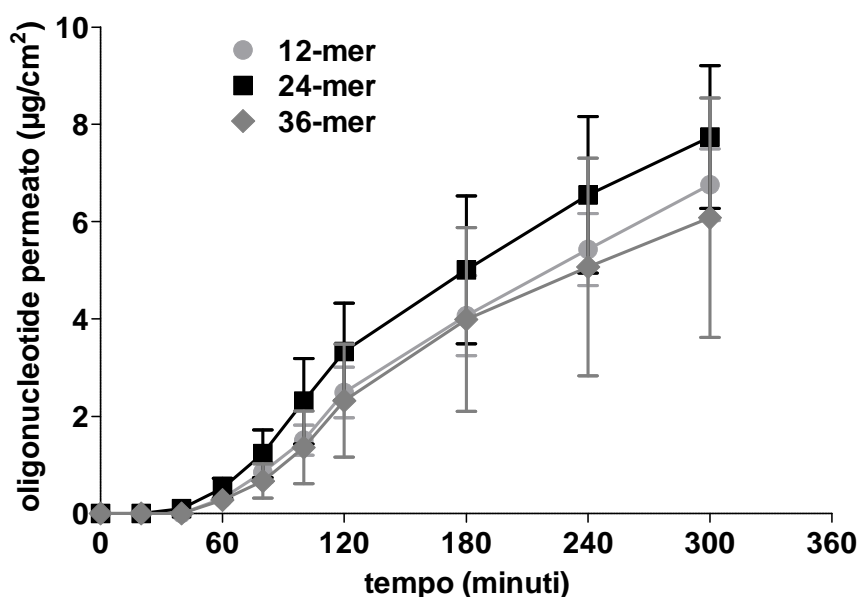


Figura 29. Profili di permeazione degli oligonucleotidi attraverso la sclera suina isolata; ionoforesi catodica, 2,9 mA/cm², applicata fino a 2 ore

Inoltre l'aumento dell'intensità di corrente applicata all'oligonucleotide di 24 basi (da 1,75 a 3 mA), non determina un incremento del suo trasporto catodico attraverso il tessuto (Figura 30a e Tabella 12): un fenomeno simile si osserva con FD-40 (paragrafo 2.1.1.1), sebbene in quel caso, il meccanismo di promozione sia di natura elettro-

osmotica, anziché elettrorepulsiva. Questo risultato è in contrasto con quanto riportato nel lavoro precedentemente citato [141], dove si osserva che il flusso catodico dell'oligonucleotide 20-mer utilizzato, risulta linearmente dipendente dalla densità della corrente applicata.

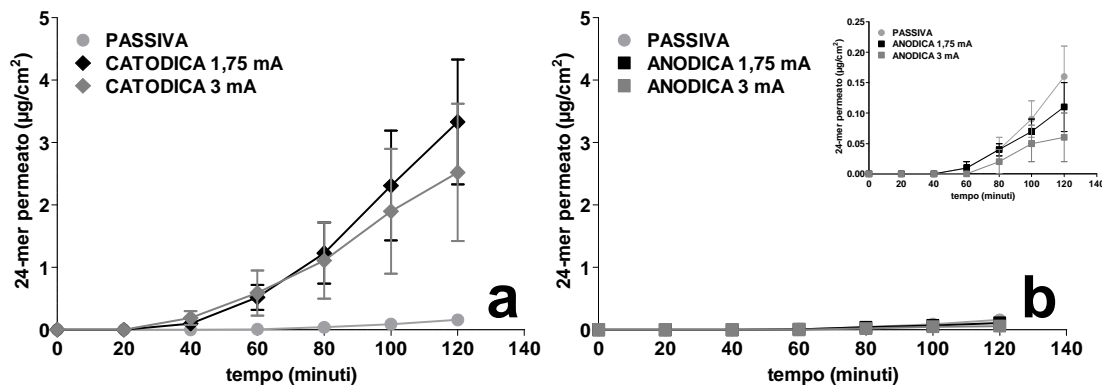


Figura 30. Profili di permeazione attraverso sclera bovina isolata dell'oligonucleotide 24-mer in presenza di ionoforesi catodica (a) e anodica (b) a due differenti intensità di corrente

Quando l'aumento di densità riguarda la ionoforesi anodica, sebbene le differenze tra i due profili non siano statisticamente significative, è possibile osservare dal grafico in Figura 30b, il seguente trend: passivo > anodico 2,9 mA/cm^2 > anodico 5 mA/cm^2 . Ciò può trovare una spiegazione nell'attrazione esercitata dall'anodo (posizionato nel compartimento donatore, ovvero a contatto con l'episclera) nei confronti delle cariche negative dell'oligonucleotide: tale attrazione è infatti proporzionale dall'intensità di corrente applicata, poiché la forza del campo elettrico dipende dalla densità di corrente stessa, come descritto nell'equazione di Nernst-Planck [136]. Il grafico riportato in Figura 30a mostra come non vi siano sostanziali differenze tra il trasporto del 24-mer alle due differenti intensità di corrente anodica ed il profilo passivo, probabilmente per effetto del flusso elettro-osmotico, che, muovendosi in direzione anodo-catodo controbilancia l'attrazione tra gli oligonucleotidi e l'anodo.

2.2.2 Confronto tra la permeabilità della sclera bovina e suina

Allo scopo di confrontare la permeabilità della sclera bovina e suina, sono stati condotti esperimenti di permeazione passiva attraverso la sclera suina isolata utilizzando quale permeante l'oligonucleotide 24-mer (le condizioni sperimentali sono riportate in Tabella 9, i parametri relativi calcolati in Tabella 13).

Tabella 13. Confronto tra i parametri riferiti agli esperimenti di permeazione passiva *in vitro* dell'oligonucleotide 24-mer attraverso sclera bovina, sclera suina pigmentata e sclera suina non pigmentata

	Sclera	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	P * 10^{-7} (cm/s)	Lag Time (min)
24-mer	Bovina	0,76 \pm 0,05	8,47 \pm 0,51	142,8 \pm 7,5
	Suina non pigmentata	2,44 \pm 0,38	27,1 \pm 4,27	129,1 \pm 1,3
	Suina pigmentata	0,84 \pm 0,01	9,37 \pm 0,13	143,3 \pm 3,1

Sono stati impiegati sia frammenti provenienti da sclera suina pigmentata, sia frammenti di tessuto non pigmentato: indipendentemente dalla presenza della melanina, i due tessuti mostrano uno spessore paragonabile, rispettivamente pari a 0,95 \pm 0,18 mm e a 0,97 \pm 0,05 mm (determinato all'equatore mediante uno spessimetro digitale). I coefficienti di permeabilità dell'oligonucleotide 24-mer (calcolati a 300 minuti) sono confrontabili nel caso della sclera bovina e della sclera suina pigmentata. Diverso invece il comportamento dell'oligonucleotide nei confronti della sclera suina non pigmentata, che si dimostra maggiormente permeabile rispetto alla sclera bovina ed alla sclera suina pigmentata, come mostrato in Figura 31.

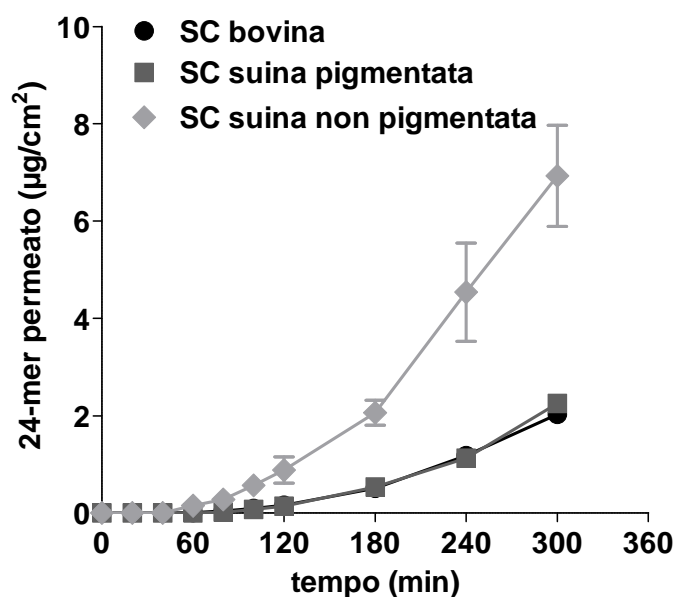


Figura 31. Profili di permeazione passiva dell'oligonucleotide 24-mer attraverso sclera bovina, suina pigmentata e suina non pigmentata

In questo caso il coefficiente di permeabilità equivale a $(27,1 \pm 4,27) \cdot 10^{-7}$ cm/s, ovvero risulta essere tre volte maggiore rispetto ai precedenti. Tale differenza risulta essere statisticamente significativa. Nonostante in letteratura sia riportata l'assenza di affinità della melanina oculare bovina e sintetica per gli oligonucleotidi [99], visto che lo spessore della sclera suina pigmentata è da considerarsi confrontabile rispetto a quello della sclera suina priva di pigmento, è possibile ipotizzare un'interazione tra l'oligonucleotide 24-mer e la melanina presente nella sclera.

Analogo comportamento non è stato tuttavia osservato con levofloxacina e propranololo, che, al contrario, in conseguenza della loro affinità per la melanina, mostrano profili di permeazione differenti a seconda che siano applicati ad un corioide pigmentato o non pigmentato (Capitolo III). Quindi, visto altresì che i dati presentati sono da considerarsi preliminari, sarà necessario indagare ulteriormente il fenomeno, allo scopo di interpretare correttamente l'evidenza sperimentale.

2.3 Bevacizumab

Il bevacizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato IgG1 dal peso molecolare di circa 149 kDa. Agisce come inibitore dell'angiogenesi in quanto previene, sia *in vitro*, sia *in vivo*, l'interazione di tutte le isoforme di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) con i recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 [142].

È il principio attivo della specialità Avastin[®], una formulazione per uso intravenoso approvata come antitumorale nel carcinoma metastatico del colon retto [143]. Il bevacizumab è oggetto di utilizzo off-label in oftalmologia nel trattamento delle malattie del segmento posteriore su base angiogenetica [144]. Attualmente la sua somministrazione avviene per iniezione intravitreale, scarsamente tollerata dai pazienti e possibile causa di complicazioni.

2.3.1 Coniugazione

Le condizioni di coniugazione del bevacizumab con FITC sono risultate critiche a causa del verificarsi di fenomeni di aggregazione del coniugato. Il rapporto molare bevacizumab:FITC di 1:20, così come l'incubazione dell'anticorpo e della molecola fluorescente in assenza di agitazione si sono dimostrate le condizioni ideali per l'ottenimento di una soluzione limpida, contenete il coniugato in concentrazione di $2,67 \pm 0,14$ mg/ml, con un rapporto FITC/bevacizumab di $0,64 \pm 0,16$.

In seguito a coniugazione la soluzione di bevacizumab-FITC in tampone PBS è stata conservata in vial di vetro borosilicato, alla temperatura di +4°C, al riparo dalla luce: in tali condizioni il coniugato si è dimostrato stabile per alcuni mesi.

2.3.2 Stabilità dei coniugati

Thin Layer Chromatography (TLC)

La cromatografia su strato sottile è stata utilizzata per valutare la stabilità del coniugato formato da anticorpo e fluoresceina isotiocianato. Lo sviluppo delle lastre cromatografiche ha mostrato come quest'ultima, in forma libera, migri lungo la lastrina, con un fattore di ritenzione R_f (calcolato come rapporto tra la distanza percorsa dall'analita e la distanza percorsa dal fronte del solvente) pari a 0,85, mentre il coniugato bevacizumab-FITC rimanga in corrispondenza del sito di deposizione, in tutti

i casi testati. Ciò vale a dire che il prodotto di coniugazione è efficientemente purificato mediante cromatografia di esclusione dimensionale e rimane stabile anche dopo gli esperimenti di permeazione, compresi quelli condotti in presenza di ionofresi.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Poiché la principale via degradativa del bevacizumab è rappresentata dalla formazione di aggregati e di varianti con un differente punto isoelettrico [142], sono stati determinati sia la dimensione, sia il potenziale zeta prima e dopo applicazione della corrente (Tabella 14). Il diametro effettivo del bevacizumab è risultato essere di $15,1 \pm 0,1$ nm, mentre il suo potenziale zeta corrisponde a $-3,32 \pm 0,87$ mV: l'applicazione della corrente non comporta sostanziali modifiche dei due parametri.

Tabella 14. Risultati ottenuti dall'analisi del bevacizumab mediante Dynamic Light Scattering

<i>Campione</i>	<i>Indice di polidispersità</i>	<i>Diametro effettivo (nm)</i>	<i>Potenziale Zeta (mV)</i>
bevacizumab	0,19	$15,1 \pm 0,1$	$-3,32 \pm 0,87$
bevacizumab dopo due ore di applicazione della corrente (intensità 2,1 mA)	0,18	$14,9 \pm 0,3$	$-4,67 \pm 1,14$
bevacizumab-FITC	0,22	$19,6 \pm 0,9$	-*
* non determinato			

Nel caso del coniugato bevacizumab-FITC è stato riscontrato un modesto incremento del diametro effettivo ($19,6 \pm 0,9$ nm) rispetto all'anticorpo come tale: questo incremento, tuttavia, può essere considerato trascurabile. Sfortunatamente non è stato possibile determinare il suo potenziale zeta, dal momento che la procedura di coniugazione utilizzata non permette di ottenere una soluzione sufficientemente concentrata.

2.3.3 Esperimenti di permeazione attraverso sclera umana isolata

Gli esperimenti di permeazione *in vitro* sono stati condotti utilizzando sclere umane decongelate, poiché il congelamento non ne modifica la struttura [104], né

tantomeno la permeabilità [145]. Il bevacizumab, nonostante l'elevato peso molecolare, si è dimostrato in grado di diffondere attraverso la sclera umana *in vitro*. Il coefficiente di permeabilità (riportato insieme agli altri parametri di permeazione in Tabella 15) è risultato pari a $(0,53 \pm 0,73) \cdot 10^{-6}$ cm/s, inferiore rispetto a quanto riportato per un IgG modello attraverso la sclera di coniglio ($0,53 \cdot 10^{-6} \pm 0,73 \cdot 10^{-6}$ cm/s) [129], in accordo con le differenze di spessore dei due tessuti.

