



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO FARMACEUTICO

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA**

**VEICOLAZIONE DI FARMACI ANTITUMORALI
IN SISTEMI A RILASCIO CONTROLLATO
PER TERAPIE INNOVATIVE DEI TUMORI**

Relatore:

Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Coordinatore

Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Dottorando:

STEFANO BARBIERI

XIII CICLO 2008-2010

Ai miei genitori

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Le vie di somministrazione orale e parenterale	5
1.2. I farmaci antitumorali e la biodisponibilità.	7
1.3. Sistemi colloidali come vettori di farmaci antitumorali	10
1.4. Tumore al seno	15
1.4.1. Somministrazione orale di chemioterapici per il tumore al seno	17
1.4.2. Nanoparticelle per la somministrazione orale di chemioterapici	19
1.5. Microparticelle solide come veicolo delle nanoparticelle	23
1.6. I Componenti	24
1.6.1. Il Chitosano	24
1.6.2. Lecitina	26
1.6.3. Tamoxifene	26
1.6.4. Eccipienti idrofili	28
2. SCOPO DELLA RICERCA	32
3. MATERIALI E METODI	34
3.1. Materiali	34
3.1.1. Chitosano	34

3.1.2.	Lecitina	34
3.1.3.	Tamoxifene citrato	35
3.1.4.	α - ciclodestrina	36
3.1.5.	β - ciclodestrine	36
3.1.6.	Maltodestrine	37
3.1.7.	Trealosio	37
3.1.8.	Pancreatina	38
3.1.9.	Pseudomonas Lipasi	38
3.1.10.	Lisozima	38
3.1.11.	Altri reagenti	38
3.2.	Metodi	39
3.2.1.	Preparazione della soluzione metanolica di lecitina	39
3.2.2.	Preparazione della soluzione di chitosano all'1%	39
3.2.3.	Preparazione delle nanoparticelle di lecitina e chitosano	39
3.2.4.	Preparazione di NCL caricate con tamoxifene citrato	41
3.2.5.	Tecniche di analisi di sistemi colloidali	43
3.2.5.1.	Analisi dimensionale (Dinamic Light Scattering)	43
3.2.5.2.	Potenziale z (Laser Doppler Electrophoresis, Phase Analysis Light Scattering)	48
3.2.5.3.	Microscopia a trasmissione di elettroni (TEM e cryo-TEM)	54
3.2.5.4.	Microscopia a scansione di elettroni (SEM)	56
3.2.6.	Caratterizzazione delle NCL	60
3.2.6.1.	Misurazione delle dimensioni e del potenziale zeta delle particelle	60
3.2.6.2.	Preparazione dei campioni	62
3.2.6.3.	Metodo di analisi HPLC del tamoxifene citrato e 4-OH tamoxifene	63
3.2.6.4.	Determinazione della solubilità del tamoxifene citrato	66

3.2.6.5. Rilascio di farmaco dai nanosistemi NCL	67
3.2.9. Produzione di microparticelle	69
3.2.10. Preparazione di fluido gastrico simulato	72
3.2.11. Preparazione di fluido intestinale simulato	72
3.2.12. Caratterizzazione chimico fisica delle polveri	72
3.2.12.1. Distribuzione dimensionale delle polveri	73
3.2.12.2. Analisi morfologica tramite metodologia SEM	74
3.2.12.3. Determinazione quantitativa del tamoxifene nelle polveri	74
3.2.13. Rigenerazione di nanoparticelle nei fluidi biologici	75
3.2.14. Analisi di microparticelle ridisperse in fluidi biologici simulati	75
3.2.14.1. Analisi dimensionale	75
3.2.14.2. Analisi del potenziale zeta	76
3.2.15. Cultura cellulare	76
3.2.16. Studi di citotossicità	76
3.2.17. Studi d'internalizzazione cellulare dei nanosistemi con citometria di flusso e microscopia confocale	77
3.2.18. Modello di permeazione intestinale <i>ex vivo</i>	81
 4. RISULTATI E DISCUSSIONE	 86
 4.1. Nanoparticelle chitosano/lecitina	 86
4.2. NCL cariche con tamoxifene citrato: caratterizzazione	86
4.3. Determinazione della solubilità del tamoxifene citrato (TAM)	88
4.4. Rilascio di tamoxifene citrato dal sistema nanoparticellare lecitina/chitosano (NCL)	90

4.5. Rilascio di tamoxifene citrato dal sistema nanoparticellare lecitina/chitosano (NCL) a pH 7,4 (37°C) in presenza di enzimi	92
4.6. Visualizzazione della degradazione di NCL-TAM a pH 7,4 mediante TEM	99
4.7. Citotossicità MCF-7	103
4.8. Captazione ed internalizzazione nelle Caco2 dei nanosistemi NCL	104
4.9. Visualizzazione dell'internalizzazione delle nanoparticelle tramite microscopia confocale	108
4.10. Permeazione intestinale	110
4.11. Analisi del 4-OH tamoxifene trasportato attraverso il tessuto intestinale	122
4.12. Caratterizzazione delle sospensioni NCL-TAM-eccipiente per la produzione di microparticelle	128
4.12.1. Distribuzione dimensionale	128
4.12.2. Carica Superficiale	130
4.12.3. Morfologia delle nanoparticelle in sospensione	132
4.12.4. Caricamento del farmaco	135
4.13. Formulazione di polveri	138
4.13.1. Distribuzione dimensionale	140
4.13.2. Morfologia delle microparticelle	141
4.14. Rigenerazione di nanoparticelle in fluidi biologici simulati a partire delle microparticelle	143

5. CONCLUSIONI	148
6. BIBLIOGRAFIA	153

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni numerose istituzioni e moltissimi ricercatori nel mondo hanno concentrato la loro attenzione sulla cura del cancro, essendo una patologia molto diffusa a livello mondiale per la quale, nonostante i progressi, esistono poche terapie risolutive. In Italia in seguito alla diagnosi e alla cura si ha una percentuale di guarigione pari a circa il 50% dei casi: 47% degli uomini e 59% delle donne. Questi dati sono simili a quelli degli altri paesi europei dove, negli ultimi dieci anni, l'incidenza e la mortalità sono in calo.

I progressi in ambito preventivo e terapeutico, grazie alla ricerca, sono in continua crescita, ma nonostante tutto, le neoplasie rimangono la seconda causa di morte a livello dei paesi industrializzati. L'incidenza è incrementata fortemente con l'età: con l'aumento dell'aspettativa di vita infatti è in crescita il numero dei soggetti in cui compare un tumore. La maggior parte dei pazienti ha infatti un'età superiore ai 65 anni. I dati che riguardano la sopravvivenza in Italia dopo un trattamento sono analoghi a quelli europei mentre sono presentati esiti migliori se si tratta specificatamente di tumore alla mammella, laringe e stomaco [1].

Per "tumore" o "neoplasia" si intende la proliferazione incontrollata di un tessuto a seguito di mutazioni a carico delle porzioni di DNA che controllano la crescita cellulare (geni per fattori di crescita e relativi recettori, geni per trasduttori

intracellulari, geni per fattori di trascrizione nucleare). Ulteriori alterazioni possono conferire alle cellule la capacità di degradare i costituenti della lamina basale quali collagene, proteoglicani e glicosaminoglicani, di eludere la sorveglianza del sistema immunitario e di ignorare il contatto con cellule di origine tissutale diversa: in questi casi si realizzano le caratteristiche di *invasività* nei tessuti circostanti e diffusione lontano dal sito di insorgenza, tipiche del tumore “maligno” [2; 3].

L'estensione ed il grado di progressione della malattia tumorale vengono descritte, per la maggior parte dei carcinomi, dal sistema di stadiazione TNM (4) messo a punto dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Secondo questo protocollo, per caratterizzare una neoplasia devono essere definiti, tramite una accurata anamnesi e appropriate metodiche di indagine, i seguenti parametri:

- **T** indica l'estensione del tumore primario;
- **N** indica il coinvolgimento dei linfonodi;
- **M** indica la metastatizzazione a distanza.

Sulla base della designazione TNM il tumore viene classificato in uno stadio da 0 a IV. Questo tipo di caratterizzazione ha un alto valore prognostico e influenza, prima di altri fattori, il tipo di approccio terapeutico.

Il cancro è una patologia che si può presentare in due forme distinte: tumore solido o tumore del sangue.

Il tumore solido si manifesta a carico dei vari organi ed è caratterizzato da tre fasi:

1. La malattia iniziale è localizzata in un'unica sede e colpisce cellule di un organo specifico;
2. In seguito all'asportazione chirurgica della massa tumorale si può presentare una recidiva e il tumore si manifesta nella nuova sede anche a distanza di anni;
3. Dopo il trattamento chirurgico alcune cellule tumorali possono sfuggire all'asportazione distribuendosi anche in altre sedi e si manifesta la forma 'disseminata', con metastasi in altri distretti a distanza dalla sede iniziale.

Una singola cellula tumorale circondata da un tessuto sano ha una velocità di crescita maggiore rispetto alle altre cellule; una volta formatasi una piccola massa cancerosa, il tessuto sano non è più in grado di competere per l'approvvigionamento di nutrienti provenienti dal circolo sanguigno. Quando i sistemi di riparazione del danno cellulare non riescono a far fronte all'ingente crescita neoplastica portando ad apoptosi, le cellule tumorali sovrastano e distruggono i tessuti sani invadendoli per il loro rapido sviluppo. Per sostenere la propria crescita, il tumore secerne fattori che stimolano l'angiogenesi formando tessuti volti ad un'ulteriore rifornimento di nutrienti ed energia.

A seconda dell'organo interessato vi sono diversi tipi di approccio terapeutico; in generale in seguito all'asportazione chirurgica della massa si interviene con

chemioterapia e radioterapia, che agiscono come adiuvanti, per eliminare le micrometastasi e migliorare i risultati a lungo termine [4].

La radioterapia prevede l'utilizzo di radiazioni ionizzanti direzionate verso cellule tumorali per danneggiarne il DNA. Le radiazioni generano radicali liberi che agiscono sulle cellule portandole a degradazione. Il principale meccanismo di resistenza alle radiazioni è legato alla condizione d'ipossia cellulare che permette la sopravvivenza delle cellule anche a basse concentrazioni di ossigeno.

La chemioterapia impiega farmaci citotossici per impedire l'iperproliferazione delle cellule, bloccandone la divisione. In questo modo la loro normale attività viene inibita fino a causare necrosi. Tra i principali problemi della chemioterapia vi è l'incapacità del farmaco di essere selettivo e distinguere tra cellule sane e neoplastiche [3].

Da questo derivano gli effetti collaterali: il chemioterapico compromette anche cellule sane ed in particolare quelle fisiologicamente soggette a rapido ricambio, come quelle dei bulbi piliferi, mucose e midollo osseo causando caduta dei capelli, ulcere della cavità orale, diminuzione delle cellule ematiche, secchezza delle fauci, arrossamento cutaneo, nausea ed affaticamento [4-6].

1.1. Le vie di somministrazione orale e parenterale

La maggior parte dei farmaci antitumorali sono stati sviluppati e formulati per la somministrazione intravenosa, sia essa bolo o infusione prolungata, per vari motivi, i più importanti fra i quali sono l'immediata disponibilità del farmaco con rapidi effetti farmacodinamici e la possibilità di controllare la somministrazione in ragione del basso indice terapeutico di questi farmaci modificando la dose o perfino interrompendo l'infusione, se necessario [5].

In realtà la somministrazione i.v. è associata anche a diversi svantaggi che limitano la sua generale applicabilità, inclusi:

1. Approccio invasivo della via di somministrazione;
2. Rischio di infezioni catetere-correlate;
3. Potenziale trombosi ed extravasazione;
4. La presenza di materiale particolato nelle preparazioni infusionali;
5. Necessità di ospedalizzazione del paziente.

Negli ultimi anni di conseguenza vi è stato un crescente interesse verso lo sviluppo di preparazioni antitumorali somministrate in modo extravascolare che potessero essere maggiormente accettate dal paziente e ne migliorassero la qualità di vita, soprattutto nei regimi di trattamento palliativo.

In aggiunta, bisogna considerare anche fattori farmacoeconomici, che raccomandano regimi di trattamento con miglior rapporto costo-efficacia, nel cui ambito rientra, oltre alla scelta del farmaco, anche la scelta della via di

somministrazione: quella intravenosa comporta costi nettamente più alti rispetto a quella orale. Inoltre la via orale unisce al vantaggio economico anche la semplicità e la praticità del trattamento [5].

Già da diversi anni sono stati resi disponibili medicinali per la somministrazione orale di farmaci utilizzati nella terapia tumorale, come ad esempio l'etoposide, la ciclofosfamide, il tamoxifene impiegato da tempo nella terapia del tumore alla mammella ormono-dipendente [7], nuovi derivati sintetici delle fluoropirimidine (UFT e capecitabina), agenti di coordinazione del platino (JM-216) e alcaloidi della Vinca (come la vinorelbina). Inoltre, il riconoscimento che diversi composti richiedono un'esposizione prolungata per massimizzare gli effetti farmacodinamici, ha condotto allo sviluppo di agenti ciclo cellulare-specifici orali, quali le camptotecine (topotecan, 9-aminocamptotecina e irinotecan).

In generale, la compliance del paziente è un potenziale limite di una terapia orale, poiché l'assunzione orale a casa è totalmente dipendente dalla volontà dell'individuo e implica l'impossibilità dello stretto controllo da parte del personale specializzato nell'osservanza del regime terapeutico, con conseguente aumento della probabilità di insuccesso del trattamento. Bisogna però considerare che il tipo di patologia rende il paziente molto più attento alla compliance [8; 9]. Questa via di somministrazione è conveniente per il paziente (dato che ne migliora la qualità della vita, rendendo più pratico e meno invasivo il trattamento cronico

ed evitando l'ospedalizzazione) e la compliance può anche essere aumentata con l'educazione del paziente ed un supporto psicologico a casa [6].

1.2. I farmaci antitumorali e la biodisponibilità.

Per quanto riguarda la somministrazione di antitumorali, soprattutto per os bisogna considerare attentamente due punti:

1. I farmaci antitumorali hanno solitamente un intervallo terapeutico ristretto, per cui si può facilmente raggiungere una concentrazione tossica o restare sotto la soglia terapeutica;
2. Per i farmaci orali destinati ad un'azione sistemica l'assorbimento è fondamentale per l'attività. Ci sono però molti fattori anatomici e fisiologici che influiscono sulla velocità e sull'estensione complessive dell'assorbimento dal tratto gastrointestinale (pH, tempo di transito, assorbimento passivo o attivo tramite trasportatori specifici, metabolismo intestinale e di primo passaggio), unitamente alle caratteristiche chimico-fisiche del farmaco, come la solubilità e l'area superficiale, che controllano la dissoluzione.

Quindi la biodisponibilità è una caratteristica molto importante da valutare, perché la mancanza d'informazioni circa questi meccanismi può portare ad effetti collaterali imprevedibili o ad un'esposizione al farmaco sub-ottimale, con conseguenti maggiori difficoltà nella valutazione dell'efficacia clinica [5].

Purtroppo, la maggior parte dei farmaci anticancro ha una biodisponibilità orale bassa e variabile. I livelli plasmatici dopo una somministrazione orale, inoltre, sono generalmente più variabili di quelli che seguono ad una somministrazione intravenosa. Un'adeguata biodisponibilità orale è importante anche per la ragione che il tempo di esposizione al farmaco è determinante in una terapia antitumorale.