Tabella 15. Parametri di permeazione di bevacizumab-FITC attraverso la sclera umana isolata

<i>Condizioni di Permeazione</i>	<i>J (µg/cm²h)</i>	<i>P*10⁶(cm/s)</i>	<i>Enhancement Factor</i>
Passiva	4,92±6,73	0,53±0,73	-
Anodica	37,01±9,37*	4,02±1,02*	7,5±1,9
Catodica	3,17±3,38	0,34±0,36	0,7±0,6

*differenza statisticamente significativa (p<0,01) rispetto al passivo

In seguito è stato valutato il trasporto trans-sclerale di bevacizumab-FITC in presenza di ionofresi ad intensità di 2,3 mA (densità 3,8 mA/cm²). Mentre la ionofresi catodica non è stata in grado di promuovere il trasporto del bevacizumab rispetto alle condizioni di diffusione passiva, la ionofresi anodica ne determina un significativo aumento di flusso, come è evidente dalla Figura 32. L'Enhancement Factor, calcolato come rapporto tra il coefficiente di permeabilità in condizioni anodiche ed il corrispondente in condizioni passive, è circa 8. Poiché il bevacizumab può essere considerato sostanzialmente neutro (il potenziale zeta riportato in Tabella 14 e determinato mediante DLS, è negativo ma sostanzialmente prossimo a zero), ne consegue che l'unico meccanismo responsabile della promozione del trasporto trans-sclerale è l'elettro-osmosi, analogamente a quanto osservato per FD-40 (paragrafo 2.1).

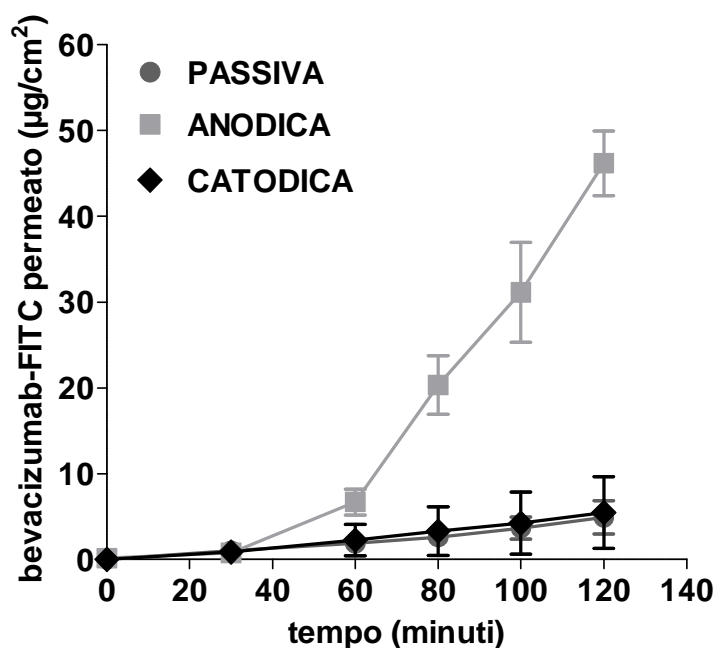


Figura 32. Profili di permeazione *in vitro* di bevacizumab-FITC attraverso sclera umana isolata

I risultati ottenuti sono indubbiamente promettenti, anche se la ionoforesi richiede circa 1 ora di tempo perché sia riscontrabile una promozione del trasporto attraverso la sclera. Per avere maggiori informazioni relativamente alla cinetica del processo, sono stati condotti esperimenti di permeazione della durata di 30 minuti ed il tessuto è stato analizzato mediante microscopia a fluorescenza. Le sezioni verticali di sclera mostrano come, a seguito di diffusione passiva, il bevacizumab si concentri principalmente nella parte esterna della sclera (Figura 33a), mentre in presenza di ionoforesi anodica, la sua diffusione interessa strati più profondi del tessuto (Figura 33b): ciò ad indicare l'efficacia della metodica già dopo 30 minuti dal momento dell'applicazione.

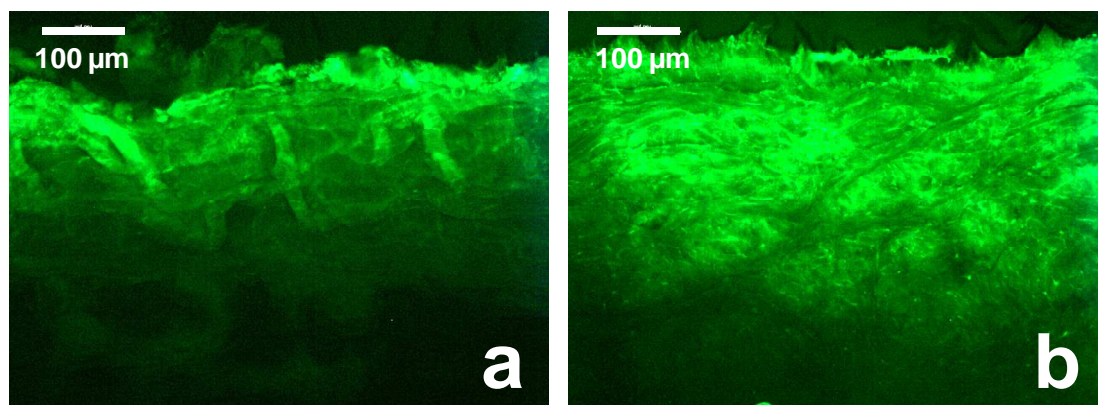


Figura 33. Microscopia a fluorescenza: sezioni verticali della sclera umana trattate per 30 minuti con bevacizumab-FITC (2,67 mg/ml) in condizioni passive (a) e di ionoforesi anodica 3,8 mA/cm² (b)

3 CONCLUSIONI della SECONDA PARTE

La seconda parte del lavoro è stata incentrata sulla valutazione della ionoforesi trans-sclerale come possibile approccio terapeutico non invasivo per il trattamento delle patologie del segmento posteriore dell'occhio. Dal momento che un numero consistente di farmaci, impiegati in terapia o in fase di studio, è rappresentata da macromolecole di origine biotecnologica, sono stati selezionati quali composti modello di riferimento un destrano neutro di 39 kDa, tre oligonucleotidi a catena singola di differente lunghezza (12-mer, 24-mer e 36-mer), aventi un peso molecolare compreso tra 4 e 11 kDa ed un anticorpo monoclonale di 149 kDa. Sono stati condotti esperimenti *in vitro* basati sull'impiego di tessuti oculari animali e umani, per valutare la capacità dei composti selezionati di permeare la sclera e le altre barriere, quali coroide e membrana di Bruch. Successivamente è stato studiato l'effetto di promozione del trasporto delle stesse macromolecole da parte della ionoforesi trans-sclerale. La sclera, e più in generale, il tri-strato formato da sclera, coroide e membrana di Bruch si sono dimostrati permeabili nei confronti dei composti testati, sebbene il doppio strato uveale sia caratterizzato da significative proprietà di barriera, specie nei confronti di composti idrofili.

L'applicazione della ionoforesi trans-sclerale ha determinato la promozione del trasporto di tutte le macromolecole testate; ciò è stato possibile grazie a due distinti meccanismi, l'elettrorepulsivo e l'elettro-osmotico. Il primo basa la sua driving force sulla repulsione tra le cariche di segno opposto e quindi si osserva nel caso di composti che possiedono cariche sulla loro superficie, come nel caso degli oligonucleotidi. Il meccanismo elettro-osmotico dipende invece dalla membrana e più precisamente dalla porosità e dalla presenza di cariche nel tessuto, e consente di promuovere il trasporto anche di molecole neutre, come il destrano e l'anticorpo. L'effetto di promozione risulta fortemente influenzato non solo dalle proprietà chimico-fisiche dei permeanti e dalle caratteristiche della sclera, ma anche dai fattori formulativi, così come dalle condizioni ionoforetiche impiegate. La sclera, infine, ha dimostrato di possedere un ruolo di reservoir nei confronti di farmaci idrofili.

Sebbene sia necessario indagare ulteriormente i meccanismi sottesi alla ionoforesi trans-sclerale, soprattutto allo scopo di ottimizzarne le condizioni di

applicazione in vista di un suo impiego *in vivo*, dai risultati conseguiti risulta evidente come l'approccio ionoforetico debba essere considerato a pieno titolo quale possibile strategia non invasiva nel trattamento delle patologie del segmento posteriore dell'occhio.

CAPITOLO V

TERZA PARTE

Questa parte del lavoro di ricerca ha riguardato la valutazione di idrogel come piattaforma per il rilascio controllato di farmaci indotto dalla ionoforesi, destinati all'applicazione oculare. Sono stati individuati, quali polimeri di riferimento, alginato di sodio e agarosio, entrambi biocompatibili e proposti per applicazione oftalmica.

La preparazione e caratterizzazione degli idrogel ha preceduto lo studio del rilascio regolato dalla ionoforesi dell'albumina, scelta come macromolecola modello. Inoltre è stata determinata la permeazione attraverso la sclera suina del composto modello contenuto nell'idrogel, come conseguenza dell'applicazione della corrente all'idrogel stesso.

1 MATERIALI e METODI

1.1 MATERIALI

- FD-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): fluoresceina isotiocianato-destrano, peso molecolare 39 kDa; grado di sostituzione 0,007 moli di FITC/moli di glucosio; raggio di Stokes 4,5 nm; solubilità in acqua 50 mg/ml; lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione della fluoresceina isotiocianato coniugata, rispettivamente 490 e 520 nm.
- BSA-FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): albumina bovina coniugata con fluoresceina isotiocianato, peso molecolare dell'albumina 66 kDa; grado di sostituzione 11 moli di FITC/moli di albumina; raggio di Stokes 3,48 nm; pI 4,6 [146]; carica netta della molecola a pH 7 pari a -17 in KCl 0,15M e a -10 in KCl 0,01M [147]; lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione della fluoresceina isotiocianato coniugata, rispettivamente 490 e 520 nm.
- Alginato di sodio, low viscosity (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): copolimero naturale a blocchi estratto da alghe brune e formato da un numero variabile di

- residui di acido β -D-mannuronico ed α -L-guluronico, uniti attraverso un legame 1,4; viscosità della soluzione 2% a 25°C pari a 250 cps.
- Agarosio, electrophoresis grade (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, Usa): copolimero naturale alternato di β -D-galattosio e 3,6- α -L-galattosio anidro legati con legame 1,4,; temperatura di gelificazione della soluzione 1% compresa tra 36° e 42°C; EEO (flusso elettro-endo-osmotico) 0,10-0,15.
 - Carbopol 940 (Chiesi Farmaceutici S.p.a. – Master Pharma s.r.l., Parma, Italia): acido poliacrilico (PAA). Approvato dall'FDA come eccipiente per gel destinati ad applicazione oftalmica.
 - Kollidon[®] 17PF (BASF, Switzerland): polivinilpirrolidone (PVP), peso molecolare medio 7000-11000 Da; apirogeno, impiegato come solubilizzante, agente di liofilizzazione, stabilizzante delle sospensioni in preparazioni iniettive ed oftalmiche.
 - HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil] etansolfonico, peso molecolare 238,30 g/mol; intervallo di tamponamento 6,8-8,2.
 - H₃PO₄ 85% (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): acido orto-fosforico, peso molecolare 98,0 g/mol.
 - NaOH (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): idrossido di sodio, peso molecolare 39,997 g/mol.
 - NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia): cloruro di sodio, peso molecolare 58,44 g/mol.
 - KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): cloruro di potassio, peso molecolare 74,55 g/mol.
 - KH₂PO₄ anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa): fosfato di potassio monobasico, peso molecolare 136,09 g/mol.
 - Na₂HPO₄·12H₂O (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): fosfato di sodio dibasico dodecaidrato, peso molecolare 358,14 g/mol (peso molecolare del sale anidro 141,96 g/mol)
 - CaCl₂ (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia): cloruro di calcio, peso molecolare 110,99 g/mol.

- Citrato di sodio bi-idrato (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia): peso molecolare 294,10 g/mol (peso molecolare del sale anidro 258,12 g/mol).
- Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa).

1.1.1 Soluzioni tampone

- Tampone HEPES, costituito da hepes (acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil] etansolfonico; Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa) 25 mM e NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia) 9 g/l, disciolti in acqua demineralizzata; la soluzione viene portata a pH 7,4 con NaOH (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 5M.
- Tampone PBS (Phosphate Buffered Saline), costituito da KH_2PO_4 anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, Usa) 0,19 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba reagenti, Milano, Italia) 5,98 g/l e NaCl (Acef s.p.a., Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia) 8,8 g/l disciolti in acqua demineralizzata; la soluzione viene portata a pH 7,4 con H_3PO_4 85% (Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia).

1.2 METODI

1.2.1 Preparazione degli idrogel

Alginato di sodio

L'alginato di sodio è stato idratato in PBS pH 7,4 per l'ottenimento di soluzioni a tre differenti concentrazioni (1-2-3% p/p). Successivamente alla completa idratazione del polimero la soluzione di alginato di sodio è stata versata in uno stampo di vetro (larghezza 2,0 cm, lunghezza 7,3 cm e profondità 1 mm) e la gelificazione è stata indotta mediante nebulizzazione dell'agente gelificante, rappresentato da CaCl_2 in soluzione alla concentrazione 0,1M. Il contatto con il gelificante ha avuto una durata di 60 minuti.

Il caricamento del composto modello FD-40 è stato effettuato sia prima, sia dopo gelificazione. Nel primo caso l'alginato di sodio è stato idratato in una soluzione di FD-40 alla concentrazione di 0,5 e 1 mg/ml in tampone PBS pH 7,4; nel secondo caso il

film è stato immerso per 60 minuti in una soluzione di FD-40 in acqua a concentrazione 1 mg/ml. Per la determinazione del titolo i dispositivi sono stati immersi in PBS pH 7,4 oppure in una soluzione di citrato di sodio 0,1M fino a completa dissoluzione.

Agarosio

L'agarosio, in concentrazione 1% p/p, è stato disperso a temperatura ambiente in una soluzione di NaCl 0,2% p/v (quantità finale pari a 30 g o 1 g). Il successivo riscaldamento a 100°C in presenza di moderata agitazione ne ha consentito la completa idratazione. La miscela così ottenuta, raggiunta la temperatura di 40°C in condizioni di moderata agitazione, è stata trasferita in uno stampo di vetro di forma rettangolare (lunghezza 5 cm, larghezza 2,5 cm, profondità 1 mm: quantità di miscela utilizzata pari a 2 g) riscaldato alla temperatura di 37°C oppure laminata su liner di etilvinilacetato (3M Experimental Film 2 mil 4,5% EVA Film) mediante uno stenditore con spessore nominale di 0,55 mm. La gelificazione è avvenuta a temperatura ambiente.

Seguendo la medesima procedura sono stati inoltre preparati film contenenti polimeri mucoadesivi, quali carbopol 940 (concentrazione 0,1% p/p) e kollidon 17PF (concentrazione 1% p/p e 5% p/p). In questo caso l'agarosio (concentrazione finale 1% p/p) è stato disperso alternativamente in una soluzione di PVP in NaCl 0,2% p/v oppure di carbopol in NaCl 0,2% p/v.

Allo scopo di realizzare dispositivi caricati con composti modello, sia le soluzioni costituite da solo agarosio, sia quelle contenenti anche il mucoadesivo sono state preparate con il metodo precedentemente descritto, utilizzando miscele a concentrazioni doppie (2% p/p per agarosio, 0,2% per carbopol e 2%-10% p/p per PVP). Contemporaneamente è stata preparata una soluzione di BSA-FITC alla concentrazione di 20 mg/ml in NaCl 0,2 % p/v. La soluzione così ottenuta (peso 1 g) è stata scaldata a 40°C e trasferita quantitativamente nella soluzione polimerica (peso 1 g) alla medesima temperatura. Per ottenere una soluzione omogenea, la miscela finale è stata mantenuta a 40°C sotto agitazione per alcuni minuti, quindi è stata trasferita nello stampo di vetro descritto sopra.

1.2.2 Caratterizzazione degli idrogel di agarosio

I film sono stati caratterizzati in termini spessore, peso, pH, variazione di peso conseguente alla conservazione in frigorifero (temperatura +4°C), reidratibilità dopo essiccamento.

1.2.2.1 Determinazione della perdita in peso dei dispositivi

L'esperimento per valutare la perdita in peso dei dispositivi di idrogel è stato effettuato sui seguenti sistemi: agarosio; agarosio-carbopol 0,1% p/p; agarosio-PVP 1% p/p; agarosio-PVP 5% p/p. Una volta fustellati, i dischetti del diametro di 9 mm e dello spessore di circa 1 mm, sono stati sigillati singolarmente in fogli di alluminio e conservati alla temperatura di +4°C. I dispositivi sono stati pesati ogni 24 ore durante la prima settimana e ogni sette giorni nelle settimane seguenti.

1.2.2.2 Reidratazione dei dispositivi essiccati

L'esperimento per valutare la possibilità di reidratazione dei dispositivi dopo essiccamento è stato effettuato sia sui sistemi costituiti da solo agarosio (concentrazione 1% p/p), sia su quelli contenenti anche i polimeri mucoadesivi carbopol e PVP (rispettivamente alle concentrazioni di 0,1% e 1% o 5% p/p).

Sono stati fustellati dischetti di diametro 9 mm, pesati e posti a temperatura ambiente in un essiccatore contenente cloruro di calcio come agente essiccante. Dopo 48 ore i dischetti, completamente disidratati, sono stati nuovamente pesati ed immersi in un volume di NaCl 0,2% p/v, pari a quello perso durante il processo di disidratazione. Trascorse 48 ore i sistemi sono stati asciugati con carta da filtro e pesati.

Per i dispositivi sono state calcolate:

$$\% \text{ di reidratazione} = \frac{\text{peso del dispositivo reidratato}}{\text{peso iniziale del dispositivo idratato}} * 100 \quad \text{Equazione 9}$$

$$\text{rapporto di rigonfiamento} = \frac{\text{peso dispositivo reidratato} - \text{peso dispositivo disidratato}}{\text{peso dispositivo disidratato}} \quad \text{Equazione 10}$$

$$\% \text{ di acqua} = \frac{\text{peso dispositivo reidratato} - \text{peso dispositivo disidratato}}{\text{peso iniziale dispositivo idratato}} * 100 \quad \text{Equazione 11}$$

1.2.3 Esperimenti di rilascio dai dispositivi di idrogel

Gli esperimenti di rilascio *in vitro* sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticale di tipo Franz (DISA, Milano, Italia), con superficie di permeazione di 0,6 cm². Il comparto superiore è stato separato da quello inferiore mediante membrana di cellulosa rigenerata (diametro 18 mm, porosità 0,45 μm) finalizzato a supportare il dispositivo, come mostrato in Figura 34.

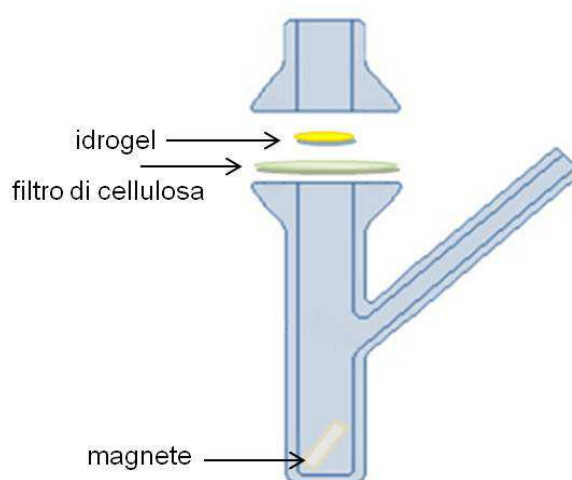


Figura 34. Schema del set-up utilizzato per l'esperimento di rilascio in condizioni passive

La membrana è stata preventivamente idratata mediante immersione per 20 minuti in acqua demineralizzata all'ebollizione. Gli esperimenti sono stati eseguiti in un bagno termostato ad una temperatura di 37°C. La soluzione ricevente era mantenuta sotto agitazione, in modo che la concentrazione fosse omogenea in tutti i suoi punti. Per monitorare il rilascio dei composti modello caricati nei dispositivi sono stati effettuati prelievi di ricevente, di volume pari a 0,3 ml, a tempi definiti, successivamente analizzati per la quantificazione.

I dispositivi di forma circolare, del diametro di 9 mm, sono stati ricavati fustellando i film caricati con il composto modello. Sono stati testati sia i sistemi a base di alginato contenenti FD-40, utilizzando PBS pH 7,4 come ricevente, sia i sistemi a

base di agarosio impiegando tampone HEPES come soluzione ricevente (Tabella 16). Sono anche stati eseguiti esperimenti per valutare la permeabilità della membrana di cellulosa rigenerata nei confronti dell'albumina in condizioni di diffusione passiva. Le condizioni sperimentali sono le medesime degli esperimenti di rilascio appena descritti; nel comparto donatore sono state poste soluzioni di BSA-FITC di concentrazione 0,5 e 15 mg/ml in tampone HEPES.

Tabella 16. Condizioni sperimentali relative al rilascio di macromolecole dagli idrogel

Composto modello	Dispositivo				Condizioni di rilascio
	Polimero base		Polimero mucoadesivo		
	Tipo	Concentrazione (% p/p)	Tipo	Concentrazione (% p/p)	
FD-40	Alginato di sodio	1	-	-	Passivo
		2	-	-	Passivo
		3	-	-	Passivo
BSA-FITC	Agarosio	1	-	-	Passivo
		1	carbopol 940	0,1	Passivo
		1	PVP	1	Passivo
		1	PVP	5	Passivo
		1	PVP	5	Passivo

Nel caso di BSA-FITC sono stati eseguiti esperimenti per valutare l'eventuale effetto di promozione del rilascio dal film di agarosio da parte di ionoforesi anodica e catodica (Tabella 16). Le celle sono state collegate ad un generatore che fornisce corrente continua e costante (Iono 1, Cosmic, Pesaro, Italia). Come anodo si è

utilizzato un elettrodo di argento, come catodo un elettrodo di cloruro di argento. Poiché è necessario evitare il contatto diretto tra BSA-FITC ed elettrodi, questi ultimi sono stati immersi in una soluzione di cloruro di potassio di concentrazione 2M, a propria volta posta a contatto con le soluzioni donatrice e ricevente mediante ponti salini, costituiti da agar al 2% p/v in cloruro di potassio a concentrazione 1M (Figura 35).

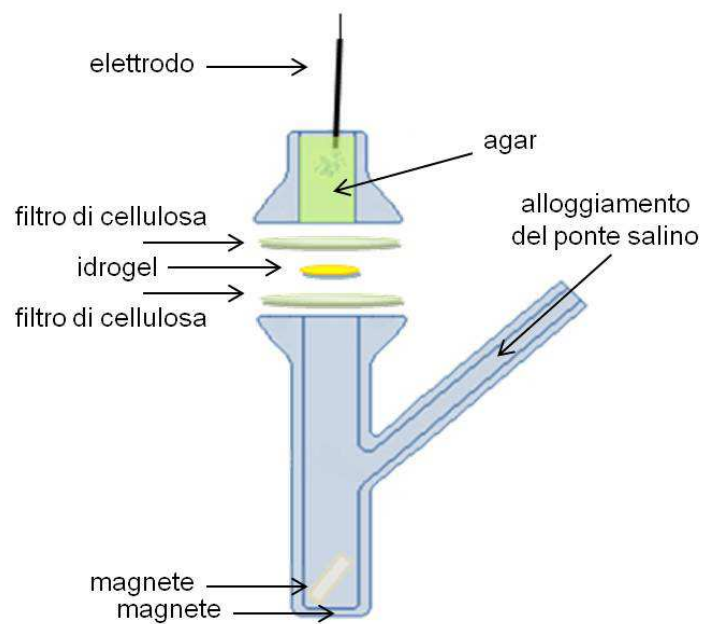


Figura 35. Schema del set-up utilizzato per l'esperimento di rilascio in condizioni ionoforetiche

È stata applicata una corrente di intensità pari a 1,75 mA (densità 2,9 mA/cm²). L'intensità di corrente è stata monitorata attraverso un amperometro (Italia HT 1100A multimeter).

1.2.4 Esperimenti di permeazione attraverso sclera suina isolata

Gli esperimenti di permeazione *in vitro* attraverso la sclera fresca, isolata dal bulbo oculare suino seguendo la procedura descritta nel paragrafo 1.2.1.1 del Capitolo III, sono stati condotti utilizzando le celle di diffusione verticale di tipo Franz con superficie di 0,6 cm², come descritto nel paragrafo 1.2.4 del Capitolo III. Nel compartimento donatore è stata posta una soluzione di BSA-FITC alla concentrazione

di 5 mg/ml in tampone HEPES oppure un dispositivo di agarosio p/p di diametro 9 mm caricato con BSA-FITC 10 mg/ml; la soluzione ricevente, in tutti i casi, è stata tampone HEPES, preventivamente degasata.

Alcuni esperimenti sono stati eseguiti per valutare il flusso in condizioni di permeazione passiva, mentre in altri si è valutato il flusso in condizioni ionoforetiche: le condizioni sperimentali sono riassunte in Tabella 17.

Tabella 17. Condizioni relative agli esperimenti di permeazione di BSA-FITC attraverso la sclera suina isolata

<i>Donor</i>	<i>Concentrazione di BSA-FITC (mg/ml)</i>	<i>Condizioni di rilascio</i>
soluzione	5	Passivo ----- Ionoforesi Anodica e Catodica 1,75 mA (densità 2,9 mA/cm ²)
dischetto di agarosio, diametro 9 mm	10	Passivo ----- Ionoforesi Anodica 1,75 mA (densità 2,9 mA/cm ²)

Negli esperimenti ionoforetici le celle sono state collegate ad un generatore che fornisce corrente continua e costante (Iono 1, Cosmic, Pesaro, I). Come anodo è stato utilizzato un elettrodo di argento, come catodo un elettrodo di cloruro di argento. Poiché il contatto diretto fra gli elettrodi ed il permeante potrebbe influenzare la stabilità di quest'ultimo, sono stati utilizzati dei ponti salini.

1.2.5 Metodo analitico per la quantificazione di FD-40 e BSA-FITC

L'analisi quantitativa di FD-40 e di BSA-FITC è stata condotta mediante fluorimetria utilizzando un rivelatore di fluorescenza serie 200A Perkin Elmer (Waltham, Usa) e RF-10AXL Shimadzu (Kyoto, Japan). La lunghezza d'onda di eccitazione della fluoresceina isotiocianato è pari a 490 nm, mentre quella di emissione è di 520 nm.

La retta di calibrazione di FD-40, compresa nell'intervallo di concentrazione tra 3,1 ng/ml e 400,0 ng/ml, è stata ottenuta analizzando soluzioni standard di FD-40 sciolto in tampone HEPES.

La retta di calibrazione di BSA-FITC, compresa nell'intervallo di concentrazione tra 0,2 µg/ml e 5,0 µg/ml, è stata ottenuta analizzando soluzioni standard di BSA-FITC sciolta in tampone HEPES.

1.2.6 Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati replicati dalle tre alle sei volte ed i risultati sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{errore standard della media (sem)}$. Le differenze statistiche sono state determinate mediante test T di Student oppure ANOVA, seguita dal test di Bonferroni, e considerate significative con $p < 0,05$.

2 **RISULTATI e DISCUSSIONE**

Con l'intento di realizzare sistemi aventi il carattere di idrogel come piattaforma per il drug delivery oculare sono stati selezionati, quali polimeri base, l'alginato di sodio e l'agarosio. Entrambi infatti, alle opportune concentrazioni, consentono di ottenere, per casting o per laminazione, film omogenei, compatti, flessibili, trasparenti ed altamente idratati, in grado di adattarsi alla forma dell'occhio e quindi potenzialmente ben tollerati. L'alginato di sodio è stato individuato come possibile candidato in virtù della sua biocompatibilità e della significativa capacità mucoadesiva [148]; analogamente all'alginato, anche l'agarosio è biocompatibile: infatti è frequentemente utilizzato per incapsulare le cellule ed ha dimostrato la sua biocompatibilità quando impiantato *in vivo* [149]. Tuttavia essendo privo di proprietà mucoadesive è stato associato al carbopol oppure al polivinilpirrolidone, due polimeri mucoadesivi ed allo stesso tempo biocompatibili, entrambi impiegati come agenti viscosizzanti in preparazioni oftalmiche liquide e, limitatamente al carbopol, anche nelle formulazioni semisolide [150].