Tra le varie possibilità di migliorare la biodisponibilità, sono stati fatti studi sull'aumento dell'assorbimento intestinale bloccando le proteine di efflusso transmembrana ATP-dipendenti (ad es. co-somministrando la ciclosporina A, che è un inibitore della glicoproteina P) [10], oppure inibendo l'attività degli enzimi gastrointestinali ed epatici, particolarmente il sistema del citocromo P-450, per diminuire la variabilità interindividuale negli effetti di un farmaco e per ottimizzare l'assorbimento [11-13].

Queste difficoltà lasciano comprendere quanto la biodisponibilità di un preparato orale di un farmaco antitumorale passi attraverso una attenta formulazione del preparato stesso [14]. E' noto come gli sviluppi moderni della tecnologia farmaceutica orale abbiano portato a formulazioni di preparati a rilascio modificato dai quali il farmaco è rilasciato ai siti di assorbimento in maniera controllata e riproducibile. Le forme a rilascio modificato, infatti, sono preparazioni in grado di controllare il tempo ed il sito di rilascio mediante tecnologie principalmente basate sulla diffusione di sostanze e sull'utilizzo di materiali polimerici che rendono i preparati "intelligenti", in grado appunto di

rilasciare il farmaco nel sito desiderato o in modo prolungato, ritardato o addirittura pulsato [15]. E' perciò di rilievo trovare nuove formulazioni che permettano di aumentare l'assorbimento di questi farmaci agendo sulla velocità di dissoluzione al sito di assorbimento, sulla permeazione e sulla stabilità metabolica, operando un intervento dal punto di vista tecnologico. Questo può portare ad un aumento dell'efficacia degli antitumorali ed alla riduzione delle dosi con conseguente diminuzione della tossicità.

I composti che hanno problemi di biodisponibilità possiedono, in genere, una o più delle seguenti caratteristiche:

1. Elevata lipofilia e difficoltà di solubilizzazione nei fluidi fisiologici acquosi;
2. Peso molecolare elevato per cui sottostanno ad un processo di trasporto facilitato o attivo saturabile;
3. Instabilità metabolica enzimatica o idrolitica dovuta al pH in determinate zone del tratto gastrointestinale.

Conoscendo i punti deboli nel percorso per l'assorbimento si può agire utilizzando sistemi a rilascio modificato che permettano diverse soluzioni: si alterano parametri come la velocità di dissoluzione e quella di diffusione, migliorando la solubilizzazione e/o evitando la saturazione dei trasportatori che mediano l'assorbimento; o ancora si può realizzare un rilascio mirato per evitare gli ambienti critici in cui il farmaco è instabile o si può attuare una protezione del

farmaco che può subire metabolismo esteso; viceversa, nei casi di attivazione metabolica si può favorire il processo di trasformazione evitando la saturazione enzimatica.

1.3. Sistemi colloidali come vettori di farmaci antitumorali

Le piccole molecole come gli agenti chemioterapici anticancro presentano due principali problemi: la breve emivita nel circolo sanguigno, che prevede somministrazioni frequenti, e la scarsa specificità che porta ad importanti effetti collaterali [16-18]. Lo sviluppo di farmaci poco solubili in acqua è limitato dalla ridotta biodisponibilità e quando ne viene valutata l'efficacia, in seguito alla formulazione della molecola, i risultati degli studi preclinici sono spesso molto variabili [19; 20]. La velocità di dissoluzione del farmaco è funzione intrinseca della dimensione della particella e della solubilità dello stesso. Un nuovo approccio per la distribuzione del farmaco nel caso in cui sia poco idrofilo consiste nella riduzione della dimensione del composto a particelle di dimensioni nanometriche per migliorare la dissoluzione [21-24].

I sistemi nanoparticellari si dividono inoltre in diverse classi (Figura 1) a seconda della struttura e delle caratteristiche chimico-fisiche:

- **Liposomi:** sono sistemi colloidali di forma sferica costituiti da doppi strati fosfolipidici concentrici separati da compartimenti acquosi. Possono incapsulare sia farmaci idrofili che lipofili ottenendo un'alta efficacia

d'azione e possono essere funzionalizzati con cellule specifiche, tessuti o rivestiti con polimeri inerti e biocompatibili;

- Nanoparticelle: sistemi colloidali submicronici che possono essere costituiti da polimeri. Le nanoparticelle si possono dividere ulteriormente in nanocapsule e nanosfere. Le nanocapsule sono vescicole in cui il farmaco viene intrappolato in una cavità acquosa o oleosa e circondata da un singolo strato di membrana polimerica.;

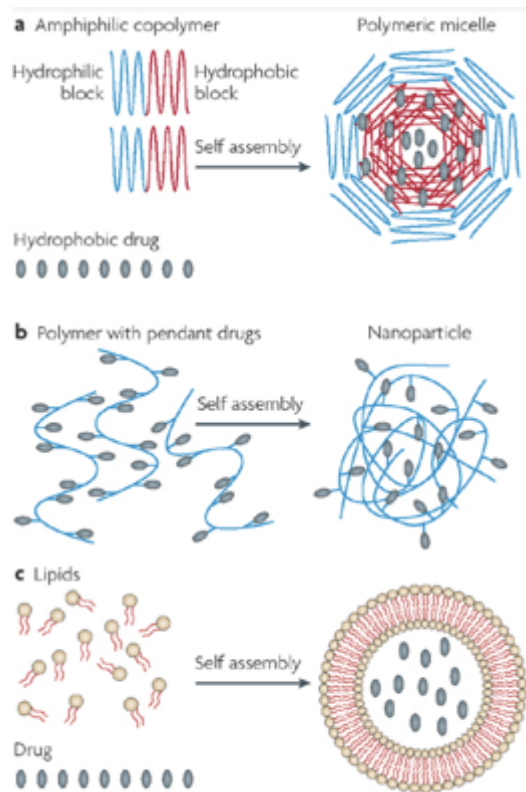


Figura 1: Esempi di formazione di micelle, nanoparticelle e liposomi.

Vengono utilizzate come dei sistemi *reservoir* che veicolano farmaci al tessuto tumorale. Le nanosfere sono invece delle matrici polimeriche dove il farmaco viene disperso tra le particelle;

- Micelle polimeriche: blocchi di copolimeri anfifilici con un *core* idrofobico e un guscio idrofilico. E' un *carrier* ideale per farmaci insolubili in acqua, è biodegradabile e biocompatibile, in funzione dei polimeri che si utilizzano. La somministrazione è endovenosa [25; 26].

I nanosistemi sono largamente impiegati per:

- Aumentare la solubilità di principi attivi in soluzioni simulate gastriche o intestinali;
- Migliorare la diffusione del farmaco;
- Aumentare l'emivita nel circolo sanguigno;
- Modulare le caratteristiche di rilascio del farmaco [27];
- Migliorare la somministrazione del farmaco in termini di raggiungimento del bersaglio;
- Ridurre gli effetti tossici, minimizzando gli effetti collaterali a livello sistemico;
- Somministrare una terapia composta da più farmaci contemporaneamente in modo da generare un effetto sinergico e una diminuzione delle farmacoresistenze [21; 24].

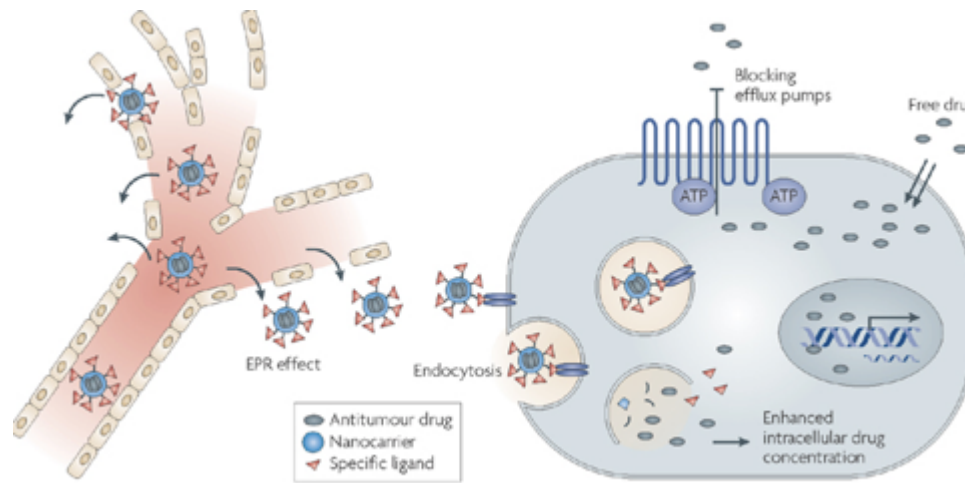


Figura 2: *Extravasazione di nanocarrier per effetto EPR.*

In corrispondenza dei tessuti neoplastici i vasi hanno una struttura discontinua rispetto a quella in prossimità dei tessuti sani, dovuta alla rapida formazione dei vasi che devono irrorare le cellule tumorali [28]. Le pareti presentano aperture attraverso le quali molecole trasportate dal circolo sanguigno possono extravasare e accumularsi presso i siti bersaglio dei nanocarrier.

La somministrazione di chemioterapici attraverso nanosistemi può quindi portare ad un accumulo spontaneo in tessuti tumorali per effetto EPR (*Enhanced permeability and retention*) (Figura 2) [24; 29-32]. Questo direccionamento è definito 'passivo'. Il direccionamento 'attivo' invece prevede la funzionalizzazione del *carrier* con molecole che permettano il riconoscimento del bersaglio e il suo

raggiungimento. Il *targeting* può essere effettuato legando al vettore anticorpi monoclonali che riconoscono antigeni specifici e proteine o peptidi che aumentano la capacità di penetrazione attraverso la membrana cellulare [33-35].

1.4. Tumore al seno

In Italia 7 donne su 100 manifestano carcinoma mammario nel corso nella vita; si forma mediante un processo a più tappe che prevede un accumulo di alterazioni cellulari che possono essere causate da fattori genetici o ambientali. Durante lo sviluppo del tumore al seno la crescita dei carcinomi è influenzata dalla concentrazione ormonale e agendo sulla modulazione della sensibilità agli estrogeni si può variare il decorso della malattia [1].

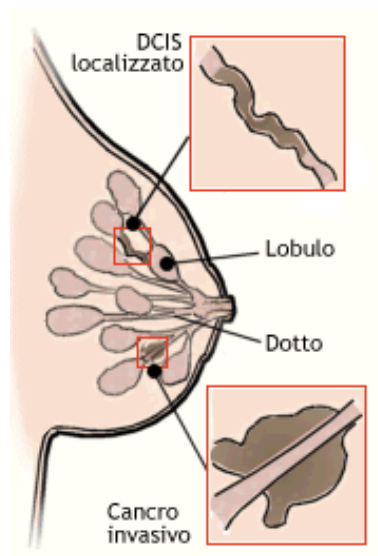


Figura 3: Localizzazione del tumore alla mammella.

Il cancro al seno si evolve in cinque fasi:

- stadio 0 – carcinoma in situ, può essere di due tipi:
 - 1) carcinoma lobulare in situ: non è aggressivo ma può generare una successiva lesione maligna;
 - 2) carcinoma duttale in situ: colpisce le cellule dei dotti;
- stadio 1 – cancro in fase iniziale di meno di 2 cm di diametro e senza coinvolgimento dei linfonodi;
- stadio 2 - cancro in fase iniziale di meno di 2 cm di diametro con coinvolgimento dei linfonodi sotto l'ascella o cancro in fase iniziale di più di 2 cm di diametro ma senza coinvolgimento dei linfonodi;
- stadio 3 – tumore localmente avanzato di dimensioni variabili con coinvolgimento dei linfonodi sotto l'ascella o dei tessuti circostanti;
- stadio 4 – cancro con metastasi al di fuori del seno.

Il tumore identificato nello stadio 0 prevede una sopravvivenza nel 98% dei casi diagnosticati; se è presente il tumore a livello del linfonodo la sopravvivenza a cinque anni si abbassa al 75%. Nel caso in cui vi siano metastasi al di fuori del seno, principalmente ai polmoni, ossa e fegato, la sopravvivenza media di pazienti curate con chemioterapia è di due anni [1].

1.4.1. Somministrazione orale di chemioterapici per il tumore al seno

Recentemente il trattamento del tumore al seno ormono-dipendente ha subito un'evoluzione tale da permettere la risoluzione della patologia in un'alta percentuale dei casi diagnosticati. Nel 16% dei casi è stata rilevata una riduzione della mortalità nei cinque anni successivi alla cura, mentre nei casi di trattamento cronico per cancro in stadi avanzati in donne in premenopausa l'efficacia ha raggiunto il 40% dei casi.

Il Tamoxifene è uno dei farmaci chemioterapici di prima linea utilizzato per la cura del cancro e di metastasi in stadi avanzati nelle donne in postmenopausa [7; 36; 37]. E' anche approvato dalla FDA per la prevenzione di questi tumori in donne ad alto rischio di sviluppo della malattia.

In seguito a rimozione chirurgica, la terapia con Tamoxifene è risultata molto efficace nell'azione preventiva dello sviluppo di metastasi o recidive. Questo farmaco, infatti, agisce come inibitore competitivo del legame dell'estradiolo al recettore. Una volta legato, il farmaco induce una modificazione nella struttura tridimensionale del recettore inibendone il legame dell'ERE (*Estrogen Response Element*) sul DNA [38]. Il farmaco si comporta quindi da modulatore selettivo inibendo l'espressione dei geni regolatori degli estrogeni e la secrezione di fattori di crescita e angiogenetici riducendo la stimolazione autocrina alla crescita del tumore.

Poiché è ora noto che l'azione farmacologica complessiva del tamoxifene *in vivo* è dovuta almeno in parte alla sua conversione in metaboliti che conservano attività uguale, se non in molti casi superiore come nel caso del 4-OH Tamoxifene, l'ipotesi è che l'alterazione del suo metabolismo (dovuta a variabilità genetica nel polimorfismo del citocromo P-450) possa contribuire alla variabilità interindividuale nella risposta terapeutica e negli effetti collaterali [39-42].

Gli effetti del Tamoxifene si manifestano però non solo a livello del seno ma anche dell'utero con possibile iperproliferazione dell'endometrio. L'utilizzo prolungato può inoltre generare un aumento della coagulazione del sangue con possibili eventi tromboembolici, danni a livello oculare come retinopatie e cancro al fegato [43].

L'attività del Tamoxifene è dose dipendente e l'infusione prolungata costringe il paziente a venir a contatto con grandi quantità di farmaco, incorrendo così in possibili effetti collaterali. Per questo motivo le ricerche degli ultimi anni sono indirizzate verso sistemi di somministrazione diversi da quelli classici con lo scopo di permettere un approccio più mirato ed efficace al trattamento.

A questo proposito le nanotecnologie offrono la possibilità d'utilizzare sistemi a rilascio modificato che permettono un controllo dalla farmacocinetica e della farmacodinamica del principio attivo. In questo modo si può verificare e modulare il rilascio del farmaco, che è influenzato non solo dalle proprie caratteristiche chimico-fisiche ma anche dalle proprietà del sistema in cui è incapsulato.

Con questi sistemi, non solo si può avere un prodotto a rilascio modulato e un miglioramento della biodisponibilità che potrebbe diminuire la quantità di Tamoxifene metabolizzato [44]. Questo permetterebbe di svincolarsi dalla biodiversità genetica (polimorfismo del citocromo P-450), e di conseguenza di diminuire la variabilità interindividuale nella risposta alla terapia e negli effetti collaterali.

1.4.2. Nanoparticelle per la somministrazione orale di chemioterapici

Numerosi sforzi sono stati fatti dalla comunità scientifica per studiare le caratteristiche delle nanoparticelle utilizzate nella via di somministrazione orale [45-49]. Un punto di interesse è rappresentato dallo studio dell'interazione del nanosistema con il tessuto intestinale. Le nanoparticelle sono impiegate per favorirne l'assorbimento da parte del tessuto d'interesse grazie all'aumento del tempo di contatto con la mucosa, dovuto all'adesione del sistema alla parete. Da studi sperimentali si è accertato che per penetrare la mucosa, le nanoparticelle devono avere capacità di adesione alla mucina e devono essere abbastanza piccole da permettere il loro passaggio tra le sue catene [50; 51] [52]. La mucina presente sulla superficie del tratto gastro intestinale è un gel viscoelastico che protegge i tessuti sottostanti dalle diverse esposizioni ambientali (chimici e fisici) [53]. E' composto principalmente da catene di mucina intrecciate secrete dalle cellule globulari e ghiandole sotto mucosali. Lo spessore della mucosa varia secondo il

tipo di mucosa nell'uomo, per esempio a livello gastrico lo spessore è di 170 μm mentre nell'ileo è di soli 10 μm [50; 54]. Un'ulteriore caratteristica della mucina è il tempo di turnover; infatti essa è continuamente secreta, si ricambia, viene scartata o digerita e successivamente riciclata [51]. Il muco intestinale nell'uomo, grazie alla continua secrezione ed eliminazione, dovuta anche a movimenti peristaltici intestinali, ha un turnover di circa 4-6 ore [50].

I nanovettori permettono l'attraversamento della barriera mucosale e il trasporto del farmaco incapsulato, comportandosi da veri e propri sistemi di trasporto, quando hanno particolari caratteristiche, come avere una dimensione inferiore a 200 nm e una carica positiva sulla superficie. E' per questo motivo che alcuni tipi di nanoparticelle riescono a migliorare l'assorbimento di alcuni farmaci rispetto alla formulazione in cui abbiamo il farmaco libero.

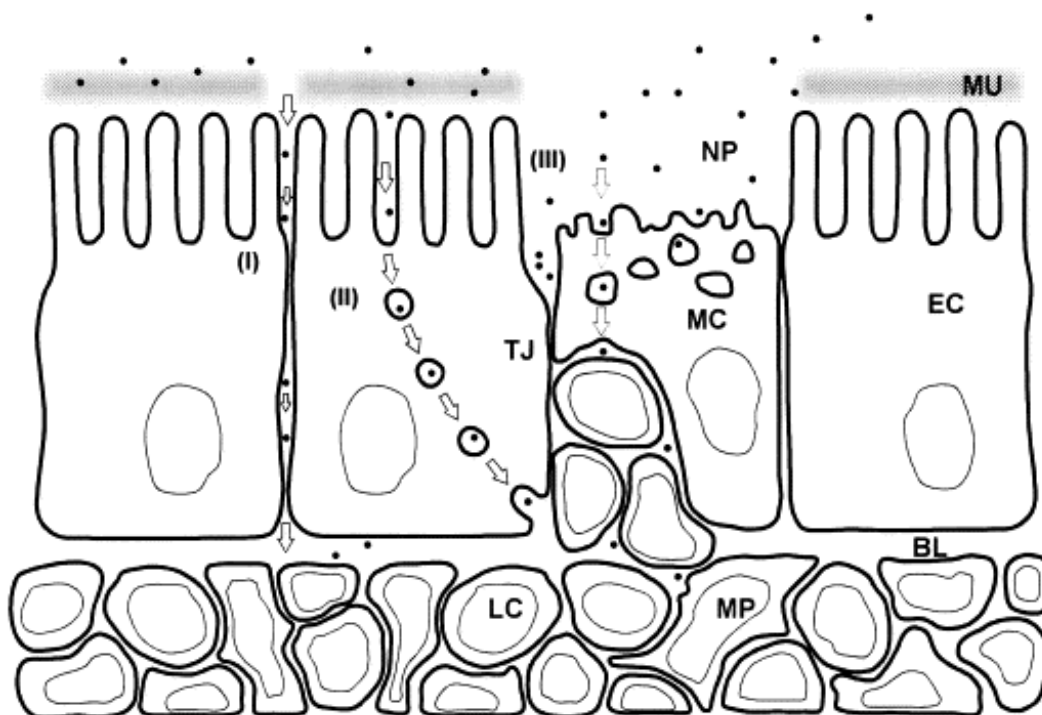


Figura 4: *Meccanismo di assorbimento delle nanoparticelle a livello delle cellule della parete intestinale.*

E' stato dimostrato che si può avere un assorbimento delle nanoparticelle da parte delle cellule del tratto gastrointestinale, per esplicare la loro azione anche in altri distretti dell'organismo. Anche qui la dimensione delle nanoparticelle gioca un ruolo fondamentale nell'assorbimento attraverso il tratto G.I.. Sono stati proposti tre possibili meccanismi (Figura 4) [54]:

1. Passaggio paracellulare tra le cellule dell'epitelio intestinale, per le particelle di dimensioni ridotte (< 50nm);

2. Passaggio transcellulare dovuto all'endocitosi ad opera degli enterociti (per particelle fino a 500nm);
3. Captazione da parte delle cellule M delle placche di Peyer per particelle di dimensioni $< 5\mu\text{m}$.

I primi due meccanismi sono energia dipendenti e vengono influenzati sia dalla dimensione che dalle proprietà superficiali dei materiali adsorbiti.

In letteratura sono presenti diversi studi fatti con gli antitumorali sopra descritti caricati in nanosistemi diversi: Camptotecine in micelle fosfolipidiche stabilizzate [55], Camptotecine in nanosistemi co-polimerici [56; 57], Camptotecine in nanoparticelle lipidiche solide (quest'ultima formulazione valutata per os) [58], Tamoxifene in nanoparticelle di β -ciclodestrine [59], Tamoxifene in nanosfere copolimeriche rivestite di polietilenglicole (PEG) [16] e in altri sistemi polimerici [57; 60].

Il vero interesse di una somministrazione orale di nanoparticelle non è quello di far raggiungere alle nanoparticelle il ciclo sistemico e il target, ma quello di modificare la farmacocinetica del farmaco in modo da migliorarne la biodisponibilità. Questo potrebbe essere ottenuto grazie alle caratteristiche prima elencate che contraddistinguono un sistema colloidale ottimizzato per una somministrazione orale. Le principali sono la dimensione e la carica superficiale (bioadesione) [61; 62].

Nel nostro laboratorio è stato avviato uno studio inteso verso nanoparticelle costituite da lecitina e chitosano [63]. Queste particelle sono auto-assemblanti grazie all'interazione elettrostatica tra il policatione chitosano e la lecitina. Quest'ultima infatti è carica negativamente grazie ai componenti lipidici della miscela. Queste particelle hanno dimostrato capacità di incapsulare farmaci come il progesterone e il clobetasolo propionato, con una buona efficienza [64]. Grazie a questa caratteristica di incapsulare molecole con un alto Log P, si è pensato che questo potrebbe essere un buon sistema per una formulazione di un preparato colloidale di tamoxifene.

1.5. Microparticelle solide come veicolo delle nanoparticelle

Il principale problema legato alla produzione e all'utilizzo di forme farmaceutiche contenenti nanoparticelle è da ricercare nella loro manipolazione. Per quanto riguarda l'utilizzo di sospensioni colloidali, pur consentendo una somministrazione precisa nel dosaggio, le particelle trovandosi in un mezzo acquoso possono subire sia fenomeni di aggregazione sia degradazioni della struttura polimerica e del principio attivo. Preparazioni solide di nanoparticelle sarebbero più stabili e le polveri microparticellari che le contengono, potrebbero essere utilizzate per la produzione di forme farmaceutiche tradizionali. Queste polveri vengono prodotte a partire dalla soluzione colloidale a cui è aggiunto un eccipiente idrofilo che agisce da diluente nella produzione di microparticelle.

Una volta prodotta la polvere, questa dovrebbe essere in grado di ricostituire la soluzione colloidale se dispersa o disciolta in un mezzo acquoso e quindi permettere il rilascio di farmaco dalle nanoparticelle.

Durante il lavoro di ricerca presso i laboratori del nostro dipartimento sono state prodotte nanoparticelle di lecitina e chitosano veicolanti tamoxifene in soluzione colloidale. Si è quindi deciso di trasformarle in forma solida attraverso la produzione di microparticelle con tecnica spray drying, per essiccare la componente liquida ed ottenere una polvere micronizzata.

1.6. I Componenti

1.6.1. Il Chitosano

Il chitosano (CS) è un polisaccaride lineare costituito da due molecole di un monosaccaride lineare, il 2-amino-2-deoxy- β -D-glucano, combinate con legami glicosidici $1 \rightarrow 4$. Il chitosano è ottenuto da deacetilazione della chitina, polisaccaride biocompatibile presente abbondantemente in natura.

È un polimero a lunga catena la cui forma commerciale ha un peso molecolare compreso tra 3.800 e 20.000 KDa ed è prodotto sotto forma di polvere, pasta, film o fibre. La solubilità dipende dal rapporto tra gruppi amminici liberi e acetilati. A pH neutri o basici il polimero si trova nella forma non protonata, contiene gruppi amminici liberi e di conseguenza è insolubile in acqua. A pH acidi i gruppi amminici sono protonati e il composto risulta idrofilo. Con un basso grado di

deacetilazione (<40%) è solubile a pH=9, con alto grado (>85%) è solubile a pH=6,5. In questo lavoro di tesi è stata prodotta una soluzione di chitosano acidificata con l'1% di acido acetico in acqua. Il chitosano degrada sotto l'azione di enzimi e batteri, non è tossico e non dà effetti collaterali. Ha proprietà antimicrobiche e assorbe i metalli tossici come cadmio e mercurio. Ha una buona bioadesione, capacità di coagulazione e attività immunostimolatoria.

Viene utilizzato per la produzione di nanoparticelle per molte proprietà vantaggiose che conferisce a questi vettori come:

1. Controllo del rilascio di principi attivi;
2. Permette di non utilizzare solventi pericolosi durante la produzione di particelle perché è solubile in soluzione acquosa acida;
3. L'utilizzo del chitosano nella produzione di nanoparticelle è vantaggioso anche perché grazie alla presenza delle cariche positive sulla molecola si hanno interazioni con le cariche negative presenti sulle membrane cellulari.
4. Ha proprietà mucoadesive che aumentano la permanenza nel sito di assorbimento [65];
5. Permette la temporanea apertura delle *tight junctions* tra le cellule epiteliali della superficie mucosale aumentando la permeabilità del tessuto. Normalmente le *tight junctions* (Figura 5) costituiscono una

barriera tra le cellule epiteliali vicine impedendo la diffusione di molecole idrofile nell'epitelio [66; 67].

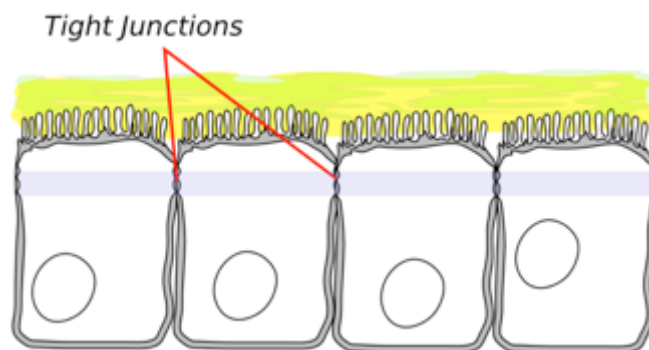


Figura 5: *Rappresentazione schematica delle giunzioni cellulari.*

1.6.2. Lecitina

La lecitina utilizzata è formata da una miscela di fosfolipidi il cui principale componente è la fosfatidilcolina (47%). Viene impiegata nella formazione di liposomi e micelle e agisce come un tensioattivo privo di tossicità [68; 69].

Posta in ambiente acquoso genera liposomi di piccole dimensioni con carica superficiale negativa.

1.6.3. Tamoxifene

Il Tamoxifene è una molecola anti-estrogenica non steroidea. La forma somministrata per via orale è il sale citrato, un isomero trans del derivato trifeniletile.

I dati circa la farmacocinetica riportano che la somministrazione per dose singola orale ottiene la massima concentrazione plasmatica in poche ore; si lega fortemente alle proteine del sangue alle concentrazioni terapeutiche [70; 71]. E' metabolizzato attraverso la via del citocromo P450 (CYP450), com'è stato accennato precedentemente, con la produzione di N-desmetil-tamoxifene (N-DMT), 4-idrossitamoxifene (4-OHT) e 4-idrossi-N-desmetil-tamoxifene. Ricerche hanno dimostrato come il CYP3A4 sia la principale isoforma del citocromo P450 coinvolta nel metabolismo del tamoxifene [72-75]. L'efficacia e la tossicità dipendono dalla variabilità interindividuale e da possibili interazioni con altri farmaci [7; 76]. Alcuni anti-ipertensivi ed inibitori selettivi del re-uptake della serotonina (SSRI), infatti, subiscono metabolismo da parte dello stesso CYP450 e possono interferire col metabolismo del tamoxifene stesso. Recenti studi riportano che la co-somministrazione di tamoxifene e paroxetina, un inibitore del CYP2D6, riduce in modo significativo la concentrazione del metabolita 4-idrossi-N-desmetil-tamoxifene, ma non influenza la concentrazione di N-DMT e 4-OHT.

Dopo somministrazione orale il tamoxifene ha un assorbimento lento e problemi di biodisponibilità, anche associati all'incompleta dissoluzione delle formulazioni in compresse classiche. Nello studio condotto da Braga et al. [77] è stata determinata la dissoluzione *in vitro* di cinque forme farmaceutiche del tamoxifene citrato, tutte contenenti 10 mg di farmaco attivo. Ciascuna formulazione ha presentato liberazione di più del 75% di farmaco attivo in 30 minuti. Nessuna relazione è stata

osservata tra la dissoluzione *in vitro*, il peso medio, l'uniformità di massa e la durezza delle tavolette, mentre la liberazione era proporzionale al contenuto in tamoxifene citrato (sebbene una di queste formulazioni presentasse un profilo di dissoluzione più alto delle altre).

La dose efficace che viene usualmente somministrata è compresa tra 20 e 40 mg/die. L'escrezione biliare è la prima via di eliminazione, anche se parte del farmaco subisce un ricircolo enteroepatico. E' stato comunque visto che il successo della terapia non è strettamente legato alle concentrazioni plasmatiche di tamoxifene, poiché non sono state rilevate differenze statisticamente significative in termini di riuscita clinica fra donne che hanno ricevuto 20 mg/die e donne che hanno ricevuto 40 mg/die [7].