2.1 Alginato di sodio

Nonostante la standardizzazione delle metodiche impiegate, i risultati ottenuti sia dallo studio della quantificazione di FD-40 nei dispositivi, sia dagli esperimenti di rilascio, hanno mostrato una completa assenza di riproducibilità che ha portato ad abbandonare l'uso di alginato di sodio per gli scopi prefissati.

2.2 Agarosio

Gli idrogel di agarosio ottenuti si presentano omogenei, compatti e trasparenti (Figura 36).

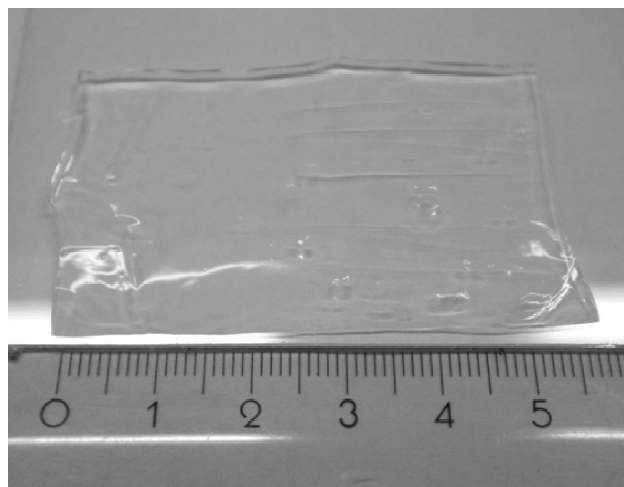


Figura 36. Film di agarosio

Lo spessore è circa 1 mm; il peso è approssimativamente 120 mg/cm² per l'agarosio, 110 mg/cm² per agarosio-carbopol 0,1%, 65 mg/cm² per agarosio-PVP 1% e 90 mg/cm² per agarosio-PVP 5%.

Caricando il dispositivo con BSA-FITC, si è ottenuto un idrogel con caratteristiche simili, ma di colore giallo (Figura 37a). Non è stato possibile determinare la concentrazione della BSA-FITC nei sistemi, a causa della difficoltà di estrazione ed analisi, peraltro riportata anche da altri autori [147]. In base alla quantità di BSA-FITC utilizzata e all'area dei dispositivi, è possibile però considerare la concentrazione di proteina pari a 1,6 mg/cm².

La quantità di BSA-FITC in ogni dischetto del diametro di 9 mm utilizzato per gli esperimenti di rilascio (Figura 37b) è pari 960 µg.

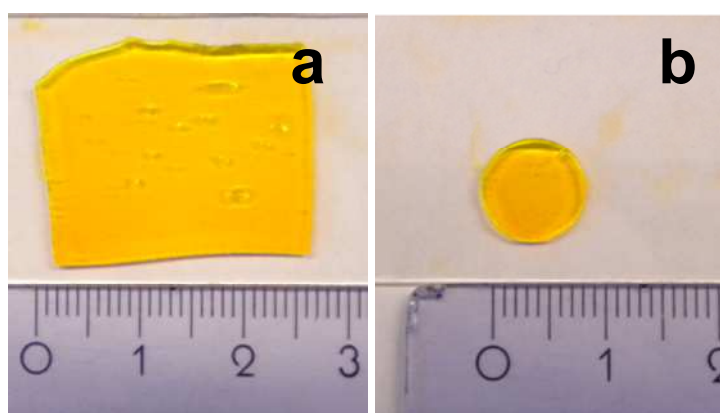


Figura 37. Film di agarosio caricato con BSA-FITC

I valori di pH di tutti gli idrogel preparati, determinati sulle miscele prima della gelificazione, sono risultati essere compresi tra 6 e 7. Tali valori sono da ritenersi accettabili, dal momento che il pH di una formulazione oftalmica deve essere il più possibile prossimo alla neutralità, per limitare l'irritazione oculare [151].

2.2.1 Perdita in peso e reidrataibilità dei dispositivi

I film polimerici formulati sono risultati essere costituiti essenzialmente di acqua (dal 94%, nel caso di agarosio-PVP 5%, al 98,9%, nel caso di agarosio-carbopol 0,1%), quindi la loro conservazione è avvenuta all'interno di un contenitore chiuso, ad una temperatura compresa tra +2 e +5°C.

Nella Figura 38 viene riportata la perdita in peso percentuale in funzione del tempo, dei dispositivi conservati alla temperatura di +4°C.

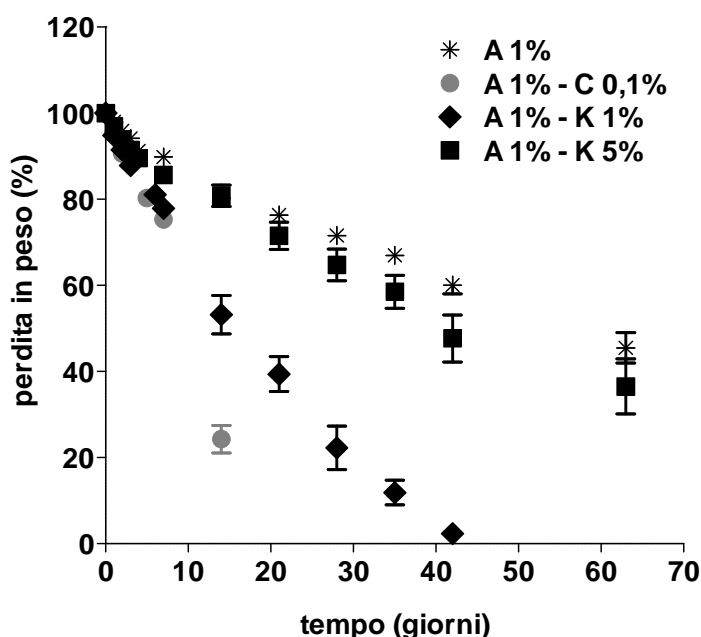


Figura 38. Perdita in peso: agarosio p/p (A1%), agarosio e carbopol 0,1% p/p (A1% - C0,1%), agarosio e PVP 1% p/p (A1% - PVP1%), agarosio e PVP 5% p/p (A1% - PVP5%)

La perdita in peso è funzione della composizione degli idrogel; come riportato in Tabella 18, la perdita percentuale in peso per giorno si riduce di un terzo nel caso dei dispositivi di agarosio-PVP 1% e della metà per agarosio e agarosio-PVP 5%. Diverso

è il comportamento dell'idrogel costituito da agarosio-carbopol 0,1%: i dispositivi mostrano una costante perdita pari al 4% del loro peso per ogni giorno, sino alla pressoché completa disidratazione che si verifica tra la terza e la quarta settimana dal momento della preparazione. È possibile inoltre osservare come la pendenza dei profili, più elevata nel corso dei primi giorni, tenda a ridursi progressivamente dopo la prima settimana.

Tabella 18. Perdita in peso %/giorno degli idrogel

<i>Polimero e relativa concentrazione</i>	<i>Perdita in peso %/giorno (giorni 1-7)</i>	<i>Perdita in peso %/giorno (dal giorno 8)</i>
agarosio1%	1,38±0,03	0,71±0,06
agarosio1%-carbopol 940 0,1%	4,00±0,35	3,81±0,29
agarosio1%-PVP 1%	2,97±0,26	1,91±0,04
agarosio1%-PVP 5%	2,03±0,22	0,92±0,10

La perdita in peso degli idrogel trova spiegazione nella necessità dei sistemi di raggiungere un equilibrio di idratazione e si manifesta con la progressiva e spontanea perdita tempo-dipendente del liquido in eccesso [152]. Tale teoria consente di spiegare almeno in parte i risultati sperimentali ottenuti dagli esperimenti di reidratazione dei dispositivi completamente essiccati. Le percentuali di reidratazione, riportate in Tabella 19, risultano sensibilmente inferiori ai volumi di acqua inizialmente presenti negli idrogel. Questo fenomeno può anche essere ascritto ad un cambiamento nella struttura dell'idrogel, conseguente all'essiccamento, che determina una riduzione nel volume di acqua che l'idrogel riesce ad assorbire. È infatti riportato che i gel di agarosio essiccati a temperatura ambiente collassano dando origine ad una struttura amorfa [153].

Tabella 19. Percentuale di reidratazione, rapporto di rigonfiamento e percentuale di acqua dei dispositivi

<i>Polimero e relativa concentrazione</i>	<i>Percentuale di reidratazione</i>	<i>Rapporto di rigonfiamento</i>	<i>Percentuale di acqua</i>
agarosio1%	15,7±1,9	11,0±1,6	91,6±1,1
agarosio1%-carbopol 940 0,1%	17,1±1,00	8,5±0,4	89,4±0,4
agarosio1%-PVP 1%	30,8±0,7	11,3±0,2	91,9±0,1
agarosio1%-PVP 5%	73,8±1,00	9,8±0,3	90,7±0,3

La reidratibilità è una caratteristica di rilevante importanza in vista dell'applicazione dei sistemi in terapia: infatti, per garantire la stabilità dei dispositivi nel tempo è ipotizzabile pensare alla loro conservazione allo stato secco fino al momento dell'utilizzo. A tale scopo sarebbe interessante valutare l'applicabilità della liofilizzazione, dal momento che è riportato in letteratura che i gel di agarosio, se sottoposti a liofilizzazione, conservano la loro porosità, assumendo la consistenza e l'aspetto del polistirolo [154].

Dai dati emerge che la presenza di PVP aumenta la percentuale di reidratazione in modo concentrazione dipendente, probabilmente perché ad alte concentrazioni riduce il collasso della struttura del gel di agarosio.

2.2.2 *Esperimenti di rilascio dai dispositivi*

Lo studio del rilascio di BSA-FITC dai dispositivi è stato effettuato sia in condizioni ionoforetiche che passive utilizzando una membrana di cellulosa rigenerata per separare il sistema dal comparto ricevente. Studi preliminari sono stati effettuati per verificare la permeabilità della BSA-FITC attraverso questa barriera a partire da soluzioni di BSA-FITC 15 mg/ml e 0,5 mg/ml in tampone HEPES 25 mM con NaCl 0,9% pH 7,4.

I risultati ottenuti (Figura 39) con la soluzione 15 mg/ml (concentrazione paragonabile a quella degli idrogel) dimostrano che la membrana non sembra ostacolare il passaggio di BSA-FITC, infatti la totalità della BSA-FITC viene rilasciata in

30 minuti. Nel caso della soluzione di BSA-FITC 0,5 mg/ml le quantità permeate sono notevolmente inferiori, ma i risultati ottenuti sono in accordo con il profilo precedente.

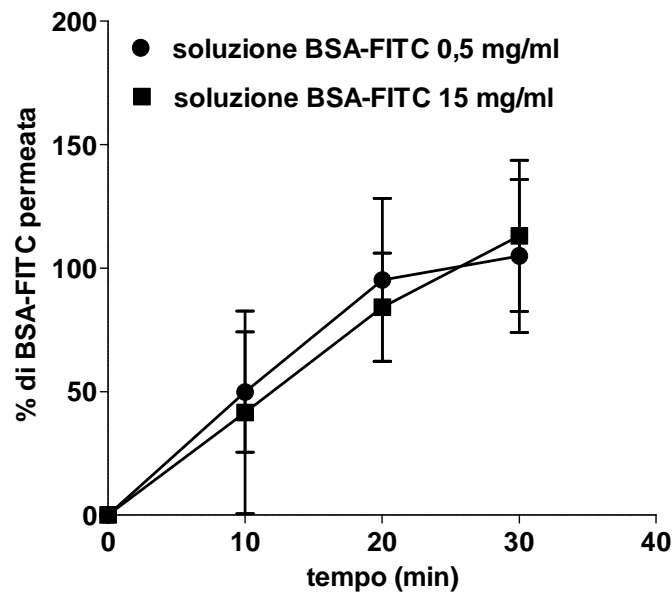


Figura 39. Percentuale di BSA-FITC permeata attraverso una membrana di cellulosa rigenerata a partire da soluzioni di 0,5 e 15 mg/ml

2.2.2.1 Rilascio passivo

È stato quindi valutato il rilascio passivo da tutti gli idrogel preparati. I profili di rilascio sono paragonabili per tutti i dispositivi (Figura 40), fatta eccezione per l'idrogel contenente PVP al 5% p/p.

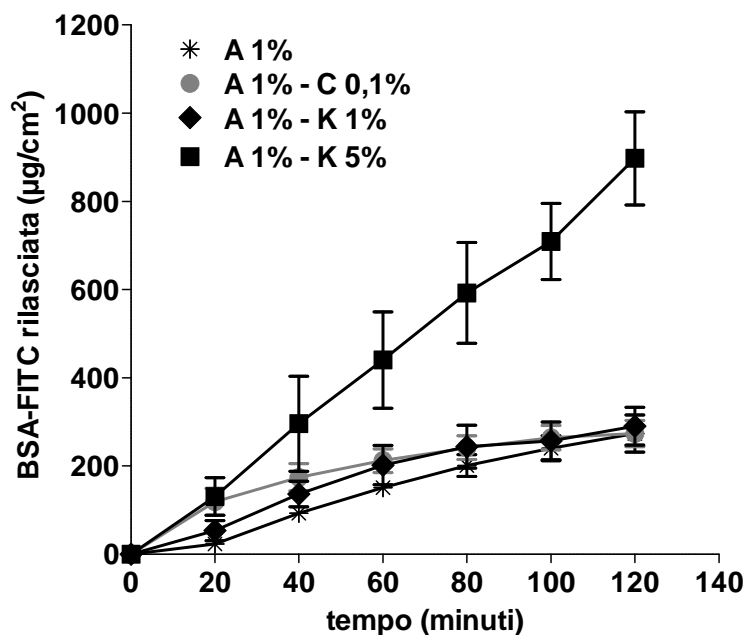


Figura 40. Rilascio passivo di BSA-FITC dai dispositivi idrogel: agarosio p/p (A1%), agarosio e carbopol 0,1% p/p (A1%-C0,1%), agarosio e PVP 1% p/p (A1%-K1%), agarosio e PVP 5% p/p (A1%-K5%)

Nel caso del gel di solo agarosio, il profilo di rilascio ricorda una cinetica di tipo matrice. Il controllo del rilascio potrebbe essere dovuto ad un'interazione tra la BSA e l'agarosio, come peraltro riportato in letteratura [155]. Relativamente all'idrogel contenente PVP al 5% p/p, la forma della curva denota un minor controllo del rilascio dell'albumina. Tale comportamento può essere spiegato dalla riduzione della interazione tra BSA-FITC ed agarosio come conseguenza della presenza del PVP. Infatti il PVP è accettore di legami idrogeno e può competere con l'albumina per il legame con l'agarosio.