Per i vantaggi in precedenza elencati nell'utilizzare questo farmaco in una formulazione nanoparticellare, il tamoxifene è stato scelto come prototipo per essere incapsulato da nanoparticelle di lecitina e chitosano, sistema ottimizzato in studi precedenti nel nostro laboratorio [63].

1.6.4. Eccipienti idrofili

I materiali di supporto, per la produzione di microparticelle a partire da lotti di soluzioni colloidali, sono eccipienti idrofili. Per la produzione di microparticelle sono stati scelti eccipienti quali α - ciclodestrine, β - ciclodestrine (Figura 6), maltodestrine e trealosio.

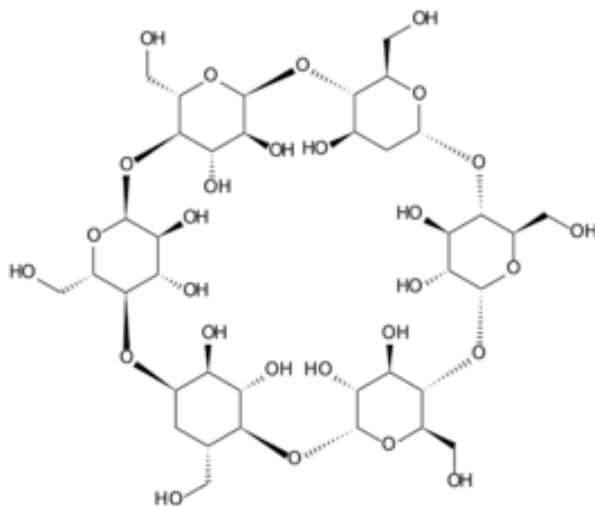


Figura 6: Formula di struttura delle ciclodestrine.

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici naturali formati da 6 (α – ciclodestrine), a 8 (γ – ciclodestrine) monomeri di D-(+)glucopiranosio uniti da un legame α ,1-4 glucosidico. Hanno azione protettiva e stabilizzante nei confronti dei principi attivi con cui interagiscono, aumentandone la solubilità [34; 78-80].

Le β – ciclodestrine sono state utilizzate per molte formulazioni di tipo orale tra cui compresse e soluzioni e agiscono come stabilizzanti riducendo gli effetti irritanti locali di alcuni farmaci [78; 81]. In questo lavoro di ricerca sono state scelte perché sono sicure e non tossiche. Sono caratterizzate da una superficie esterna idrofila che le rende idrosolubili ed un nucleo idrofobo che permette la formazione di complessi di inclusione con composti lipofili.

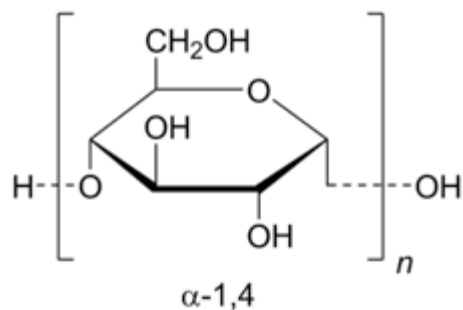


Figura 7: Formula di struttura delle maltodestrine.

Le maltodestrine (Figura 7) sono carboidrati idrosolubili e derivano da un'idrolisi selettiva operata su substrati amidici che si trovano in natura sotto forma di lunghe catene polimeriche di unità di glucosio anidro. La composizione in zuccheri riducenti è indice del grado d'idrolisi ed è definita come "destrosio equivalente" e ne determina le caratteristiche chimico fisiche (viscosità, igroscopia, capacità di cristallizzazione, imbrunimento).

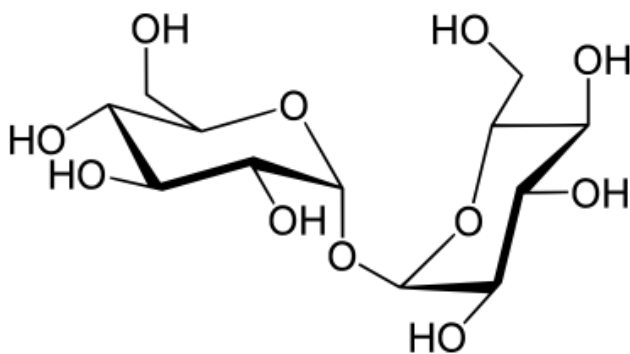


Figura 8: Formula di struttura del trealosio.

Sono polveri bianche e comprendono unità di glucosio polimerizzato a catene di lunghezza variabile. Come le ciclodestrine sono facilmente maneggiabili e non tossiche.

Il trealosio (Figura 8) è un disaccaride non riducente formato da due unità di glucosio legate da un legame 1,1, α , α -glicosidico (1- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranoside); è presente in vari microorganismi ed invertebrati. Viene utilizzato per la sua capacità di proteggere strutture labili; è sicuro e non tossico. E' uno zucchero non riducente e non reagisce con amminoacidi. E' stabile a bassi pH al contrario di altri disaccaridi che idrolizzano formando monosaccaridi [82; 83].

2. SCOPO DELLA RICERCA

Studi precedenti svolti nel nostro laboratorio hanno mostrato che l'interazione tra lecitina e chitosano nella proporzione 20:1 portava alla formazione di nanoparticelle (NCL). Questi nanosistemi lecitina/chitosano possiedono caratteristiche di dimensione e carica superficiale che potrebbero essere particolarmente adatte alla veicolazione transmucosale dei farmaci.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di studiare nanoparticelle (NCL) caricate con tamoxifene (TAM), con l'obiettivo di produrre una formulazione adatta alla somministrazione orale. L'idea è stata quella di veicolare le nanoparticelle in microparticelle costituenti una polvere che al contatto con fluidi biologici restituissero il sistema colloidale di partenza. La presenza di nanoparticelle potrebbe consentire al farmaco di migliorare la propria biodisponibilità e ridurre la variabilità interpaziente, aumentandone così l'efficacia terapeutica e diminuendone gli effetti tossici.

Innanzitutto è stato studiato il comportamento di rilascio del farmaco dal sistema NCL-TAM in differenti condizioni: fluido gastrico simulato, fluido intestinale simulato con e senza enzimi. Come enzimi sono stati scelti lipasi e lisozima, capaci di degradare in modo selettivo i componenti delle nanoparticelle.

Il sistema colloidale prodotto caricato con l'antitumorale è stato anche studiato dal punto di vista della citotossicità su cellule di carcinoma mammario sensibili al

tamoxifene (MCF7). L'uptake cellulare da parte di cellule di carcinoma del colon usate come modello dell'epitelio intestinale (CaCo-2) è stato altresì determinato.

Inoltre è stato condotto uno studio ex vivo su intestino di ratto per studiare la capacità del farmaco di passare attraverso la membrana intestinale quando somministrato sotto forma di nanoparticelle. In questi esperimenti è stata anche valutata l'incidenza della bioadesione del sistema nanoparticellare alla mucosa intestinale, sul passaggio del farmaco.

Infine, è stata realizzata una polvere atta alla somministrazione orale costituita da microparticelle cariche di nanoparticelle. Dapprima è stato studiato il comportamento del sistema NCL-TAM con alcuni eccipienti idrofili, come α -ciclodestrina, β -ciclodestrina, maltodestrina e trealosio; in seguito si è passati alla produzione di polveri, mediante una tecnica di essiccazione spray. Queste polveri sono costituite da microparticelle idrofile caricate con nanoparticelle veicolanti tamoxifene. Infine le microparticelle ottenute sono state caratterizzate per quanto riguarda le dimensioni, morfologia e comportamento in fluidi biologici simulati.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiali

3.1.1. Chitosano

Lotti di chitosano ChitoClear® sono stati forniti dalla ditta PRIMEX (Siglufjordur, Islanda). I lotti del polimero TM1874 erano caratterizzati da valori di viscosità uguale a 103 cPs, e con una percentuale di deacetilazione pari a 95%.

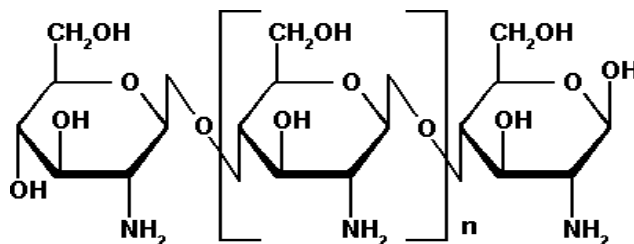


Figura 9: Formula di struttura di monomeri del chitosano.

3.1.2. Lecitina

La lecitina LIPOID S45 lotto n° 745260-3 è stata fornita dalla LIPOID AG (Cham, Svizzera). Tale miscela di fosfolipidi risulta, secondo quanto indicato dalla ditta fornitrice, essere costituita per il 47,6% da fosfatidilcolina e per il 16,4% da fosfatidiletanolamina. Le altre frazioni lipidiche non sono state analizzate.

3.1.3. Tamoxifene citrato

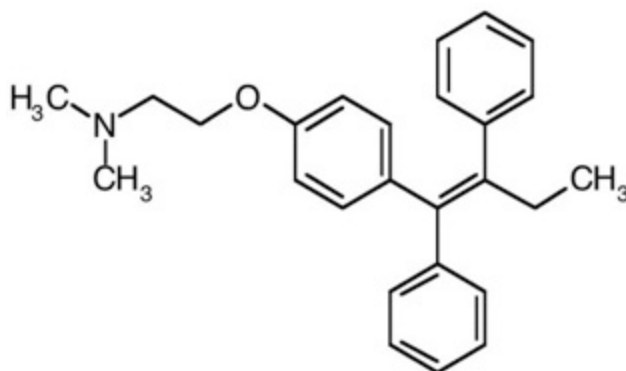


Figura 10: Formula di struttura del tamoxifene citrato.

Il Tamoxifene citrato è un trans-isomero di un trifeniletilene derivato ((Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)fenossi]-N,N-dimetiletanamina-2-idrossi-1,2,3 propantricarbossilato (1:1)); il peso molecolare è 563,62 u.m.a. e si presenta sotto forma di polvere cristallina bianca. La pKa è 8.85; presenta bassa solubilità in acqua a 37°C (0.5 mg/mL), in HCl 0.02 N a 37°C (0,2 mg/mL) e in acetone; molto solubile in metanolo. Solitamente viene utilizzato nella terapia dei tumori alla mammella. Il tamoxifene citrato utilizzato è stato fornito dalla ditta Solmag S.p.A lotto n°0640289 (Lodi, Italia).

3.1.4. α – ciclodestrina

Le α – ciclodestrine utilizzate fanno parte del lotto 53218/TF/, Roquette (Lestrem France).



Figura 11: Immagine al SEM delle α – ciclodestrina.

3.1.5. β – ciclodestrine

Le β – ciclodestrine utilizzate fanno parte del lotto 341 001 100 H, E 0236, Roquette (Lestrem, France).

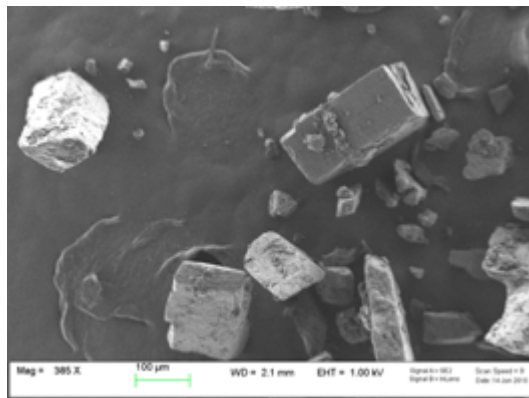


Figura 12: Immagine al SEM delle β – ciclodestrina.

3.1.6. Maltodestrine

Le maltodestrine utilizzate fanno parte del lotto Lab2509, ref = 724031, Roquette.

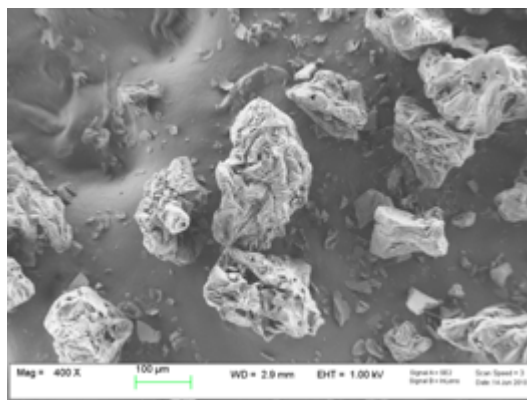


Figura 13: Immagini al SEM delle maltodestrine.

3.1.7. Trealosio

Il trealosio utilizzato fa parte del lotto di trealosio diidrato, OT053130704, N-CEE 2027396, CAS 6138-23-4, prodotto da Alfa Aesar, GMBH & C. KG, Karlsruhe, Germania.

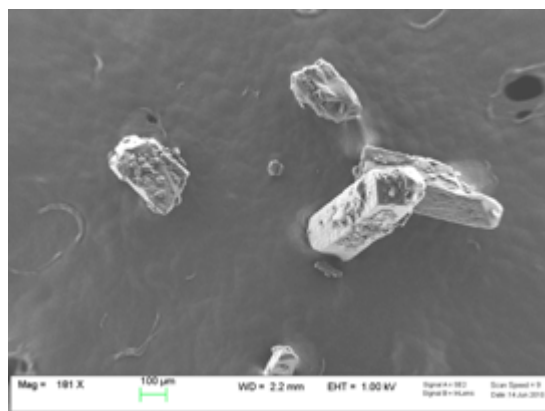


Figura 14: Immagini al SEM del trealosio.

3.1.8. Pancreatina

La pancreatina da pancreas porcino lotto n°116K0776 è stata fornita dalla ditta SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA). Secondo quanto indicato dalla ditta fornitrice, l'enzima presenta un contenuto in lipasi pari a 6 U/mg.

3.1.9. Pseudomonas Lipasi

Lotti di Pseudomonas Lipase Fluorescens sono stati forniti dalla ditta SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA). Secondo quanto indicato dalla ditta fornitrice, l'enzima presenta una solubilità in acqua pari a 5000 µg/ml e un contenuto in lipasi pari a 238 U/mg.

3.1.10. Lisozima

Il Lysozyme chloride form from chicken egg white lotto n°18H7019 è stato fornito dalla ditta SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA). Secondo quanto indicato dalla ditta fornitrice, l'enzima presenta un contenuto proteico pari a 53 U/mg.

3.1.11. Altri reagenti

L'acqua utilizzata negli esperimenti è stata distillata di fresco quindi filtrata e degassata su filtri 0,45 µm (Albet®, Barcellona, Spagna) onde evitare la presenza di particolato nelle preparazioni e gli altri reagenti utilizzati sono di grado analitico.

3.2. Metodi

3.2.1. Preparazione della soluzione metanolica di lecitina

La lecitina è stata sciolta in CH₃OH mediante breve sonicazione (Branson 2200, Danbury, CT, USA) fino all'ottenimento di una soluzione di 25 mg/ml. Tale soluzione è stata conservata a temperatura ambiente in atmosfera di azoto per evitare fenomeni di ossidazione dei lipidi.

3.2.2. Preparazione della soluzione di chitosano all'1%

Un g di polimero chitosano è stato sciolto in HCl 1% (p/v) per ottenere una soluzione all'1% (p/v). La soluzione è stata mantenuta in agitazione per 24 ore per la completa dissoluzione del polimero. Tale soluzione, così ottenuta (10 mg/mL), è stata conservata a 4 °C fino all'utilizzo.