2.2.2.2 Rilascio ionoforetico

I profili di rilascio di BSA-FITC da dispositivi idrogel di solo agarosio in presenza di ionoforesi sono riportati in Figura 41. È possibile osservare dopo 20 minuti un aumento della quantità rilasciata rispetto al profilo passivo, sia in condizioni anodiche, sia catodiche. Questo aumento è però seguito da un plateau, che rimane costante per le 2 ore di test.

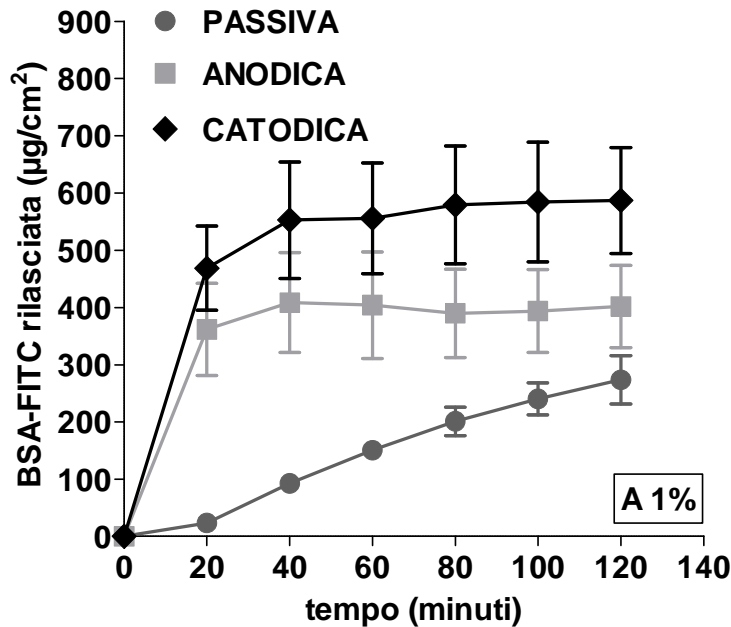


Figura 41. Profili di rilascio di BSA-FITC dal dispositivo di agarosio p/p in condizioni passive e ionoforetiche

Nell'esperimento di ionoforesi anodica l'aumento delle quantità rilasciate è imputabile all'instaurarsi di un flusso elettro-osmotico che si muove dall'anodo al catodo a causa delle cariche negative presenti sul gel. Il comportamento che si osserva in condizioni catodiche si potrebbe invece attribuire alla mobilità elettroforetica della BSA-FITC che è carica negativamente a pH 7,4 e tende dunque a migrare dal catodo all'anodo. Nonostante ciò, vanno presi in considerazione anche altri meccanismi di rilascio, che non sono strettamente legati alla BSA-FITC, quanto piuttosto all'effetto che la corrente elettrica esercita sul gel. È infatti probabile che questo comportamento, che si osserva dopo soli 20 minuti, sia dovuto principalmente alla deformazione del dispositivo indotta dalla corrente elettrica, responsabile anche del processo di deswelling [96]. Infatti in tutti gli esperimenti ionoforetici si ha una perdita in peso del dispositivo, mediamente del 50%, imputabile proprio al processo di sineresi indotto da corrente elettrica, che probabilmente espelle anche parte della BSA-FITC.

In Tabella 20 viene indicato l'Enhancement Factor a 20 minuti e a 2 ore, calcolato come il rapporto fra la quantità rilasciata in presenza di ionoforesi e la quantità rilasciata in condizioni passive.

Tabella 20. Enhancement Factor relativo alla quantità rilasciata negli esperimenti ionoforetici rispetto alla quantità rilasciata in condizioni passive da idrogel di agarosio p/p

<i>Enhancement Factor</i>	<i>20 minuti</i>	<i>120 minuti</i>
<i>Ionoforesi anodica</i>	15,3±3,4	1,5±0,3
<i>Ionoforesi catodica</i>	19,8±3,1	2,1±0,3

L'evidenza che l'EF tenda a diminuire con il passare dei minuti è dovuto ad un aumento progressivo del profilo passivo. Considerando la quantità rilasciata a 20 minuti, è interessante notare come questa rappresenti, nel caso del passivo, circa il 2% della quantità applicata, mentre, nel caso della ionoforesi, costituisca circa il 30%.

Nei dispositivi contenenti anche i mucoadesivi carbopol e PVP rispettivamente alle concentrazioni di 0,1% p/p e 1% p/p, la corrente elettrica non influenza il rilascio di BSA-FITC (test $T > 0,05$) (Figure 42-43). Teoricamente il carbopol che ha cariche negative, dovrebbe aumentare il contributo del flusso elettro-osmotico. Tuttavia vi sono dati in letteratura che dimostrano il contrario e cioè che il carbopol riduce il flusso elettro-osmotico [153]. L'evidenza che anche il contributo della ionoforesi catodica sia ininfluenza (test $T > 0,05$), rafforza l'idea che il profilo ionoforetico molto elevato che si ottiene nel dispositivo di solo agarosio, sia dovuto principalmente all'effetto della corrente sul gel (sineresi) piuttosto che sulla BSA-FITC.

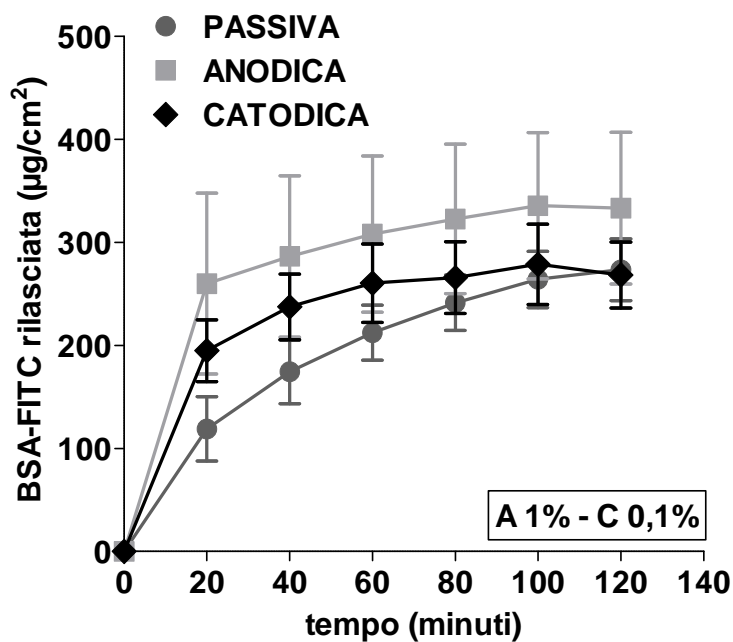


Figura 42. Profili di rilascio di BSA-FITC dal dispositivo di agarosio e carbopol 0,1% p/p in condizioni passive e ionoforetiche

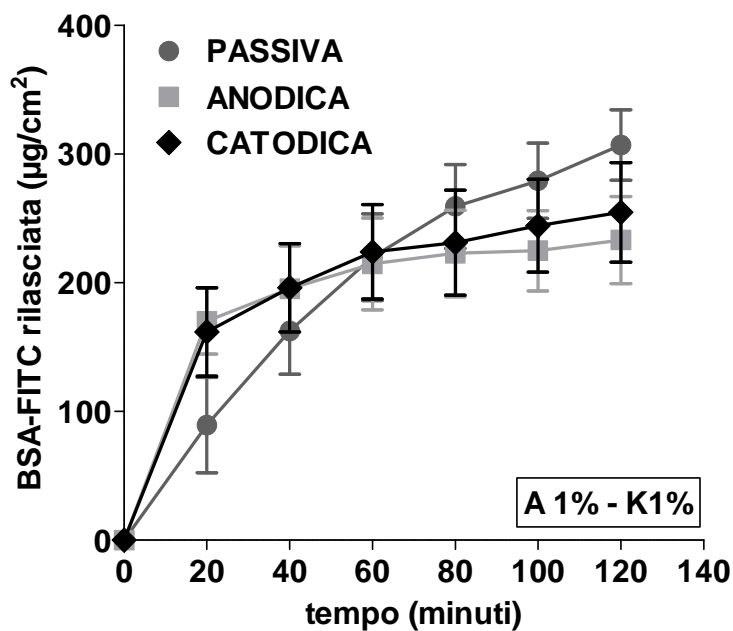


Figura 43. Profili di rilascio di BSA-FITC dal dispositivo di agarosio e PVP 1% p/p in condizioni passive e ionoforetiche

Nell'idrogel contenente anche PVP 5% p/p, la ionoforesi catodica è in grado di aumentare la quantità rilasciata a 20 minuti, con un EF pari a circa 4.

Il profilo anodico è molto elevato: dopo 20 minuti la percentuale rilasciata rappresenta circa il 50% della quantità caricata nell'idrogel. Inoltre, al contrario di quanto avveniva nel caso degli idrogel di solo agarosio, l'andamento a tempi più lunghi continua a crescere senza raggiungere mai un plateau (Figura 44). Questo andamento anomalo dimostra come il PVP non sia in grado di controllare il rilascio dell'albumina nel tempo.

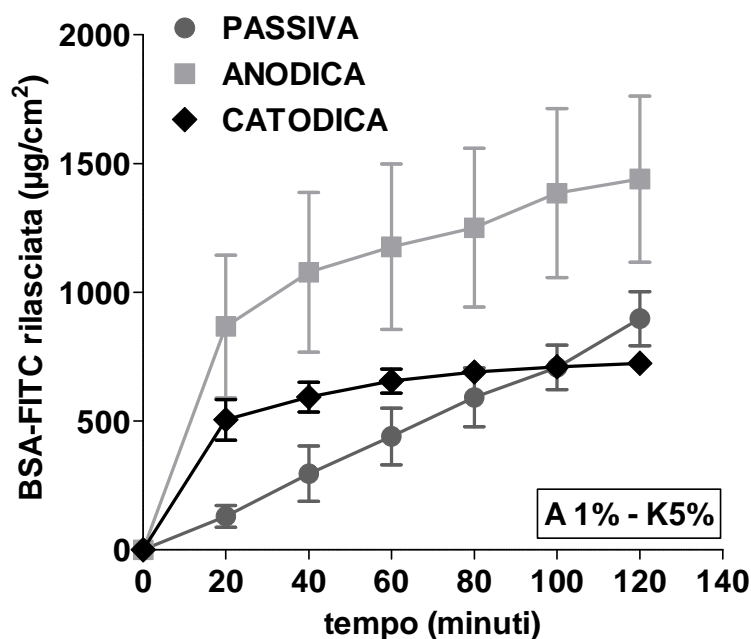


Figura 44. Profili di rilascio di BSA-FITC dal dispositivo di agarosio e PVP 5% p/p in condizioni passive e ionoforetiche

In Tabella 21 viene indicato l'Enhancement Factor dei profili ionoforetici rispetto al passivo, dopo 20 minuti e dopo 2 ore.

Tabella 21. Enhancement Factor dei profili ionoforetici rispetto al rilascio passivo da idrogel di agarosio e PVP 5% p/p

<i>Enhancement Factor</i>	<i>20 minuti</i>	<i>120 minuti</i>
<i>Ionoforesi anodica</i>	6,6±1,7	1,6±0,3
<i>Ionoforesi catodica</i>	3,9±0,6	0,8±0,1

2.2.3 Esperimenti di permeazione attraverso sclera suina isolata

I sistemi di rilascio studiati sono finalizzati all'applicazione oculare come inserti oftalmici. Per questo motivo gli esperimenti di rilascio della molecola modello BSA-FITC sono stati completati con studi di permeazione *in vitro* attraverso tessuto animale a partire dalle soluzioni di BSA-FITC in HEPES e dai dispositivi di idrogel caricati con BSA-FITC. Come tessuto animale di riferimento è stata scelta la sclera suina, che può essere considerata un modello di sclera umana per esperimenti di permeazione *in vitro* di composti a basso ed alto peso molecolare [104].

2.2.3.1 Permeazione da dose infinita

Dai risultati ottenuti, presentati in Tabella 22, si può notare che in condizioni passive BSA-FITC possiede un coefficiente di permeabilità pari a $(5,6\pm 1,8)\cdot 10^{-7}$ cm/s, paragonabile ($p=0,222$) a quello dell'FD-40 nelle medesime condizioni (pari a $(3,5\pm 1,2)\cdot 10^{-7}$ cm/s) [70].

Tabella 22. Parametri di permeazione passiva e ionoforetica di BSA-FITC attraverso sclera suina isolata

	<i>J</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	<i>P</i> (cm/s)* 10^{-7}	<i>Lag Time</i> (<i>min</i>)
<i>Passiva</i>	10,17±3,32	5,65±1,85	41,69±2,38
<i>Ionoforesi anodica</i>	4,86±1,32	2,70±0,74	38,86±9,33
<i>Ionoforesi catodica</i>	5,67±1,05	3,15±0,58	57,88±7,06

Tale evidenza può essere spiegata dalla comparabilità del raggio molecolare che è 4,5 nm nel caso di FD-40 e 3,48 nm nel caso di BSA-FITC. Infatti tale parametro,

inversamente proporzionale al coefficiente di permeabilità, è in grado di influenzare il processo di diffusione delle macromolecole più del peso molecolare delle molecole stesse [70].

I risultati ottenuti in condizioni ionoforetiche (Figura 45) dimostrano come la ionoforesi anodica non sia in grado di incrementare la permeazione di BSA-FITC in modo statisticamente significativo rispetto alla diffusione passiva (Tabella 22). Questo comportamento probabilmente è da attribuirsi alla presenza contemporanea di due fenomeni: una migrazione su base elettroforetica della BSA-FITC che è attratta verso l'anodo in virtù delle sue cariche negative e la presenza di un flusso elettro-osmotico che si muove invece in direzione anodo-catodo, opposta rispetto al movimento della BSA-FITC. Pertanto nel caso specifico della BSA-FITC l'applicazione della ionoforesi anodica non è in grado di promuovere la diffusione rispetto alla condizione passiva, come invece osservato per una molecola neutra. Il coefficiente di permeabilità per BSA-FITC è infatti pari a $(2,7 \pm 0,74) \cdot 10^{-7}$ cm/s, cinque volte inferiore a quello di FD-40 (pari a $(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$ cm/s) [70].

Il flusso che si ottiene in condizioni di ionoforesi catodica non mostra differenze statisticamente significative rispetto alla permeazione passiva ($p=0,287$) e alla ionoforesi anodica ($p=0,668$). Anche in questo caso, probabilmente, questo comportamento è da attribuirsi al fatto che effetto elettro-osmotico ed effetto elettrorepulsivo si equivalgono.

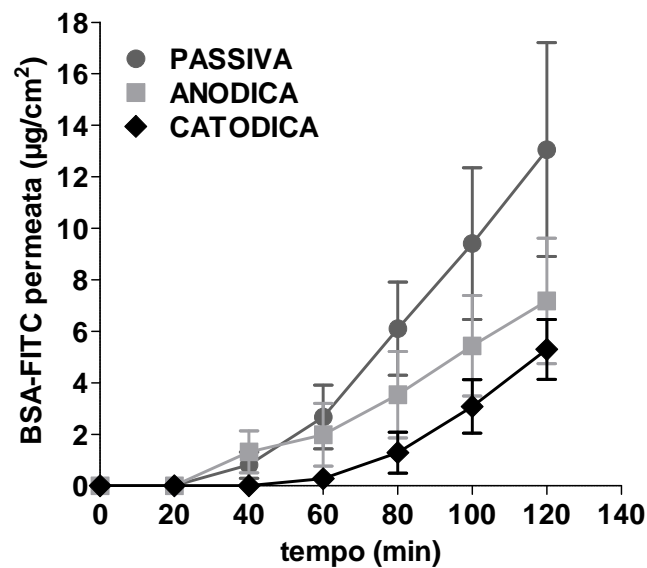


Figura 45. Profili di permeazione di BSA-FITC attraverso sclera suina fresca in condizioni passive e ionoforetiche (anodica e catodica)

Chopra [71] ha condotto un esperimento analogo utilizzando però una densità di corrente elettrica 6 volte più elevata (quindi non applicabile *in vivo* per ragioni di tollerabilità [9]) ed una durata dell'esperimento pari a 5 ore. Il risultato dimostra come, in analogia con quanto osservato in questo lavoro, dopo due ore non ci sia differenza tra gli esperimenti ionoforetici e passivi. Protraendo l'esperimento per 5 ore si ha un aumento di permeazione di BSA-FITC in presenza di corrente. La ionoforesi anodica, rispetto alla catodica, è più efficace, dimostrando che per una macromolecola il contributo del flusso elettro-osmotico è più importante dell'elettrorepulsione.

2.2.3.2 Permeazione dal dispositivo di solo agarosio

Dopo aver studiato le caratteristiche di permeabilità della sclera nei confronti della BSA-FITC in soluzione, è stata valutata la permeazione di quest'ultima caricata in un dispositivo di idrogel applicato sulla superficie della sclera stessa (Figura 46). Per questo test preliminare è stata utilizzata la miscela polimerica più semplice, priva di mucoadesivo, composta dal solo agarosio, caricato con BSA-FITC 10 mg/ml. Come visto negli esperimenti di permeazione condotti utilizzando una soluzione a dose

infinita, non si osservano differenze statisticamente significative tra le permeazioni in condizioni passive e ionoforetiche ($p=0,856$).

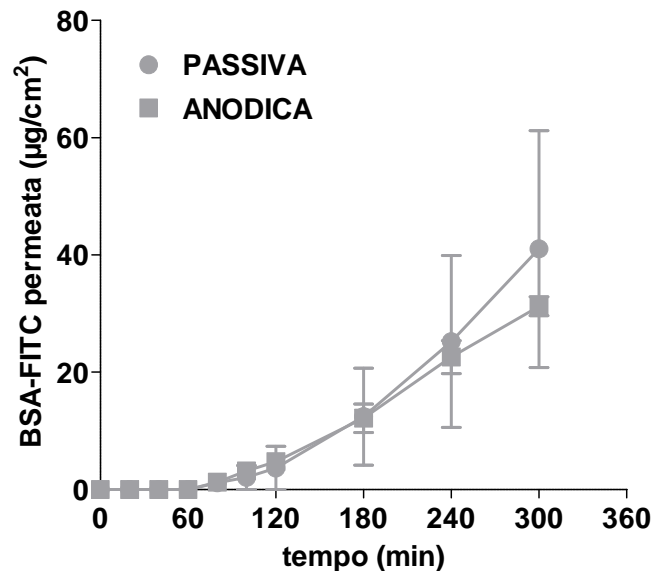


Figura 46. Permeazioni di BSA-FITC a partire da un idrogel di agarosio p/p in cui la concentrazione è 10 mg/ml (la ionoforesi anodica è stata applicata per 2 ore)

Le quantità permeate risultano inferiori rispetto alla soluzione: ciò dipende dalla capacità di controllare il rilascio da parte dell'agarosio. Viste le caratteristiche del sistema di rilascio, lo stato stazionario viene raggiunto successivamente alle 2 ore di applicazione: pertanto i parametri di permeazione riportati in Tabella 23 sono stati calcolati sulle 5 ore.

Tabella 23. Parametri di permeazione passiva e ionoforetica di BSA-FITC (rilasciata dall'idrogel) attraverso sclera suina isolata

	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	P (cm/s)* 10^{-7}	Lag Time (min)
<i>Passiva</i>	14,30±5,94	3,97±1,65	137,3±17,6
<i>Ionoforesi anodica</i>	9,51±0,43	2,64±0,12	100,3±20,9

3 CONCLUSIONI della TERZA PARTE

La terza ed ultima parte del lavoro di tesi si è concretizzata nella realizzazione e successiva valutazione di dispositivi per applicazione oculare, aventi la natura di idrogel. Questi ultimi sono costituiti da polimeri insolubili che, grazie al carattere idrofilo, possiedono la capacità di intrappolare nel loro reticolo tridimensionale grandi quantità di acqua, e si mostrano pertanto affini ai tessuti corporei. In particolare, gli idrogel sono stati presi in considerazione come potenziali piattaforme di drug delivery per il rilascio di farmaci controllato dalla ionoforesi.

L'alginato di sodio e l'agarosio sono stati selezionati come polimeri di riferimento; entrambi sono biocompatibili e, alle opportune concentrazioni, consentono la realizzazione di gel strutturati altamente idratati. Poiché l'agarosio è privo di proprietà mucoadesive intrinseche è stata valutata la possibilità di associarlo a polimeri mucoadesivi, come carbopol e polivinilpirrolidone.

L'alginato di sodio è stato immediatamente escluso a causa della mancata riproducibilità dei risultati ottenuti, nonostante la standardizzazione delle metodiche sperimentali. Gli idrogel di agarosio, contenenti o meno gli agenti mucoadesivi, sono stati caratterizzati ed in seguito caricati con albumina di siero bovino, scelta come molecola modello per farmaci ad alto peso molecolare, quali proteine e fattori di crescita. Per studiare la capacità dell'idrogel di controllare la cessione della molecola caricata in conseguenza dell'applicazione della corrente, sono stati condotti esperimenti di rilascio in condizioni ionoforetiche. I risultati, confrontati con quelli del rilascio in condizioni passive, hanno evidenziato, in linea di principio, l'effetto di promozione sul rilascio da parte della ionoforesi. Il controllo di tale effetto è risultato fortemente influenzato dalla presenza di polimeri mucoadesivi, nonché dalla loro differente concentrazione.

Anche se è necessario completare la valutazione del dispositivo con ulteriori studi sperimentali, che mirino ad individuare la migliore composizione dell'idrogel e la tipologia ottimale dell'agarosio, così come ad ottimizzare le condizioni ionoforetiche in termini di intensità, durata degli impulsi ed intervallo tra gli stessi, è possibile affermare che la ionoforesi è potenzialmente in grado di promuovere il rilascio degli attivi dagli idrogel. Dal momento che questi sistemi sono destinati all'applicazione oftalmica, sarà

indispensabile valutare un'adeguata metodica di sterilizzazione che escluda il calore, al fine di preservare la natura dell'idrogel.

CAPITOLO VI

CONCLUSIONI

La caratterizzazione dei tessuti oculari suini, permette di affermare che il bulbo oculare suino rappresenta un ottimo modello animale *in vitro* per lo studio della somministrazione trans-sclerale di farmaci. Infatti i dati sperimentali raccolti, relativi ai tessuti suini, risultano paragonabili ai corrispondenti riferiti all'uomo e riportati in letteratura.

Gli esperimenti di permeazione *in vitro* basati sull'impiego di tessuti oculari animali e umani, hanno dimostrato la capacità delle macromolecole testate di permeare la sclera e le altre barriere quali coroide e membrana di Bruch, sebbene il coroide rappresenti un significativo ostacolo, specie nei confronti dei composti idrofili. Il coroide, membrana vascolare dell'occhio, deve il suo effetto barriera sia alla componente fisiologica, ovvero alla circolazione ematica e linfatica, che a quella anatomica, cioè alla presenza della membrana di Bruch e di una significativa pigmentazione: la melanina, infatti, può giocare un ruolo non trascurabile nell'ostacolare la permeazione trans-sclerale dei farmaci nei confronti dei quali possiede affinità. Risulta quindi di fondamentale importanza l'impiego di modelli *in vitro* che, analogamente a quello messo a punto e basato sull'utilizzo di tessuti animali naturalmente pigmentati e non pigmentati, consentano la valutazione dell'eventuale interazione tra la melanina ed i farmaci somministrati per via trans-sclerale. L'applicazione al modello *in vitro* predisposto dei composti noti in letteratura per la loro affinità nei confronti della melanina ha evidenziato che la melanina rappresenta una barriera saturabile, pertanto è ipotizzabile che il suo effetto possa essere superato con somministrazione di dosi di carico oppure con somministrazioni multiple.

Il lavoro è proseguito nella valutazione della ionoforesi trans-sclerale come possibile approccio terapeutico non invasivo per il trattamento delle affezioni che colpiscono il segmento posteriore dell'occhio. Poiché i farmaci utilizzati in clinica o in

fase di studio sono in prevalenza macromolecole di origine biotecnologica, la ionoforesi è stata applicata a composti modello quali un destrano neutro di 39 kDa, tre oligonucleotidi a singola catena di differente lunghezza (12-mer, 24-mer e 36-mer) e con un peso molecolare compreso tra 4 e 11 kDa ed un anticorpo monoclonale umanizzato di 149 kDa. L'utilizzo delle sequenze oligonucleotidiche è stato possibile grazie alla collaborazione tra il Dipartimento Farmaceutico dell'Università di Parma ed il Centre for Drug Research dell'Università di Helsinki (Helsinki, Finlandia), presso il quale è stato possibile realizzare il lavoro sperimentale relativo agli oligonucleotidi stessi.

I risultati conseguiti hanno dimostrato l'abilità della ionoforesi nel favorire il trasporto di tutte le macromolecole testate; ciò è stato possibile grazie a due distinti meccanismi, l'elettrorepulsivo e l'elettro-osmotico. In particolare il meccanismo elettrorepulsivo è sfruttato dagli oligonucleotidi, carichi negativamente, durante la ionoforesi catodica; l'aumento della permeabilità dell'anticorpo monoclonale e dei destrani, entrambi sostanzialmente neutri, è invece stato ottenuto tramite la ionoforesi anodica, sfruttando l'elettro-osmosi. L'effetto di promozione risulta fortemente influenzato non solo dalle proprietà chimico-fisiche dei permeanti e dalle caratteristiche della sclera, ma anche dai fattori formulativi, quali la forza ionica del veicolo, così come anche dalla densità di corrente applicata. La sclera, infine, ha dimostrato di possedere un ruolo di reservoir nei confronti di farmaci idrofili: tale evidenza risulta di rilevante interesse, in vista di una sua applicazione *in vivo*.

Sebbene sia necessario indagare ulteriormente i meccanismi sottesi alla ionoforesi trans-sclerale, soprattutto allo scopo di ottimizzarne le condizioni di applicazione in vista di un suo impiego *in vivo*, i risultati conseguiti sono incoraggianti e permettono di affermare che l'approccio ionoforetico rappresenta una promettente strategia non invasiva nel trattamento delle patologie del segmento posteriore dell'occhio.

L'ultima parte del lavoro si è incentrata sulla preparazione e caratterizzazione di idrogel presi in considerazione come potenziali piattaforme di drug delivery per il rilascio di farmaci controllato dalla ionoforesi. Gli idrogel di agarosio sono stati caricati con albumina di siero bovino scelta come molecola modello. Esperimenti di rilascio condotti in condizioni passive e per applicazione della corrente, hanno evidenziato, in

linea di principio, l'effetto di promozione sul rilascio da parte della ionoforesi. Tale effetto è risultato fortemente influenzato dalla presenza di polimeri mucoadesivi, nonché dalla loro differente concentrazione. Quindi, anche se è necessario completare la valutazione del fenomeno con ulteriori studi sperimentali, è possibile affermare che la ionoforesi è in grado di controllare il rilascio di una proteina dagli idrogel e che tale rilascio è potenzialmente modulabile nel tempo grazie al controllo dell'intensità di corrente, della durata degli impulsi e dell'intervallo fra gli impulsi elettrici.