3.2.3. Preparazione delle nanoparticelle di lecitina e chitosano

La produzione delle nanoparticelle di chitosano e lecitina, denominate NCL, è stata ottenuta mediante aggiunta della soluzione metanolica di lecitina, alla soluzione di chitosano 1% appropriatamente diluita con acqua distillata filtrata (vedi schema riportato in Figura 15).

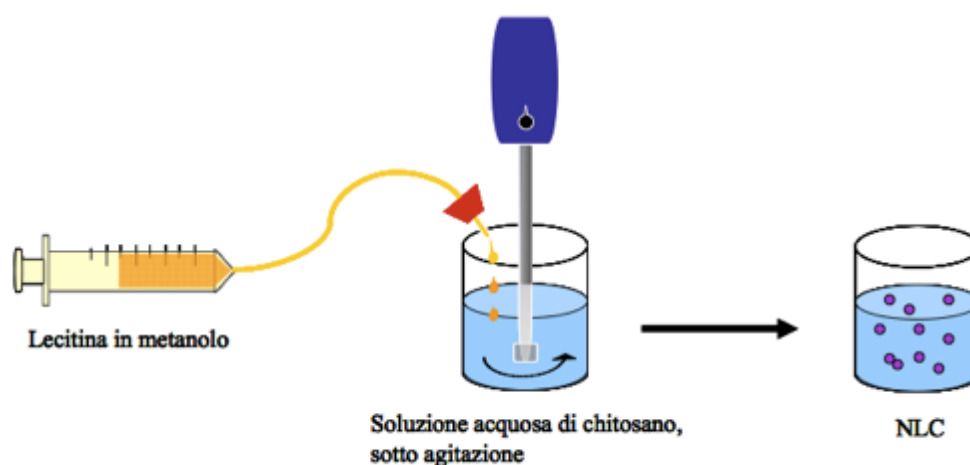


Figura 15: Schema del metodo utilizzato per la produzione delle NCL.

La soluzione metanolica di lecitina è stata aggiunta tramite un sistema di iniezione automatico (model 200, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA), che prevede l'uso di una siringa di plastica di diametro 28,6 mm il cui stantuffo è sospinto da un motore; la siringa è collegata tramite un tubo di gomma siliconata ad un iniettore di vetro con ugello da 0,5 mm (Figura 15). In questo modo sono stati controllati automaticamente velocità (40 ml/min) e volume di iniezione (8 ml).

La soluzione di chitosano, durante la fase di iniezione della lecitina è stata mantenuta in costante agitazione tramite agitatore ULTRA-TURRAX® T 25 basic (IKA Labortechnik, Staufen, Germania) equipaggiato con testa S 25 NK-19 G avente diametro di 2 cm e velocità fissata a 11000 RPM.

Le quantità di chitosano e lecitina aggiunte sono state scelte in base al rapporto ponderale lecitina/chitosano (L/C) desiderato. Questo rapporto è stato

precedentemente studiato, mettendo in luce che i risultati più promettenti si ottenevano con il rapporto 20:1 (L/C), in quanto queste particelle, oltre a carica superficiale positiva, possiedono anche buone caratteristiche di dimensioni e stabilità. In tutti i lotti prodotti il volume totale della sospensione è stato di 100 ml, mantenendo costante il volume della soluzione metabolica di lecitina (8 ml) e i volumi di acqua e di soluzione di chitosano 1% aggiunti (1 ml).

3.2.4. Preparazione di NCL caricate con tamoxifene citrato

La produzione delle NCL caricate con tamoxifene citrato (NCL TAM) è stata realizzata sciogliendo una quantità stabilita del farmaco nella soluzione metanolica di lecitina. Il lotto di NCL TAM prodotto aveva un volume di 100 ml, rapporto L/C 20/1; la concentrazione di tamoxifene citrato presa in esame è stata di 600 µg/ml (Figura 16).

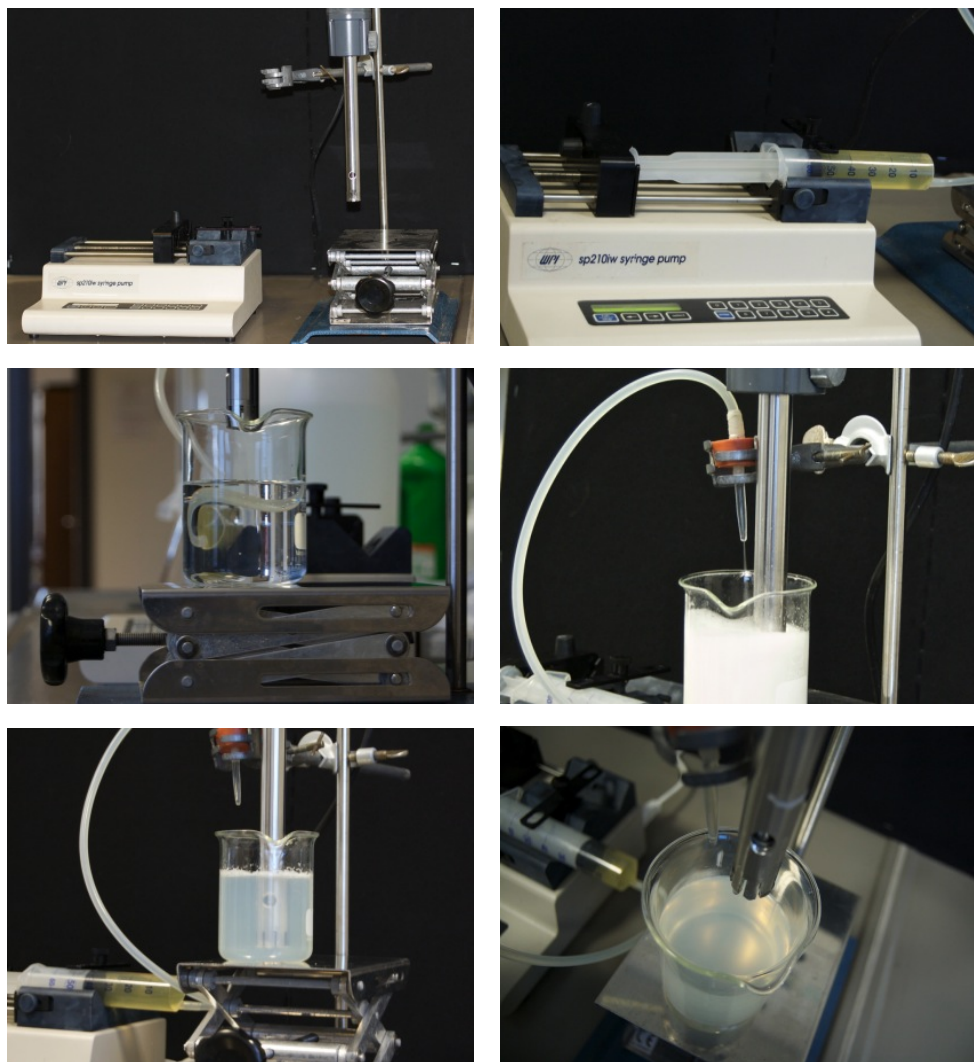


Figura 16 : Immagini che mostrano il processo di produzione del lotto di NCL-TAM.

3.2.5. Tecniche di analisi di sistemi colloidali

3.2.5.1. Analisi dimensionale (Dinamic Light Scattering)

La tecnica del Dinamic Light Scattering (DLS), definita anche come Quasi Elastic Light Scattering (QELS) o Photon Correlation Spectroscopy (PCS), risulta essere, ad oggi, una delle tecniche più utilizzate per misurare delle dimensioni di particelle nella regione sub-micronica. Essa, come lo Static Light Scattering (SLS), sfrutta il fenomeno della diffusione della luce; tuttavia, a differenza dello SLS, che risulta essere tempo indipendente e analizza la luce diffusa da una particella ai differenti angoli, il DLS è basato sull'analisi della variazione nel tempo dell'intensità della luce rilevata ad un angolo fisso. Prima di procedere alla descrizione del funzionamento di tale tecnica occorre, tuttavia, definire chiaramente cosa si intende per diffusione della luce. Per una descrizione scientifica di tale fenomeno si deve partire dall'analisi dell'interazione della luce con la materia: nel caso della diffusione, la radiazione elettromagnetica impone un'oscillazione nella distribuzione elettronica dell'oggetto, che diviene quindi esso stesso fonte di radiazione secondaria. Tale radiazione, definita luce diffusa, si propagherà in tutte le direzioni e avrà la stessa frequenza della sorgente primaria.

Se il mezzo colpito dalla radiazione è perfettamente omogeneo, tutte le onde secondarie interferiranno distruttivamente eccetto che nella direzione di propagazione originaria; se invece il mezzo ha carattere non omogeneo (ad

esempio macromolecole o particelle disperse in un solvente) la radiazione viene diffusa anche in altre direzioni.

Quando le dimensioni di una particella sono dello stesso ordine di grandezza della λ della luce incidente, l'intensità della luce diffusa varierà in funzione dell'angolo e da tale funzione sarà possibile ricavare il diametro delle particelle (ciò è sfruttato dalla tecnica dello static light scattering). Se le particelle hanno un diametro inferiore a 1/10 della λ della luce incidente sarà invece possibile applicare l'approssimazione di Rayleigh che prevede una diffusione della luce essenzialmente isotropica, cioè uguale in tutte le direzioni con intensità della luce emessa che varierà in funzione del diametro della particella secondo la relazione:

$$I \propto d^6$$

In questi casi non sarà di nessuna utilità fare osservazioni multi angolo e la tecnica dello SLS sarà sostanzialmente inefficace.

Il DLS, invece, ovvia a questo problema sfruttando i movimenti Browniani delle particelle in soluzione e relazionando tali movimenti con le dimensioni particellari. Tale analisi viene realizzata effettuando una misurazione continua, durante un determinato intervallo di tempo, dell'intensità di luce diffusa da particelle colpite da un raggio di luce (solitamente un raggio laser con λ di circa 600 nm).

L'intensità della luce diffusa viene quindi rilevata ad un particolare angolo del campione (solitamente 90°) e riportata in grafico in funzione del tempo (Figura 17).

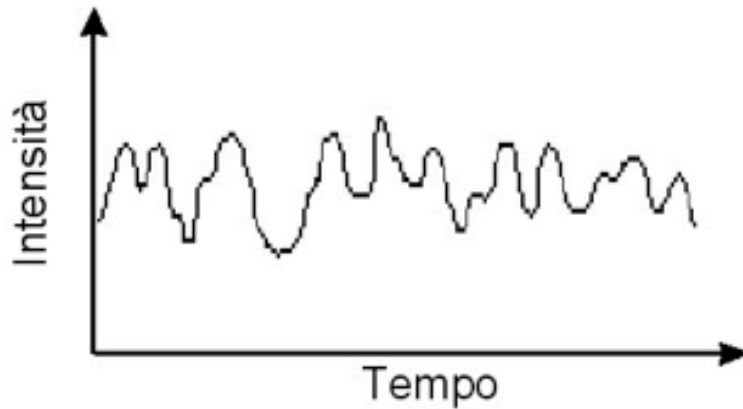


Figura 17: *Variazione dell'intensità della luce diffusa rilevata in funzione del tempo.*

Come si può osservare l'intensità della luce rilevata non sarà costante nel tempo ma varierà in funzione del diametro delle particelle che passeranno di fronte al rilevatore. Tali variazioni saranno più o meno rapide in funzione del diametro delle particelle.

Il grafico dell'intensità in funzione del tempo viene quindi interpretato determinando la relazione esistente tra l'intensità del segnale al tempo t e del segnale al tempo $t+\tau$ definito τ come l'intervallo di tempo Δt che intercorre tra le due misurazioni di intensità. Tale relazione viene determinata mediante una funzione definita funzione di correlazione $G(\tau)$:

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} I(t)I(t+\tau)dt$$

Tale funzione fornisce un'indicazione della correlazione esistente tra l'intensità di luce rilevata a due tempi diversi. Il valore fornito dalla funzione di correlazione è dato dal coefficiente di correlazione che risulterà uguale a 1 per due segnali rilevati allo stesso tempo e aventi quindi massima correlazione (cioè per $\tau=0$, $G=1$) mentre tenderà a zero per tempi infiniti. Il grafico che si ottiene è riportato in figura 18-B:

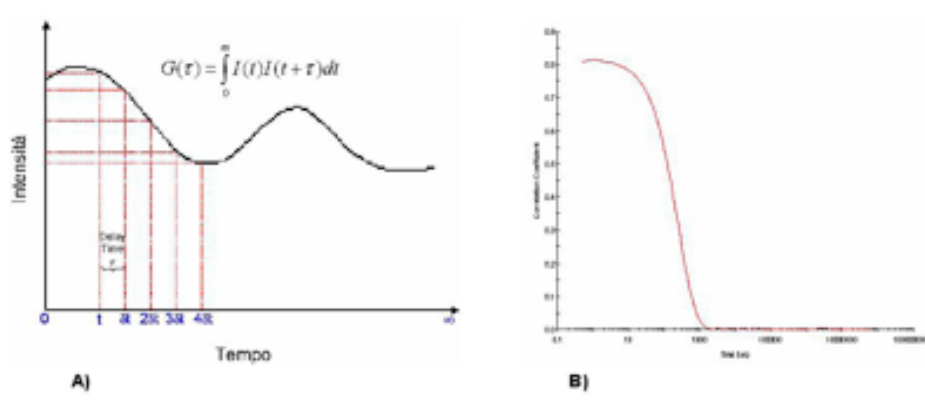


Figura 18: A) Illustrazione del valore di τ ; B) Grafico della funzione di correlazione ottenuta.

Conoscendo la funzione di correlazione $G(\tau)$ sarà quindi possibile ricavare il coefficiente di diffusione traslazionale D delle particelle sfruttando l'equazione di $G(t)$ valida per particelle monodisperse:

$$G(\tau) = A + B^{-2\Gamma\tau}$$

dove: A è la linea di base della funzione di correlazione, B è l'intercetta a $\tau = 0$, Γ è il grado di decadimento (decay rate).

Il grado di decadimento è relazionato con il coefficiente di diffusione traslazionale mediante la seguente relazione:

$$\Gamma = Dq^2$$

dove q è dato da:

$$q = \frac{2\pi n}{\lambda_0} 2\sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

dove n è l'indice di rifrazione del liquido sospendente, λ_0 è la lunghezza d'onda del raggio di luce incidente, θ è l'angolo a cui viene misurata la luce diffusa.

Il valore di D ricavato dall'analisi verrà quindi inserito nell'equazione di Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

dove k_B è la costante di Boltzman, T è la temperatura in ° K, η è la viscosità del liquido entro cui le particelle si muovono, permettendo di ricavare il diametro idrodinamico medio $d(H)$ dalle particelle.

3.2.5.2. Potenziale ζ (Laser Doppler Electrophoresis, Phase Analysis Light Scattering)

Le particelle disperse in soluzione sono spesso caratterizzate da cariche presenti all'interfaccia solido-liquido e il potenziale che queste originano risulta avere un ruolo fondamentale nel governare la stabilità di un sistema colloidale e nel prevederne la sua evoluzione.