CAPITOLO VII

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

1. *In vitro* permeation of bevacizumab through human sclera: effect of iontophoresis application, S. Pescina, G. Ferrari, P. Govoni, C. Macaluso, C. Padula, P. Santi, S. Nicoli, J. Pharm. Pharmacol., 2010. **62**(9): p. 1189-1194.
2. Effect of formulation factors on the trans-scleral iontophoretic and post-iontophoretic transport of a 40kDa dextran *in-vitro*, S. Pescina, C. Padula, P. Santi, S. Nicoli, Eur. J. Pharm. Sci., 2011. **42**(5): p. 503-508.
3. Trans-scleral delivery of macromolecules, S. Pescina, P. Santi, G. Ferrari, S. Nicoli, Therapeutic Delivery, 2011 **2**(10): p. 1331-1349. (Review)
4. Ex vivo models to evaluate the role of ocular melanin in trans-scleral drug delivery, S. Pescina, P. Santi, P. Govoni, P. Cavallini, C. Padula, G. Ferrari, S. Nicoli, inviato per la pubblicazione alla rivista European Journal of Pharmaceutical Sciences il 07/12/2011 e attualmente in fase di revisione.

PRESENTAZIONE DEI RISULTATI A CONVEGNI E SCUOLE

1. "Trans-scleral permeation of bevacizumab: effect of iontophoresis application" S. Pescina, G. Ferrari, C. Macaluso, P. Santi, S. Nicoli, 3rd A.It.U.N. Annual Meeting Fisciano, Italy 6-7 marzo 2009
2. "Trans-scleral permeation of bevacizumab: effect of iontophoresis application" S. Nicoli, G. Ferrari, S. Pescina, C. Macaluso, P. Santi, ARVO 2009 Annual Meeting Fort Lauderdale, FL, Usa 3-7 maggio 2009
3. "*In-vitro* trans-scleral permeation of bevacizumab: effect of iontophoresis application" S. Pescina, G. Ferrari, C. Macaluso, P. Santi, S. Nicoli, ULLA Summer School 2009, Copenhagen, Denmark, 26 giugno-4 luglio 2009
4. "Trans-scleral permeation of bevacizumab: effect of iontophoresis application" S. Nicoli, G. Ferrari, S. Pescina, C. Macaluso, P. Santi, XXI Simposio ADRITELF, Cagliari, Italy 10-12 settembre 2009
5. "Iontophoretic trans-scleral permeation of high molecular weight compounds" S. Pescina, G. Ferrari, C. Macaluso, P. Santi, S. Nicoli, 4th A.It.U.N. Annual

Meeting Napoli, Italy 26-27 febbraio 2010 (presentazione orale)

6. "Iontophoresis application to enhance transscleral permeation of bevacizumab" S. Pescina, G. Ferrari, C. Macaluso, P. Santi, S. Nicoli, AFI Third Biotech Workshop "Drug delivery systems for biotech products" Pavia, Italy 24-25 marzo 2010
7. "*In vitro* model to evaluate the role of choroid-Bruch's membrane in trans-scleral drug delivery" S. Pescina, G. Ferrari, C. Macaluso, P. Santi, S. Nicoli, X Scuola Avanzata per Dottorandi di Ricerca del Settore Farmaceutico Tecnologico Applicativo, Arcavacata di Rende, Italy 12-19 settembre 2010 (presentazione orale)
8. "*In vitro* trans-scleral iontophoresis of a neutral macromolecule: effect of formulation factors" S. Pescina, G. Ferrari, P. Santi, S. Nicoli, 5th A.It.U.N. Annual Meeting, Pavia, Italy 11-12 marzo 2011
9. "*In vitro* model to study the role of melanin in transscleral drug delivery" S. Pescina, G. Ferrari, P. Santi, S. Nicoli, ARVO 2011 Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, Usa 1-5 maggio 2011
10. "Trans-scleral drug delivery: *in vitro* model to evaluate choroid-Bruch's membrane barrier properties and the role of melanin" S. Pescina, P. Santi, P. Govoni, S. Nicoli, Helsinki Drug Research 2011 Congress, Helsinki, Finland, 18-20 settembre 2011 (presentazione orale)
11. "*In vitro* trans-scleral permeation of oligonucleotides: effect of iontophoresis" S. Pescina, L. Murtomäki, M. Antopolsky, Helsinki Drug Research 2011 Congress, Helsinki, Finland, 18-20 settembre 2011
12. "Effect of iontophoresis on the release of BSA from agarose hydrogels for ophthalmic application" S. Pescina, P. Luzi, P. Santi, S. Nicoli, Workshop "Nanostructured devices for drug delivery: from small molecules to biotech drugs", CRS Italy Local Chapter, Roma, Italy 17-19 novembre 2011

CAPITOLO VIII

BIBLIOGRAFIA

1. W.H.O., *Global Initiative for the Elimination of Avoidable Blindness - action plan 2006-2011*. 2007.
2. Prentice, T. *Health, history and hard choices: funding dilemmas in a fast-changing world*. 2006 [cited 03/02/2009]; Available from: http://www.who.int/global_health_histories/seminars/presentation07.pdf.
3. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(5): p. 1047-1053.
4. Pescina, S., et al., *Trans-scleral delivery of macromolecules*. *Therapeutic Delivery*, 2011. **2**(10): p. 1331-1349.
5. Ip, M.S., et al., *Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration*. *Ophthalmology*, 2008. **115**(10): p. 1837-1846.
6. Sampat, K.M. and S.J. Garg, *Complications of intravitreal injections*. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2010. **21**(3): p. 178-183.
7. Wong, L.J., et al., *Surveillance for potential adverse events associated with the use of intravitreal bevacizumab for retinal and choroidal vascular disease*. *Retina*, 2008. **28**(8): p. 1151-1158.
8. Fintak, D.R., et al., *Incidence of endophthalmitis related to intravitreal injection of bevacizumab and ranibizumab*. *Retina*, 2008. **28**(10): p. 1395-1399.
9. Parkinson, T.M., et al., *Tolerance of ocular iontophoresis in healthy volunteers*. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2003. **19**(2): p. 145-151.
10. Hsu, J., *Drug delivery methods for posterior segment disease*. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2007. **18**: p. 235-239.
11. Del Amo, E.M. and A. Urtili, *Current and future ophthalmic drug delivery systems - A shift to the posterior segment*. *Drug Discovery Today*, 2008. **13**: p. 135-143.
12. Eljarrat-Binstock, E. and A.J. Domb, *Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery* *Journal of Controlled Release*, 2006. **110**: p. 479-489.
13. Anderson, O.A., J.W.B. Bainbridge, and D.T. Shima, *Delivery of anti-angiogenic molecular therapies for retinal disease*. *Drug Discovery Today*, 2010. **15**(7-8): p. 272-282.
14. FDA. *Eylea (afibercept)*. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=SearchedDrugDetails> 2011 [cited 25/01/2011].
15. Jiang, C., et al., *Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma*. *Molecular Vision*, 2007. **13**: p. 1783-1792.
16. Lambiase, A., et al., *Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(32): p. 13469-13474.
17. Zhang, K., et al., *Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular*

- degeneration*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(15): p. 6241-6245.
18. Fattal, E. and A. Bochot, *Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(11): p. 1203-1223.
 19. Mandel, M., *Some Properties of Polyelectrolyte Solutions and the Scaling Approach*. Polyelectrolytes Science and Technology 1993, New York: Marcel Dekker.
 20. Wang, L. and H. Yu, *Chain conformation of linear polyelectrolyte in salt solutions: sodium poly(styrenesulfonate) in potassium chloride and sodium chloride*. Macromolecules, 1988. **21**(12): p. 3498-3501.
 21. Boswell, C.A., et al., *Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics*. Bioconjugate chemistry, 2010. **21**(12): p. 2153-2163.
 22. Balboni, C.B., A. Bastianini, and al., *Anatomia umana*. terza ed, ed. Edi-Ermes. 1990.
 23. Junqueira, L.C., J. Carneiro, and R.O. Kelley, *Compendio di Istologia*, ed. Piccin. 2002. 459-474.
 24. Gerosky, D.H. and H.F. Edelhauser, *Transscleral drug delivery for posterior segment disease*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **52**: p. 37-48.
 25. Olsen, T.W., et al., *Human Sclera: Thickness and Surface Area*. American Journal of Ophthalmology, 1998: p. 237-241.
 26. Krstic, R.V., *Human Microscopic Anatomy. An Atlas for Students of Medicine and Biology*. 1991, Berlin: Springer-Verlag. 520-522.
 27. W.H.O., *International Classification of Diseases - 10th Revision*. 2010 version.
 28. Porta, M. and A. Allione, *Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy* Pharmacology & Therapeutics, 2004. **103**(2): p. 167-177.
 29. Resnikoff, S., et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bulletin of the World Health Organization, 2004. **82**(11): p. 844-851.
 30. Kourlas, H. and P. Abrams, *Ranibizumab for the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Review*. Clinical Therapeutics, 2007. **29**: p. 1850-1861.
 31. Paoletti, R., et al., *Farmacologia Oculare*. Trattato di Farmacologia e Terapia, ed. UTET. 1998, Torino.
 32. Katzung, B.G., *Farmacologia generale e clinica*, ed. Piccin. 2000, Padova.
 33. Rathore, K.S. and R.K. Nema, *Review on ocular inserts*. International Journal of Pharmtech Research, 2009. **1**(2): p. 164-169.
 34. Saettone, M.F. and L. Salminen, *Ocular inserts for topical delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**(1): p. 95-106.
 35. Karthikeyan, D., et al., *The concept of ocular inserts as drug delivery systems: An overview*. Asian Journal of Pharmaceutics 2008. **2**(4): p. 192-200.
 36. Ludwig, A., *The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(11): p. 1595-1639.
 37. Roy, S., et al., *Polymers in Mucoadhesive Drug-Delivery Systems: A Brief Note* Designed Monomers & Polymers, 2009. **12**(6): p. 483-495.
 38. Asane, G.S., et al., *Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2008. **34**(11): p. 1246-1266
 39. Baldi, F. and S. Saccà, *Le Endoftalmiti. Accorgimenti utili per evitarle*. Ottica Fisiopatologica, 2005. **2**: p. 99-111.

40. Conway, B.R., *Recent Patents on Ocular Drug Delivery Systems*. Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2008. **2**(1): p. 1-8.
41. Kim, S.H., et al., *Transport Barriers in Transscleral Drug Delivery for Retinal Diseases*. Ophthalmic Research, 2007. **39**(5): p. 244-254.
42. Forrester, J.V., *Macrophages eyed in macular degeneration*. Nature Medicine, 2003. **9**(11): p. 1350-1351.
43. Leblanc, B., et al., *Binding of drugs to eye melanin is not predictive of ocular toxicity*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 1998. **28**(2): p. 124-132.
44. Larsson, B.S., *Interaction between chemicals and melanin*. Pigment Cell Research, 1993. **6**(3): p. 127-133.
45. Pitkanen, L., et al., *Permeability of retinal pigment epithelium: effects of permeant molecular weight and lipophilicity*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005. **46**(2): p. 641-646.
46. Ito, S., *A chemist's view of melanogenesis*. Pigment Cell Research, 2003. **16**(3): p. 230-236.
47. Hill, H.Z., et al., *Melanin: A Two Edged Sword?* Pigment Cell Research, 1997. **10**(3): p. 158-161.
48. Bush, W.D., et al., *The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(40): p. 14785-14789.
49. Slominski, A., et al., *Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation*. Physiological Reviews, 2004. **84**(4): p. 1155-1228.
50. Ito, S., K. Wakamatsu, and H. Ozeki, *Chemical Analysis of Melanins and its Application to the Study of the Regulation of Melanogenesis*. Pigment Cell Research, 2000. **13**(8): p. 103-109.
51. Sarna, T. and H.A. Swartz, *The physical properties of melanin*. second ed. in The Pigment System: Physiology and Pathophysiology, ed. J.J. Nordlund, et al. 2006, Oxford: Blackwell Publishing. 311-341.
52. Herrling, T., K. Jung, and J. Fuchs, *The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair*. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 2008. **69**(5): p. 1429-1435.
53. Prota, G., et al., *Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors*. Experimental Eye Research, 1998. **67**(3): p. 293-299.
54. Wakamatsu, K., et al., *Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides*. Pigment Cell Melanoma Research, 2008. **21**(1): p. 97-105.
55. Binder, S., et al., *Transplantation of the RPE in AMD*. Progress in Retinal and Eye Research, 2007. **26**(5): p. 516-554.
56. Tardivo, J.P., et al., *Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications* Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2005. **2**(3): p. 175-191.
57. Jiang, J., et al., *Intrascleral drug delivery to the eye using hollow microneedles*. Pharmaceutical Research, 2009. **26**(2): p. 395-403.
58. Jiang, J., et al., *Coated microneedles for drug delivery to the eye*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007. **48**(9): p. 4038-4043.
59. Edwards, A. and M.R. Prausnitz, *Fiber matrix model of sclera and corneal stroma for drug delivery to the eye*. AIChE Journal, 1998. **44**(1): p. 214-225.
60. Lavon, I. and J. Kost, *Ultrasound and transdermal drug delivery*. Drug Discovery Today, 2004. **9**(15): p. 670-676.

61. Mitragotri, S. and J. Kost, *Low-frequency sonophoresis: a noninvasive method of drug delivery and diagnostics*. Biotechnology progress, 2000. **16**(3): p. 488-492.
62. Zderic, V., et al., *Ocular drug delivery using 20-kHz ultrasound*. Ultrasound in Medicine and Biology, 2002. **28**(6): p. 823-829.
63. Cheung, A.C., et al., *Ultrasound-enhanced intrascleral delivery of protein*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **401**(1-2): p. 16-24.
64. Vollmer, D.L., et al., *In vivo transscleral iontophoresis of amikacin to rabbit eyes*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 2002. **18**(6): p. 549-558.
65. Eljarrat-Binstock, E., et al., *In vitro and in vivo evaluation of carboplatin delivery to the eye using hydrogel-iontophoresis*. Current Eye Research, 2008. **33**(3): p. 269-275.
66. Eljarrat-Binstock, E., et al., *Methotrexate delivery to the eye using transscleral hydrogel iontophoresis*. Current Eye Research, 2007. **32**(7-8): p. 639-646.
67. Güngör, S., et al., *Trans-scleral iontophoretic delivery of low molecular weight therapeutics*. Journal of Controlled Release, 2010. **147**(2): p. 225-231.
68. Behar-Cohen, F.F., et al., *Transscleral Coulomb-controlled iontophoresis of methylprednisolone into the rabbit eye: influence of duration of treatment, current intensity and drug concentration on ocular tissue and fluid levels*. Experimental Eye Research, 2002. **74**(1): p. 51-59.
69. Voigt, M., et al., *Ocular aspirin distribution: a comparison of intravenous, topical and Coulomb-controlled iontophoresis administration*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002. **43**(10): p. 3299-3306.
70. Nicoli, S., et al., *In vitro transscleral iontophoresis of high molecular weight neutral compounds*. European journal of pharmaceutical sciences, 2009. **36**(4-5): p. 486-492.
71. Chopra, P., J. Hao, and S.K. Li, *Iontophoretic transport of charged macromolecules across human sclera*. International Journal of Pharmaceutics 2010. **388**(1-2): p. 107-113.
72. Davies, J.B., et al., *Delivery of several forms of DNA, DNA-RNA hybrids, and dyes across human sclera by electrical fields*. Molecular Vision, 2003. **15**(9): p. 569-578.
73. Asahara, T., et al., *Induction of Gene into the Rabbit Eye by Iontophoresis: Preliminary Report*. Japanese Journal of Ophthalmology, 2001. **45**(1): p. 31-39.
74. Voigt, M., et al., *Down-regulation of NOSII gene expression by iontophoresis of anti-sense oligonucleotide in endotoxin-induced uveitis*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **295**(2): p. 336-341.
75. Molokhia, S.A., et al., *Transscleral iontophoretic and intravitreal delivery of a macromolecule: study of ocular distribution in vivo and postmortem with MRI*. Experimental Eye Research, 2009. **88**(3): p. 418-425.
76. Bourges, J.L., et al., *Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(11): p. 1182-1202.
77. Choonara, Y.E., et al., *A review of implantable intravitreal drug delivery technologies for the treatment of posterior segment eye diseases*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **99**(5): p. 2219-2239.
78. Chiang, A. and J.A. HALLER, *Vitreoretinal disease in the coming decade*. Current Opinion in Ophthalmology, 2010. **21**(3): p. 197-202.
79. Srivastava, R. and K. Pathak, *An updated patent review on ocular drug delivery systems with potential for commercial viability*. Recent patents on drug delivery & formulation, 2011. **5**(2): p. 146-162.

80. Thrimawithana, T.R., et al., *Drug delivery to the posterior segment of the eye*. Drug Discovery Today, 2011. **16**(5-6): p. 270-277.
81. Diebold, Y. and M. Calonge, *Applications of nanoparticles in ophthalmology*. Progress in Retinal and Eye Research, 2010. **29**(6): p. 596-609.
82. Eljarrat-Binstock, E., J. Pe'er, and A.J. Domb, *New techniques for drug delivery to the posterior eye segment*. Pharmaceutical Research, 2010. **27**(4): p. 530-543.
83. Tamboli, V., G.P. Mishra, and A.K. Mitra, *Polymeric vectors for ocular gene delivery*. Therapeutic Delivery, 2011. **2**(4): p. 523-536.
84. Gaudana, R., et al., *Ocular Drug Delivery*. The AAPS Journal, 2010. **12**(3): p. 348-360.
85. Kearns, V.R. and R.L. Williams, *Drug delivery systems for the eye*. Expert review of medical devices, 2009. **6**(3): p. 277-290.
86. Kompella, U.B., R.S. Kadam, and V.H. Lee, *Recent advances in ophthalmic drug delivery*. Therapeutic Delivery, 2010. **1**(3): p. 435-456.
87. Tsui, J.Y., et al., *Subconjunctival topotecan in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008. **49**(2): p. 490-496.
88. Kang Derwent, J.J. and W.F. Mieler, *Thermoresponsive Hydrogels as a New Ocular Drug Delivery Platform to The Posterior Segment of the Eye*. Transactions of the American Ophthalmological Society, 2008. **106**: p. 206-214.
89. Rieke, E.R., et al., *Sustained subconjunctival protein delivery using a thermosetting gel delivery system*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 2010. **26**(1): p. 55-64.
90. Ambati, J., et al., *Transscleral Delivery of Bioactive Protein to the Choroid and Retina*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000. **41**: p. 1186-1191.
91. Kawashima, T., et al., *A scalable controlled-release device for transscleral drug delivery to the retina*. Biomaterials, 2011. **32**(7): p. 1950-1956.
92. Singh, P. and H.I. Maibach, *Iontophoresis in Drug Delivery: Basic Principles and Applications*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System, 1994. **11**: p. 161-213.
93. Kim, A., et al., *Convective solvent flow across the skin during iontophoresis*. Pharmaceutical research 1993. **10**(9): p. 1315-1320.
94. Fischer, G.A., *Iontophoretic drug delivery using the IOMED Phoresor system*. Expert Opinion in Drug Delivery, 2005. **2**(2): p. 391-403.
95. Peppas, N.A., et al., *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 27-46.
96. Murdan, S., *Electro-responsive drug delivery from hydrogels*. Journal of Controlled Release, 2003. **92**(1-2): p. 1-17.
97. Teichmann, K.D., *Intravitreal injections: does globe size matter?* Journal of cataract and refractive surgery, 2002. **28**(10): p. 1886-1889.
98. Donatien, P. and G. Jeffery, *Correlation between rod photoreceptor numbers and levels of ocular pigmentation*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002. **43**(4): p. 1198-1203.
99. Pitkanen, L., et al., *Binding of betaxolol, metoprolol and oligonucleotides to synthetic and bovine ocular melanin, and prediction of drug binding to melanin in human choroid-retinal pigment epithelium*. Pharmaceutical Research, 2007. **24**(11): p. 2063-2070.
100. Potts, A.M., *The reaction of uveal pigment in vitro with polycyclic compounds*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1964. **3**(4): p. 405-416.

101. Fontana, S.T. and R.F. Brubaker, *Volume and depth of the anterior chamber in the normal aging human eye*. Archives of Ophthalmology, 1980. **98**(10): p. 1803-1808.
102. Azzali, G., et al., *Anatomia del corpo umano*. terza ed, ed. CEA. 1995, Milano.
103. Ramrattan, R.S., et al., *Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1994. **35**(6): p. 2857-2864.
104. Nicoli, S., et al., *Porcine sclera as a model of human sclera for in vitro transport experiments: histology, SEM, and comparative permeability*. Molecular Vision, 2009. **15**: p. 259-266.
105. Prince, J.H., et al., *Anatomy and histology of the eye and orbit in domestic animals*. 1960, Springfield Illinois USA: Charles C. Thomas.
106. Flannery, J.G., *Transgenic animal models for the study of inherited retinal dystrophies*. ILAR Journal, 1999. **40**(2).
107. Olsen, T.W., et al., *Porcine Sclera: Thickness and Surface Area*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002. **43**(8): p. 2529-2532.
108. Crispin, S.M., *Notes on veterinary ophthalmology*. 2005, Oxford: Blackwell Science.
109. Ito, S., *Reexamination of the structure of eumelanin* Biochimica et biophysica acta, 1986. **883**(1): p. 155-161.
110. Novellino, E., et al., *Identification of cysteinyl-dopa-derived units in eumelanins from mammalian eyes*. Febs Letters, 1981. **125**(1): p. 101-103.
111. Novellino, L., A. Napolitano, and G. Prota, *Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. **1475**(3): p. 295-306.
112. Prota, G., et al., *Phaeomelanin pigments from a human melanoma*. Experientia, 1976. **32**(8): p. 970-971.
113. Buszman, E., et al., *Interaction of chlorpromazine, fluphenazine and trifluoperazine with ocular and synthetic melanin in vitro*. Die Pharmazie, 2008. **63**(5): p. 372-376.
114. Koeberle, M.J., et al., *Binding of memantine to melanin: influence of type of melanin and characteristics*. Pharmaceutical Research, 2003. **20**(10): p. 1702-1709.
115. Liu, Y. and J.D. Simon, *The Effect of Preparation Procedures on the Morphology of Melanin from the Ink Sac of Sepia officinalis*. Pigment Cell Research, 2003. **16**(1): p. 72-80.
116. Fukuda, M. and K. Sasaki, *Intraocular dynamic mode differences of new quinolone antibacterial agents between pigmented and albino rabbit eyes*. Lens and eye toxicity research, 1989. **6**(1-2): p. 339-351.
117. Tanaka, M., H. Takashina, and S. Tsutsumi, *Comparative assessment of ocular tissue distribution of drug-related radioactivity after chronic oral administration of 14C-levofloxacin and 14C-chloroquine in pigmented rats*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2004. **56**(8): p. 977-983.
118. Sauer, M.J. and S.P.L. Anderson, *In vitro and in vivo studies of drug residue accumulation in pigmented tissues*. Analyst, 1994. **119**(12): p. 2553-2556.
119. Zhang, X., J.C. Rojas, and F. Gonzales-Lima, *Methylene blue prevents neurodegeneration caused by rotenone in the retina*. Neurotoxicity Research, 2006. **9**(1): p. 47-57.
120. Realini, T., *A history of glaucoma pharmacology*. Optometry and Vision Science, 2011. **88**(1): p. 36-8.

121. Ono, C. and M. Tanaka, *Binding characteristics of fluoroquinolones to synthetic levodopa melanin*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2003. **55**(8): p. 1127-1133.
122. Hong, L. and J.D. Simon, *Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin*. Journal of Physical Chemistry B, 2007. **111**(28): p. 7938-7947.
123. EMA, *European Public Assessment Report for authorised medicinal products for human use - Avastin[®] Product Information*. Last updated 11/01/2012.
124. Vlčková, M., F. Kalman, and M.A. Schwarz, *Pharmaceutical applications of isoelectric focusing on microchip with imaged UV detection*. Journal of Chromatography A, 2008. **1181**(1-2): p. 145-152.
125. Kibbe, W.A., *OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(W43-W46).
126. The, T.H. and T.E.W. Feltkamp, *Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation*. Immunology, 1970. **18**: p. 865-873.
127. *Fluoro Tag[™] FITC Conjugation Kit - Technical Bulletin*, SIGMA-ALDRICH Inc. St. Louis USA.
128. *Quick Tag FITC Conjugation Kit - Instruction Manual*, in *For preparation of antibody-fluorescein conjugates.*, ROCHE Diagnostics Indianapolis USA.
129. Ambati, J., et al., *Diffusion of High Molecular Weight Compounds through Sclera*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000. **41**: p. 1181-1185.
130. Li, S.K., et al., *Influence of asymmetric donor-receiver ion concentration upon transscleral iontophoretic transport*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **94**(4): p. 847-860.
131. Ahuja, S. and M.I. Jimidar, *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis* Separation science and technology, ed. S. Ahuja. Vol. 9. 2008: Academic Press.
132. Tamada, J.A. and K. Comyns, *Effect of formulation factors on electroosmotic glucose transport through human skin in vivo*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **94**(8): p. 1839-1894.
133. Pikal, M.J., *The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis*. Advanced Drug Delivery Reviews 2001. **46**(1-3): p. 281-305.
134. Cheruvu, N.P.S. and U.B. Kompella, *Bovine and porcine transscleral solute transport: influence of lipophilicity and the Choroid-Bruch's layer*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. **47**(10): p. 4513-4522.
135. Kobuch, K., et al., *Maintenance of adult porcine retina and retinal pigmented epithelium in perfusion culture: characterization of an organotypic in vitro model*. Experimental Eye Research, 2008. **86**: p. 661-668.
136. Schultz, S.G., *Basic principles of membrane transport*. IUPAB Biophysics Series. 1980: Cambridge University Press.
137. Colella, P., G. Cotugno, and A. Auricchio, *Ocular gene therapy: current progress and future prospects*. Trends in molecular medicine, 2009. **15**(1): p. 23-31.
138. de Smet, M.D., C.J. Meenken, and G.J. van den Horn, *Fomivirsen – a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis*. Ocular immunology and inflammation, 1999. **7**(3-4): p. 189-198.
139. Ng, W.M., et al., *Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease*. Nature reviews. Drug discovery., 2004. **5**(2): p. 123-132.

140. Shuler, R.K., et al., *Scleral permeability of a small, single-stranded oligonucleotide*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 2004. **20**(2): p. 159-168.
141. Oldenburg, K.R., et al., *Iontophoretic delivery of oligonucleotides across full thickness hairless mouse skin*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995. **84**(8): p. 915-921.
142. EMA, *European Public Assessment Report for authorised medicinal products for human use - Avastin® Scientific Discussion - 9th Revision*. 2008.
143. FDA, *Avastin® (Bevacizumab) Final Labeling Text* 2007.
144. Sharif, N.A. and P. Klimko, *Ophthalmic agents*. Comprehensive Medicinal Chemistry II, ed. D. Triggle and J. Taylor. Vol. 6. 2006, Oxford: Elsevier. 297-320.
145. Olsen, T.W., et al., *Human scleral permeability. Effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1995. **36**(9): p. 1893-1903.
146. Chaiyasut, C. and T. Tsuda, *Isoelectric points estimation of proteins by electroosmotic flow: pH relationship using physically adsorbed proteins on silica gel*. Chromatography, 2001. **22**(2): p. 91-95.
147. Buck, K.K., et al., *The Effect of Solute Concentration on Equilibrium Partitioning in Polymeric Gels*. Journal of colloid and interface science, 2001. **234**(2): p. 400-409.
148. Gombotz, W.R. and S.F. Wee, *Protein release from alginate matrices*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. **31**(3): p. 267-285.
149. Rahfoth, B., et al., *Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits*. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 1998. **6**(1).
150. Colombo, P., et al., *Principi di tecnologie farmaceutiche*. prima ed, ed. C.E.A. 2004. 483-499.
151. Hecht, G., et al., *Design and evaluation of ophthalmic pharmaceutical products*. Modern Pharmaceutics, ed. G.S. Banker and C.T. Rhodes. 1990, New York/Basel: Marcel Dekker Inc.
152. Boral, S., A. Saxena, and H.B. Bohidar, *Syneresis in agar hydrogels* International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **46**(2): p. 232-236.
153. Hsu, C.-S. and L.H. Block, *Anionic gels as vehicles for electrically-modulated drug delivery. I. Solvent and drug transport phenomena*. Pharmaceutical Research, 1996. **13**(12): p. 1865-1870.
154. Benore-Parsons, M. and L. Anderson, *Purification of DNA fragments from lyophilized agarose gels*. Nucleic acids research, 1995. **93**(93): p. 4926-4927.
155. Lin, Y., et al., *Protein recognition via molecularly imprinted agarose gel membrane*. Journal of Biomedical Materials Research. Part A., 2008. **85**(3): p. 573-581.