Nei primi studi effettuati su queste cariche si assunse l'esistenza di uno strato di ioni di carica opposta a quella della superficie della particella, definiti contro ioni, disposti in modo allineato a formare uno strato ordinato ricoprente la particella. Tale teoria, definita teoria del doppio strato elettrico, era però troppo semplice e inadeguata a descrivere correttamente il fenomeno in quanto non teneva conto sia dell'esistenza di un ulteriore strato di cariche aventi lo stesso segno della carica superficiale, definito co-ioni, sia del fatto che le cariche, adese alla superficie, sono

comunque sottoposte a spinte da parte dei movimenti termici delle molecole di solvente.

Queste considerazioni hanno portato alla formulazione della teoria del doppio strato elettrico diffuso la quale ipotizza che l'intorno ionico della particella sia costituito da due parti: una regione più interna che include ioni legati in modo relativamente forte alla superficie e uno strato esterno, o diffuso, nel quale la distribuzione degli ioni è determinata da un equilibrio tra le forze elettrostatiche e i movimenti termici. Il potenziale in questa regione diminuisce all'aumentare della distanza dalla superficie particellare fino a raggiungere il valore presente nella soluzione presa convenzionalmente come uguale a zero.

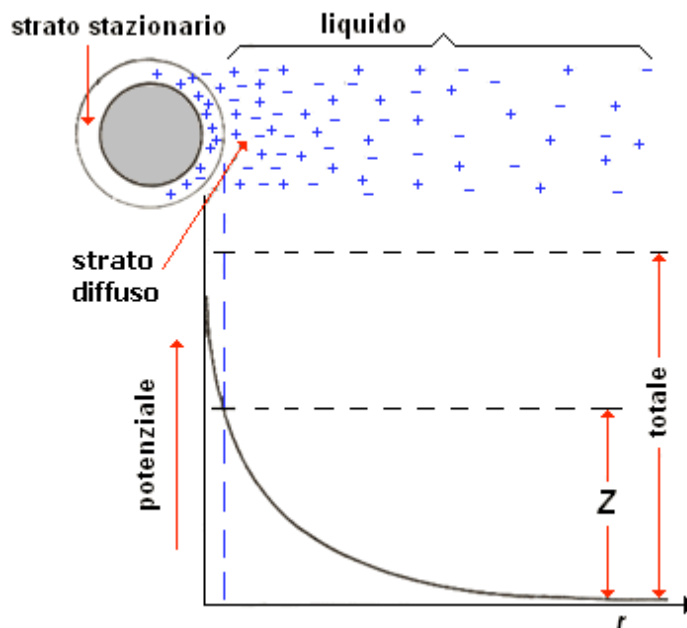


Figura 19: Rappresentazione dell'intorno ionico di una particella e potenziale zeta.

Nell'analisi del fenomeno della carica superficiale si deve però tenere presente quale è l'unità che si muove all'interno di una soluzione. Tale unità, definita unità elettrocinetica, è costituita dalla particella e dagli ioni più fortemente legati alla superficie, contenuti all'interno di una superficie, definita superficie di taglio, che è appunto la superficie che separa l'unità elettrocinetica dal resto della soluzione.

Il potenziale elettrico presente a livello della superficie di taglio è definito come potenziale ζ : il valore di tale potenziale, oltre ad essere in stretta relazione con la carica superficiale, è influenzato da diversi fattori tra i quali il pH, la conduttanza del mezzo (in generale l'intorno ionico della particella) oppure la concentrazione di un particolare additivo nei prodotti di formulazione.

Per una misurazione sperimentale di tale potenziale si sfrutta il fenomeno della microelettroforesi: in un sistema disperso posto in un campo elettrico le particelle cariche si muoveranno verso il polo opposto rispetto alla loro carica e la loro velocità di movimento dipenderà esclusivamente dal valore del loro potenziale zeta.

A bassi valori di intensità di campo tale velocità di movimento V_s sarà proporzionale al valore del campo elettrico E e la proporzione sarà espressa come:

$$V_s = \mu_e E$$

dove μ_e è definita come mobilità elettroforetica.

Sperimentalmente per la rilevazione della velocità V_s con cui le particelle si muovono si utilizza ancora una volta il fenomeno della diffusione della luce ed in particolare l'effetto Doppler che consiste in un cambiamento di frequenza di una radiazione emessa da una sorgente che si allontani o si avvicini dall'osservatore.

Le particelle cariche poste in soluzione all'interno di un campo elettrico irradiate da un raggio laser sono fonti di luce in movimento e produrranno quindi una luce diffusa avente frequenza differente rispetto alla luce incidente (occorre ricordare che una radiazione diffusa ha la stessa frequenza della radiazione incidente).

La differenza di frequenza Δf tra il raggio di luce incidente e il raggio di luce diffusa dipenderà dalla velocità di movimento delle particelle e la misurazione di questa Δf sarà alla base della determinazione di V_s .

Sfortunatamente gli spostamenti nella frequenza della radiazione elettromagnetica comunemente osservati per oggetti nanometrici sono nell'ordine dei 100 Hz che per frequenze nell'ordine di 10^{14} Hz (frequenza di un raggio laser comunemente usato) risulteranno difficilmente apprezzabili.

Per risolvere tale problema la tecnica del Laser Doppler Elettrophoresis (LDE), che viene comunemente usata per la determinazione del potenziale zeta ricorre alla suddivisione del raggio laser in due cammini ottici, uno passante attraverso la cella e uno deviato esternamente al campione con funzione di raggio di riferimento.

Il raggio di riferimento e il raggio di luce diffusa (normalmente rilevato ad un angolo di 15°) vengono quindi nuovamente ricombinati ottenendo un raggio di

luce modulata, risultato delle interferenze costruttive e distruttive tra i due raggi, avente oscillazioni nell'intensità di frequenza pari alla differenza frequenza Δf tra i due raggi (Figura 20)

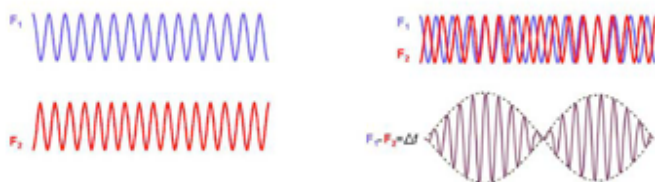


Figura 20: Associazione del raggio di riferimento e del raggio di luce diffusa.

Un'evoluzione della tecnica LDE risulta essere la tecnologia PALS (Phase Analysis Light Scattering) nella quale ad essere misurata non è più la differenza di frequenza ma la differenza di fase tra un segnale di luce modulata ad una frequenza nota (generalmente 250 Hz) e il segnale ottenuto dalla combinazione dei due raggi; anche in questo caso la differenza risulterà in relazione con la velocità di movimento V_s .

Tale misurazione permette un incremento nella sensibilità superiore di 100 volte rispetto alla LDE tradizionale permettendo l'analisi di campioni aventi mobilità elettroforetica molto più bassa. Questo consentirà ad esempio la misurazione di campioni in mezzi ad elevata conduttanza dove l'applicazione di un campo elettrico a basso voltaggio (con conseguente bassa mobilità elettroforetica) è

necessario per evitare qualsiasi rischio di danneggiamento del campione dovuto al riscaldamento per effetto Joule.

Ottenuto il valore di mobilità elettroforetica sarà quindi possibile calcolare il potenziale ζ grazie all'equazione di Henry.

$$\mu_e = \frac{2e\xi}{3\eta} f(k \cdot a \cdot \xi)$$

dove $f(k \cdot a \cdot \xi)$ è una funzione dipendente sia dal potenziale zeta che dal rapporto adimensionale $k \cdot a$, essendo a il valore del raggio dell'unità cinetica mentre k l'inverso dello spessore del doppio strato ionico.

L'equazione di Henry risulta tuttavia difficilmente applicabile in quanto il valore di $f(k \cdot a \cdot \xi)$ è dipendente da molte variabili e si ricorre pertanto ad approssimazioni.

Le equazioni solitamente considerate sono quelle di Huckel e Smoluchowski, applicabili entro limiti ben definiti dal valore di $k \cdot a$.

Per $k \cdot a \ll 1$ si utilizza l'approssimazione di Huckel:

$$\mu_e = \frac{2e\xi}{3\eta}$$

Mentre $k \cdot a \gg 1$ si utilizza l'approssimazione di Smoluchowski:

$$\mu_e = \frac{e\xi}{\eta}$$

Per la maggior parte dei colloidi dispersi in acqua o in liquidi molto polari risulta praticamente impossibile soddisfare il limite di Huckel e tuttavia anche il limite di Smoluchowski non sempre è completamente soddisfatto.

Nonostante questo la maggior parte delle misurazioni vengono effettuate con il modello di Smoluchowski il quale fornisce un ottimo compromesso tra precisione e semplicità.

3.2.5.3. Microscopia a trasmissione di elettroni (TEM e cryo-TEM)

I microscopi ottici convenzionali utilizzano una serie di lenti di vetro per curvare le onde della luce visibile e creare un'immagine ingrandita. I microscopi elettronici invece usano un fascio di elettroni ad alta energia per esaminare oggetti in scala molto piccola (nanometri) ed ottenere informazioni su struttura e composizione.

La microscopia a trasmissione di elettroni (Figura 17) utilizza un fascio di elettroni per vedere “attraverso” il campione. Tramite una sorgente si genera un flusso di elettroni che è accelerato verso il campione, il tutto sotto vuoto. Il fascio viene selezionato e focalizzato tramite aperture e lenti in un fascio monocromatico sul campione. Le interazioni che avvengono con il fascio nel campione sono quelle che,

raccolte ed elaborate, danno le informazioni richieste. Nel TEM si raccolgono gli elettroni non diffusi, cioè quelli che vengono trasmessi attraverso il campione.

I campioni per un'analisi TEM vengono preparati depositando su retini (S162-3 formvar/carbon 300 mesh Cu - Agar Scientific, Essex, UK) una soluzione diluita 1:4 con acqua di sistema nanoparticellare prodotto con la metodica sopra riportata. Si lasciano aderire 60" e successivamente tamponati lateralmente con una carta da filtro, a questo punto si depone una goccia di soluzione di acetato di uranile al 2% p/v come agente di contrasto.

Si lascia agire per 20" e poi si tampona lateralmente sempre con carta da filtro.

Le analisi TEM sono state effettuate con uno strumento Philips EM2085 (Eindhoven, Olanda) con sistema video MegaView II.



Figura 21: Immagine dello strumento TEM.

La tecnica cryo-TEM, invece, permette di osservare i campioni senza dover eliminare il mezzo acquoso. Questa tecnica è particolarmente interessante poiché la morfologia o la struttura del campione possono essere alterate dal processo di essiccamento o fissazione con agenti di contrasto. Gli oggetti vengono osservati a bassa temperatura fissati in ghiaccio vitreo ottenuto tramite rapido congelamento di un sottile film della sospensione originale. Per le analisi cryo-TEM è stato utilizzato lo strumento Philips CM120 (Eindhoven, Olanda).

3.2.5.4. Microscopia a scansione di elettroni (SEM)



Figura 22: Immagine dello strumento SEM.

I microscopi elettronici utilizzano un fascio di elettroni ad alta energia per ottenere informazioni strutturali degli oggetti di dimensioni nanometriche. Il fascio viene selezionato e colpisce in modo sequenziale il campione generando le informazioni desiderate (Figura 22). Questa tecnica presenta, a differenza di altri microscopi, molti vantaggi:

- Migliore risoluzione;
- Alta profondità di fuoco;
- Minor tempo di preparazione dei campioni;
- Interpretazioni dell'immagine semplificata ;
- Utilizzo di diversi meccanismi di contrasto per la creazione di immagini.

Vengono quindi raccolte molte informazioni che sono analizzate attraverso diversi detector.

1. In lens detector: molti elettroni secondari sono generati attraverso l'interazione degli elettroni primari con il materiale da analizzare e sono utilizzati per la generazione dell'immagine (Figura 19). Per ottenere una mappa della superficie del campione gli elettroni primari e secondari devono essere raccolti. Solo gli elettroni emessi vicino al centro del campione da analizzare generano l'immagine d'interesse. Il detector è posto sopra la lente e raccoglie direttamente il fascio. Ad una accelerazione ≤ 20 kV gli elettroni appartenenti al fascio degli elettroni primari viene ulteriormente accelerato di 8 kV. L'intensità del campo

elettrostatico generato si riduce esponenzialmente con la distanza; la distanza infatti è il primo fattore che determina il segnale e il rumore e quindi l'efficienza del detector. Le immagini appaiono piatte ma molto dettagliate.

2. SE2: è montato sulla parete della camera e per questo vede il campione lateralmente. Raccoglie principalmente elettroni secondari. La distanza dal campione influenza l'efficienza del *detector*; quando la distanza è troppo piccola vengono rilevato rumore perché la maggior parte degli elettroni cambia direzione a causa del campo elettrico generato dalla lente elettrostatica. Le immagini ottenute sono più voluminose, si percepisce la tridimensionalità del campione, vi sono pochi dettagli morfologici.

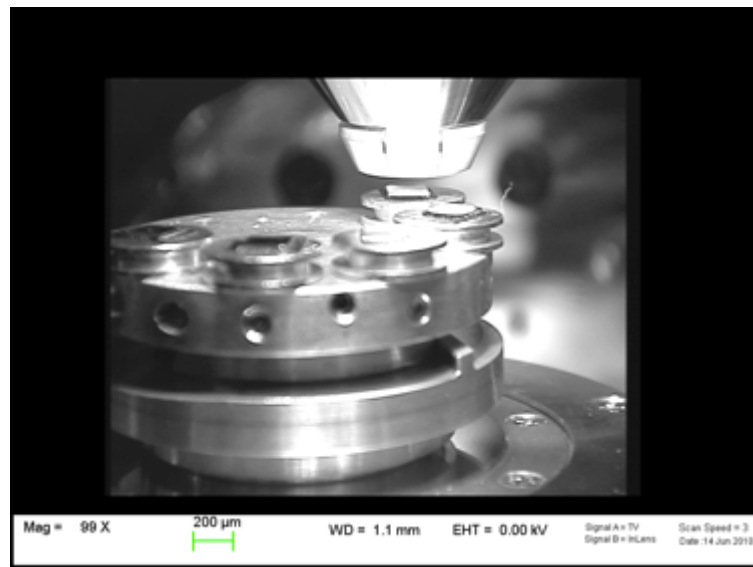


Figura 23: Immagine dell'interno dello strumento.

Una sottile lamina di silicio viene fissato sopra uno stub con una colla d'argento conduttiva per eliminare la carica statica dal fascio di elettroni che si accumula sul substrato. Il silicio è stato precedentemente lavato in acqua e sapone e poi risciacquato con acqua distillata. Infine il silicio è stato trattato con H_2SO_4 concentrato caldo, per renderlo idrofilo, per cinque minuti. E' quindi risciacquato con acqua distillata e sopra è posto il campione da analizzare. Il campione viene fatto sgocciolare per eliminare l'eccesso ed essicato.

Il microscopio utilizzato è il SEM Zeiss Supra 40, Tecnologia Gemini (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany).

3.2.6. Caratterizzazione delle NCL

3.2.6.1. Misurazione delle dimensioni e del potenziale zeta delle particelle

Le particelle ottenute sono state tutte caratterizzate dal punto di vista di dimensione e potenziale mediante DLS e PALS utilizzando un apparecchio Brookhaven ZetaPALS (Brookhaven Instrument Co., Holtsville; NY, USA) equipaggiato con programma BI-MAS per la realizzazione delle analisi DLS (Figura 20).



Figura 24: Brookhaven zetaPALS.

Per ogni formulazione di nanoparticelle sono stati preparati tre differenti lotti dai quali è stato poi ricavato il valore medio delle dimensioni e la relativa deviazione standard.

La misurazione dimensionale mediante DLS è stata condotta su campioni diluiti in acqua distillata filtrata al momento con filtri da 0,45 μm . Per la diluizione dei campioni si è utilizzato il valore di intensità della luce diffusa dalla soluzione rilevato dallo strumento che deve essere compreso tra i 50 e 150 kcps onde evitare fenomeni di scattering multiplo dovuti all'eccessiva concentrazione del campione. Tutte le misurazioni sono state effettuate previo controllo dell'efficienza dello strumento mediante standard di nanosfere di latex a dimensioni note e certificate (Duke Scientific Co., Palo Alto, CA, USA).

L'analisi del potenziale zeta è stata invece condotta mantenendo i campioni nel mezzo di produzione come tali senza ricorrere ad alcuna diluizione sfruttando la tecnologia PALS che permette misurazioni di potenziale zeta anche in mezzi ad elevata conduttanza quale il mezzo di produzione delle NCL. Tale accorgimento ha permesso di non alterare l'intorno ionico delle particelle determinando quindi misurazioni più precise del potenziale zeta. Anche in questo caso le misurazioni sono state condotte analizzando almeno tre lotti previo controllo dell'efficienza dello strumento mediante il pigmento colloidale standard BI-ZR3 (Brookhaven Instrument Co., Holtsville, NY, USA).

3.2.6.2. Preparazione dei campioni

I campioni provenienti dai lotti di NCL sono stati centrifugati successivamente per separare prima il farmaco eventualmente precipitato dalle nanoparticelle e poi per separare le nanoparticelle dal farmaco non incapsulato e quindi in soluzione, nel seguente modo (Figura 25):

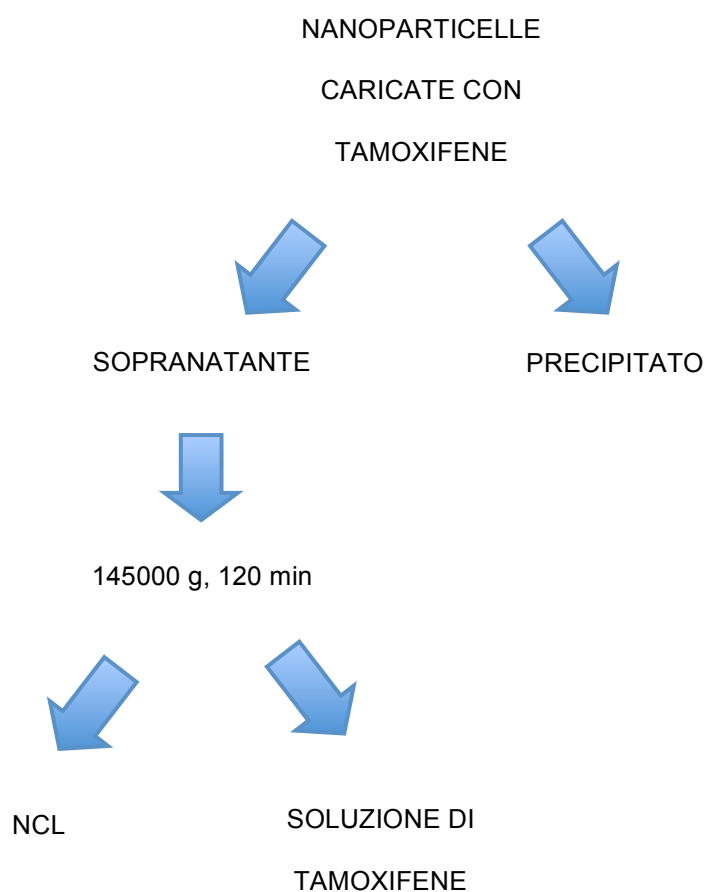


Figura 25: Schema di analisi del lotto di NCL-TAM.

Con la prima centrifuga a 3000 g si determina la presenza o meno di farmaco cristallino precipitato, mentre con l'ultracentrifuga (DuPont Instruments-Sorvall, Dupont Co., Newtown, CN, USA) si separa il sedimento costituito dalle NCL, contenenti il farmaco incapsulato, dal surnatante contenente il farmaco disciolto.

Così è stata calcolata l'efficienza di incapsulamento ed il caricamento del tamoxifene citrato nelle nanoparticelle.

I precipitati sono stati liofilizzati, per determinare il peso, e successivamente disciolti con metanolo per estrarre il farmaco sonicando per 30 min, per determinare il caricamento del farmaco nelle nanoparticelle secche.

Ogni analisi è stata ripetuta almeno tre volte.

3.2.6.3. Metodo di analisi HPLC del tamoxifene citrato e 4-OH tamoxifene

La determinazione quantitativa del farmaco precipitato, di quello in soluzione e della frazione contenuta nelle NCL è stata effettuata tramite HPLC.

Standard e campioni sono stati iniettati in colonna tramite un loop di 50 µl e rilevati con un sistema HPLC (SHIMADZU Co., Kyoto, Giappone) provvisto di una pompa regolata (LC-10AS) a un flusso di 1,2 ml/min, di un rilevatore (SPD-10A) settato a 240 nm e di un integratore (C-R6A).

Il sistema cromatografico utilizzato è quello indicato in Eur. Ph. 6.0 per il tamoxifene citrato e i suoi metaboliti:

- Colonna: Discovery[®], Supelco C₁₈, 4,6 x 250 mm, 5µm (Bellefonte, PA, USA)
- Fase mobile: 0,9 g/L di NaH₂PO₄*2H₂O e 4,8 g/L di N,N-dimetilottilammina in acqua / acetonitrile (60:40), il tutto portato a pH = 3,0 con acido fosforico (85%)
- Flusso eluente: 1,2 ml/min
- Detector: U.V. a $\lambda = 240$ nm
- Volume di iniezione: 50 µl

La retta di calibrazione è stata ottenuta diluendo 5 mg di tamoxifene citrato in 100 ml di metanolo.

Da questa soluzione sono state preparate diluizioni successive, mediante metanolo, fino ad ottenere campioni a concentrazione nota utilizzati per costruire la retta di taratura (LOD = 0,0255 µg/ml, LOQ = 51,0000 µg/ml; range di linearità: 0,0255-51,0000 µg/ml) (Figura 26).

La retta di calibrazione per la molecola del 4-OH tamoxifene è stata ottenuta diluendo 5 mg di metabolita in 100 ml di metanolo.

Da questa soluzione sono state preparate diluizioni successive, mediante metanolo, fino ad ottenere campioni aventi concentrazione nota, utilizzati per costruire la retta di taratura (LOD = 0,026 µg/ml, LOQ = 51,500 µg/ml; range di linearità: 0,026-51,500 µg/ml) (Figura 27).

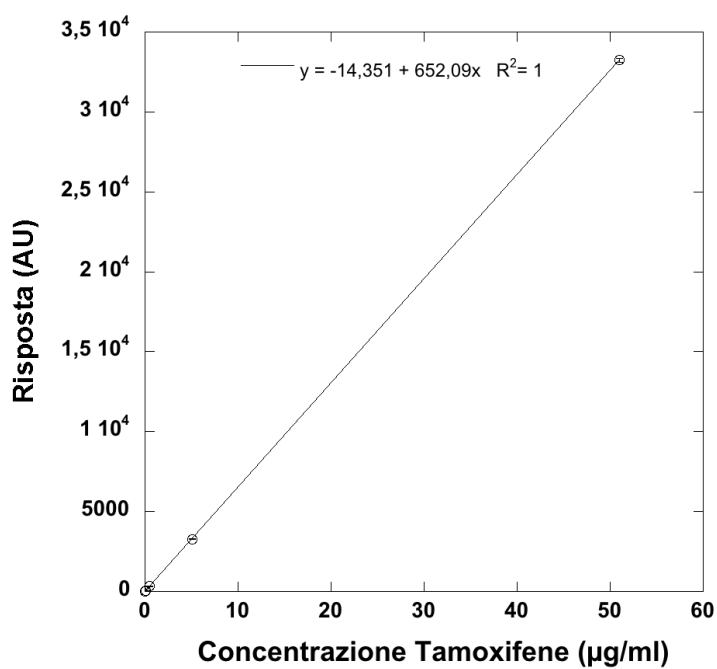


Figura 26: Retta di taratura del tamoxifene citrato.

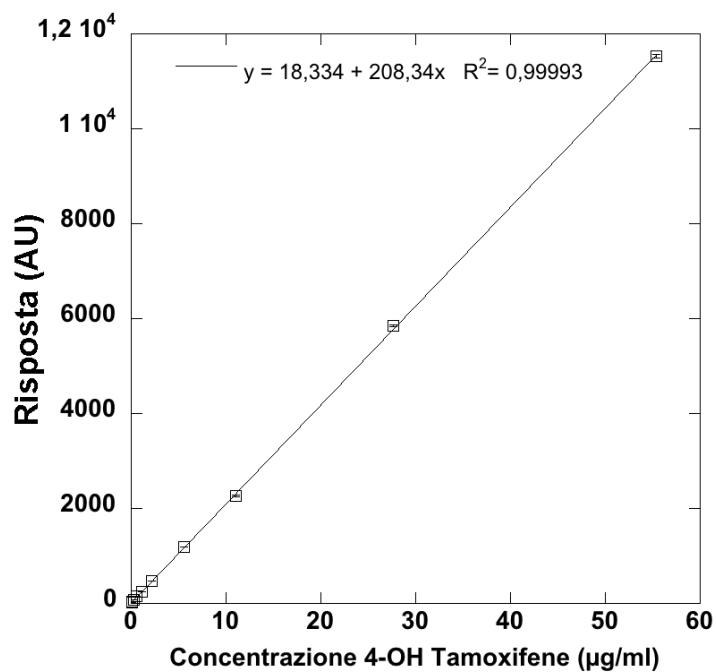


Figura 27: Retta di taratura del 4-OH tamoxifene.

3.2.6.4. Determinazione della solubilità del tamoxifene citrato

Una prerogativa dei nostri esperimenti è stata quella di lavorare in *sink conditions*: significa che la concentrazione del soluto non influisce sulla velocità del processo.

Il processo di dissoluzione può essere descritto matematicamente dall'equazione

$$\frac{dM}{dt} = kA(C_s - C)$$

dove:

- M è la massa di sostanza disciolta;
- A è l'altezza della superficie del solido esposta al mezzo di dissoluzione;
- C_s è la solubilità della sostanza nel mezzo di dissoluzione;
- C è la concentrazione della sostanza in soluzione al tempo t;
- k è la costante cinetica di dissoluzione.

Quando C è trascurabile rispetto a C_s (*sink conditions*), la velocità di dissoluzione è proporzionale alla solubilità del soluto nel mezzo di dissoluzione, cioè

$$\left[\frac{dM}{dt} \right]_0 = kAC_s$$

Si cerca quindi di creare sistemi nei quali la concentrazione del farmaco sia intorno ad un decimo rispetto al suo valore di solubilità a quel determinato pH di lavoro.

È stata calcolata la solubilità del farmaco in acqua ed a diversi valori di pH (1,2; 3; 4,5 e 7).

Per la preparazione del fluido gastrico simulato (pH = 1,2) è stata seguita la procedura riportata sulla USP XXI ed., senza l'introduzione dell'enzima pepsina.

Per le preparazioni del tampone fosfato (pH = 3), tampone fosfato 0,05 M (pH = 4,5) e tampone fosfato (pH = 7) sono state seguite le procedure riportate sulla Farmacopea Europea V ed.

Ogni campione è ottenuto sciogliendo circa 200 mg di farmaco nelle diverse soluzioni preparate. Dopo aver posto i 10 campioni (2 repliche per ogni pH) in un agitatore (Gyrotary® Water Bath Shaker Model G76, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Edison, NJ, USA), termostato a 37° C, per 24 h, si preleva un'aliquota di soluzione che si sgocciola in 10 corrispondenti Eppendorf.

Queste poste poi in centrifuga per 10 minuti ad una velocità di 10300 rpm; si prelevano da ogni eppendorf corrispondente le soluzioni limpide e si sgocciolano nei vials per l'analisi all'HPLC.

3.2.6.5. Rilascio di farmaco dai nanosistemi NCL

Poiché la via di somministrazione prevista è quella orale, per testare il rilascio del tamoxifene citrato si sono scelti come mezzi di dissoluzione il fluido gastrico simulato (senza pepsina) e il fluido intestinale simulato (con o senza pancreatina, Lipasi o Lisozima), riportati in USP XXXII ed.

I rilasci sono stati condotti in boccettini di vetro puro ambrato da 20 mL (dato che il TAM è una sostanza fotosensibile), posti in un agitatore (Gyrotary® Water Bath Shaker Model G76, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Edison, NJ, USA), termostato a 37° C, per 24 h. Ogni campione da 5.00 ml sarà composto da:

- tampone fosfato (pH=7,4);
- nanoparticelle: 55 µl (volume per ottenere una concentrazione al 100% di rilascio pari a 6,7 µg/ml);
- enzima/i, se presente/i, nelle concentrazioni opportune;
- sodi laurilsolfato (SLS): 0,5 % (p/v).

Si è reso necessario l'utilizzo dell'SLS che contrasta i fenomeni di adsorbimento del TAM alle pareti di vetro a pH 7,4. Questo detergente satura i siti aspecifici dove il TAM viene adsorbito ed in questo modo il farmaco totale è disponibile nel nostro sistema.

A tempi prestabiliti, è stata prelevata un'aliquota del campione ed ultracentrifugata per 2 h a 145000 g. Si separano in questo modo la soluzione e le nanoparticelle, contenenti entrambi il tamoxifene citrato; successivamente sono effettuate 2 diluizioni con metanolo (1:5) alternate da sonicazione per almeno 15 minuti. I campioni sono pronti per essere analizzati all'HPLC.

Con questo protocollo si è in grado di dosare e seguire il profilo di rilascio, sia della parte di farmaco nelle nanoparticelle, sia del farmaco in soluzione.

Le curve di rilascio del principio attivo prendono in considerazione solo il farmaco presente nelle nanoparticelle cioè il 60% del totale nella formulazione. Il 40% del farmaco che al tempo 0 è già in soluzione (già presente nella preparazione iniziale), non viene valutato ai fini del rilascio di farmaco.

3.2.9. Produzione di microparticelle

Il metodo scelto per produrre polveri, a partire da sistemi colloidali di nanoparticelle contenenti tamoxifene ed un eccipiente idrofilo, è stato l'essiccamento tramite tecnica spray drying. L'utilizzo dello spray dryer permette l'ottenimento di microparticelle solide secche a partire da soluzioni, sospensioni o emulsioni. Generalmente le particelle prodotte con questa tecnica sono sferiche.

Il processo prevede una rapida evaporazione del solvente in un flusso di aria calda e si divide in 5 stadi:

1. Prelievo della soluzione (Figura 28/1);
2. Atomizzazione della soluzione in gocce (Figura 28/3);
3. Miscelazione dello spray con l'aria calda circolante nella camera (Figura 28/4);
4. Evaporazione del solvente (Figura 28/4-5);
5. Separazione delle particelle secche dal flusso d'aria (Figura 24/6-8).

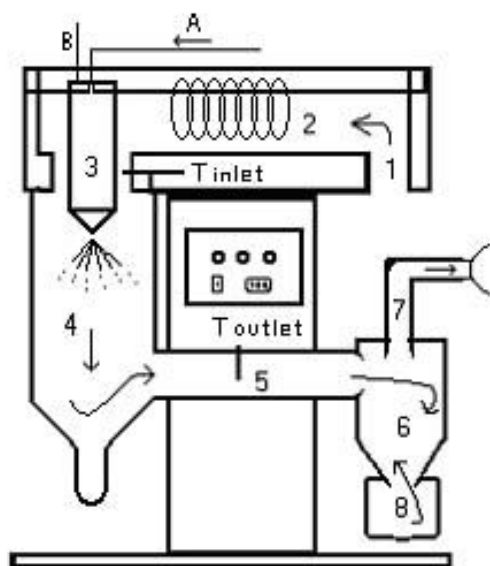


Figura 28: Schema di utilizzo di uno spray-dryer.

Le particelle ottenute sono recuperate in un apposito raccoglitore posto alla fine di un elemento detto ciclone che permette la separazione delle particelle dal flusso di aria che invece viene attirato verso l'aspiratore (Figura 28/8). La porzione che rimane attaccata al ciclone in genere non viene raccolta perché possiede un *range* dimensionale maggiore di quello desiderato. Le caratteristiche delle polveri prodotte vengono controllate sia dai parametri di formulazione della soluzione colloidale che viene spruzzata che dai parametri di processo. Il tempo di permanenza della goccia nella camera influenza il tempo di essiccamento. Questo è determinato dalle dimensioni della camera e dalla velocità del flusso d'aria essicante.

Lo strumento utilizzato è il mini spray dryer Buchi 191B® (Buchi Labortechnik Ag., Flawill, Svizzera) (Figura 29).



Figura 29: Esempio di uno spra- dryer.

Le polveri ottenute durante questo lavoro di tesi sono state prodotte a partire da soluzioni colloidali di nanoparticelle. La soluzione colloidale è composta da 182 ml di acqua distillata filtrata con filtro 0,2 μm , 16 ml di soluzione metanolica di lecitina al 2,5%, 120 mg di tamoxifene, 2,0 ml di chitosano (25% del composto solido totale). Infine, alla soluzione colloidale prodotta, sono stati aggiunti 1,2 g di eccipiente idrofilo (75% del composto solido totale). Sono stati spruzzati lotti contenenti come eccipienti idrofili α -ciclodestrine, β -ciclodestrine, maltodestrine e trealosio con i seguenti parametri di processo:

- Flusso d'aria: 600 l/h
- Temperatura d'ingresso: 95-100°C
- Temperatura di uscita: 50-55°C
- Velocità di alimentazione: 2 ml/min

3.2.10. Preparazione di fluido gastrico simulato

Il fluido gastrico simulato è preparato con 2,0 g di NaCl e 7 ml di HCl. Si porta a volume fino a raggiungere 1000 ml con acqua distillata. Il pH deve essere di 1,2. Non è aggiunta pepsina.

3.2.11. Preparazione di fluido intestinale simulato

Il fluido intestinale simulato viene allestito a partire dal 6,8 g di Potassio Fosfato Monobasico e 250 ml di acqua distillata. A questa soluzione sono aggiunti 77 ml di NaOH 0,2 N. Si porta a volume fino a raggiungere i 1000 ml con acqua distillata. Il pH deve essere di $6,8 \pm 0,1$ [28].

3.2.12. Caratterizzazione chimico fisica delle polveri

Sulle polveri prodotte sono state effettuate le seguenti analisi:

- Analisi dimensionale tramite rifrattometria laser;
- Caratterizzazione morfologica;
- Titolo.

3.2.12.1. Distribuzione dimensionale delle polveri

L'analisi dimensionale delle polveri prodotte tramite spray dryer è avvenuta per i lotti contenenti α ciclodestrine e β ciclodestrine mediante un Mastersizer (Malvern Instrument Ltd, Malvern, UK) (Figura 30).



Figura 30: Immagine dello strumento Malvern Mastersizer.

Lo strumento sfrutta la tecnica della diffrazione laser dove la luce prodotta da una sorgente viene difratta da una particella con un angolo inversamente proporzionale alla sua dimensione. La sorgente di luce è costituita da un fascio laser di Elio/Neon. Il segnale registrato genera una distribuzione dimensionale corrispondente al *diametro volume sferico equivalente* cioè il diametro di una particella sferica che possiede un volume equivalente a quello della particella analizzata.

Le particelle sono state sospese in acetone e il campione è mantenuto in costante agitazione magnetica. La sospensione prodotta è quindi fatta passare in una cella colpita da un raggio laser. La lente utilizzata per l'analisi è da 45mm e permette la rivelazione di particelle tra 0,1 a 80 μm . L'oscurazione applicata è tra il 15 e il 20%.

3.2.12.2. Analisi morfologica tramite metodologia SEM

L'analisi effettuata è analoga a quella spiegata nel punto 3.2.7.2, per il lotto di nanoparticelle in soluzione colloidale.

La preparazione del campione di polveri di dimensioni microniche: fisso una punta di spatola di campione sullo stub, dove precedentemente è stato applicato un biadesivo.

3.2.12.3. Determinazione quantitativa del tamoxifene nelle polveri

Il contenuto di Tamoxifene nelle polveri è analizzato tramite metodologia HPLC. I campioni sono stati prodotti sciogliendo 50 mg di polvere in 100 ml di metanolo e lasciandoli sonicare per 20 minuti. Dalla soluzione madre sono state prelevate tre aliquote per ogni lotto di microparticelle polvere.

3.2.13. Rigenerazione di nanoparticelle nei fluidi biologici

La via di somministrazione a cui queste particelle sono destinate è quella orale. Pertanto si vuole studiare se le microparticelle, poste in fluidi biologici simulati, generino nuovamente nanoparticelle.

Una volta preparati il fluido gastrico simulato (A), fluido intestinale simulato (B) e una soluzione con acqua filtrata con filtro 0,2 μm (C), sono stati sciolti 50 mg di ogni polvere prodotta (con α - ciclodestrine, β - ciclo destrine, maltodestrine e trealosio) in 100 ml di ogni soluzione allestita (A, B, C) e sono lasciati agitare per 20 minuti con agitatore magnetico.

3.2.14. Analisi di microparticelle ridisperse in fluidi biologici simulati

Sulle soluzioni ricostituite di nanoparticelle sono state effettuate:

- Analisi dimensionale;
- Analisi del potenziale zeta.

3.2.14.1. Analisi dimensionale

L'analisi dimensionale è stata effettuata con lo strumento Brookhaven ZetaPals come descritto nel punto 3.2.7.1.

3.2.14.2. Analisi del potenziale zeta

L'analisi del potenziale Z è stata effettuata con lo strumento Brookhaven ZetaPals come descritto nel punto 3.2.7.2.

3.2.15. Cultura cellulare

La linea cellulare umana di tumore al seno MCF-7 e la linea cellulare umana di adenocarcinoma del colon Caco-2 sono fatti crescere in flasks 25 cm² o 75cm² (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA) usando come terreno di cultura DMEM addizionato di FBS 10%, L-glutamina 2mM, penicillina 50 UI/ml, streptomicina 50 µg/ml a una temperatura di 37°C e un atmosfera di 95% aria e 5% CO₂. Quando le cellule sono a confluenza, la loro adesione è stata rimossa dalla flask aggiungendo una soluzione 0,5 ml di tripsina (0,05%) e EDTA (0,53mM). Dopo si aggiungono 2,5 ml di DMEM con 10% di FBS per inattivare la tripsina. Rimescolando delicatamente la soluzione si ottiene una sospensione di cellule singole. Dopo aver contato le cellule con un emocitometro si diluiscono fino alla loro densità di seminazione e per poi venir trasferite in flasks o piastre da 6 pozzetti o da 96 micropozzetti (Corning Inc., NY, USA).

3.2.16. Studi di citotossicità

Le cellule MCF-7 sono state selezionate come linea cellulare sensibile all'azione anti-proliferativa del tamoxifene. Sono state utilizzate piastre da sei pozzetti con

una densità di semina di MCF-7 uguale a $7,5 \times 10^3$ cellule/pozzetto [84]. Questa concentrazione garantisce che le cellule siano in crescita esponenziale durante tutto l'esperimento. Prima dell'aggiunta del campione, le cellule nelle piastre sono state preventivamente incubate per 24 ore a 37°C, permettendone così l'adesione e la loro stabilizzazione. Le piastre sono state così incubate con differenti concentrazioni della sostanza test per 24, 48 e 72 ore a 37°C e a 5% di CO₂. I campioni sono stati diluiti in DMEM, mai inferiore del 90%, e la concentrazione finale di tamoxifene che è stata testata aveva un intervallo tra 0,5 e 10 µg/ml. Le stesse concentrazioni sono state utilizzate anche quando venivano testate formulazioni nanoparticellari caricate con tamoxifene. L'efficacia della preparazione è stata valutata tramite grafici in cui si vede come varia la vitalità delle cellule nel tempo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

3.2.17. Studi d'internalizzazione cellulare dei nanosistemi con citometria di flusso e microscopia confocale

Per studiare come le NCL caricate o meno con TAM interagiscano con un modello di linea cellulare Caco-2, i nanosistemi sono stati marcati con una molecola fluorescente per un'analisi con la citometria di flusso o con microscopia confocale [85-87].

La citometria di flusso è un'avanzata tecnica utilizzata per contare, esaminare ed ordinare miscele complesse di cellule. Permette un'analisi simultanea

multiparametrica statistica delle caratteristiche chimico-fisiche delle singole cellule. Le cellule sono fatte passare in un capillare singolarmente, vengono colpite da un raggio laser e la luce diffusa e quella fluorescente vengono raccolte da un detector posizionati perpendicolarmente e in linea con il fascio. I segnali raccolti vengono amplificati e trasformati in informazioni sulle dimensioni e numero ed intensità di fluorescenza delle cellule, se marcate con uno o più fluorocromi.

Per questi esperimenti sono stati impiegati sistemi NCL marcati con Fluoresceina-DHPE (i fluorocromi legati al fosfolipide sono ancorati al nanosistema, essendo incorporati nella struttura).

Il microscopio confocale è un microscopio ottico, uno strumento scientifico che si basa su una tecnologia volta ad accrescere sensibilmente la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato.

Lo strumento opera nel campo convenzionale degli ingrandimenti della normale microscopia ottica, ed è schematicamente costituito da un normale microscopio a trasmissione cui viene sovrapposto un apparato che si occupa di illuminare e rilevare l'immagine di un campione illuminato con una scansione punto a punto.

Esistono diverse tecniche per ottenere questo risultato: a disco rotante (*Nipkow disk*), Programmable Array Microscopes (PAM), e laser. Quest'ultimo tipo, il più diffuso e denominato CLSM, acronimo di confocal laser scanning microscope, è un evoluto microscopio a fluorescenza che permette di focalizzare con estrema

precisione un laser sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo (si può avere una sezione “a piani”). La sua sorgente luminosa è costituita da uno o più laser, generalmente a semiconduttore, per ogni diversa frequenza d'eccitazione richiesta. Il meccanismo di direzione del fascio luminoso viene gestito da sistemi computerizzati. Le immagini ottenute, sincronizzando col fascio di eccitazione il dispositivo di rivelazione, sono particolarmente definite e spettacolari, e possono permettere di evidenziare in diversi colori diverse molecole presenti nel preparato, permettendone di apprezzarne la tridimensionalità (esempio particolarmente apprezzabile in campo biologico, utilizzando tecniche di immunofluorescenza).

Per lo studio dell'internalizzazione dei nanosistemi lecitina/chitosano (NCL) sono invece state scelte le cellule di adenocarcinoma del colon umano Caco2, essendo prevista una somministrazione orale, come modello di epitelio intestinale.

Le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti, con una densità di $1,2 \times 10^6$ cellule per piastra, e lasciate in incubatore a 37°C ed al 5% di CO₂ per 48 ore. Al 1° giorno dopo la semina è stato effettuato un cambio del mezzo di coltura e al 2° giorno della semina le cellule sono state incubate con i sistemi colloidali fluorescenti, diluiti 1:100 con terreno di coltura DMEM senza FBS e per diversi tempi (1, 3, 6, 8 e 24 ore), sia a 37°C al 5% di CO₂ sia a 4°C (senza CO₂). Caco2 incubate per gli stessi tempi con NCL senza farmaco e NCL-TAM 600 µg/ml non marcati con Fluoresceina-DHPE ed alle stesse concentrazioni sono state utilizzate

come controllo. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate tre volte con tampone PBS, distaccate con tripsina ed analizzate immediatamente non fissate al citofluorimetro COULTER® EPICS® XL™, Beckman Coulter Inc. (Milano, Italia), equipaggiato con raggio laser di Argon a 488 nm. L'acquisizione dei dati è stata fissata a 20000 eventi per campione e l'elaborazione è stata effettuata con software EXPO32 ADC.

Per individuare dove fossero localizzati i nanosistemi nelle cellule Caco2 sono state acquisite immagini al microscopio confocale dei campioni incubati con Caco2 per 24 ore a 37°C in atmosfera a 5% di CO₂. La procedura seguita è stata la stessa utilizzata per l'analisi al citofluorimetro, con la differenza che al termine dell'incubazione e dopo i lavaggi con PBS, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo ulteriori lavaggi con PBS, le cellule sono state incubate per 12 minuti a 37°C con una soluzione 2 µg/ml in PBS di Hoechst 33342 (molecola fluorescente che si lega specificatamente al nucleo delle cellule, evidenziandolo) e con una soluzione 20 nM di MitoTracker (molecola fluorescente che si lega specificatamente ai mitocondri delle cellule, evidenziandoli) e quindi osservate con un microscopio confocale.

3.2.18. Modello di permeazione intestinale *ex vivo*

Gli studi sono stati svolti dopo approvazione dal responsabile del Concilio Etico dell'università Paris Sud (documento numero A92-019-01) in stretto accordo con la legislazione europea per gli animali da esperimento.

Per valutare la permeazione del tamoxifene caricato nelle nanoparticelle lecitina/chitosano attraverso tessuto intestinale di ratto, è stata utilizzata la camera di Ussing.



Figura 31: *Sezioni di tessuto intestinale di ratto (digiuno).*

E' stato asportato il digiuno da intestino di ratto maschio Wistar (200-250 g; Charles River, Paris) appena sacrificato, immerso in un becker in ghiaccio contenente fisiologica (NaCl 0,9%), successivamente è stato lavato e tagliato in segmenti da 2-3 cm di lunghezza (Figura 31). Dopo un'attenta valutazione visiva del tessuto, sono state scartate le sezioni che contenevano placche di Peyes.

La porzione del digiuno è stata montata nelle camere di Ussing (la superficie testata era 1 cm²) (Figura 32), sono state riempite con soluzione di Ringer a pH 7 e L-glutamina 0,2 M. Il sistema è stato mantenuto a 37°C e ossigenato continuamente con O₂/CO₂ (95%/5%). Nel compartimento ricettore è stato aggiunto l'1% (p/v) d'idrossipropil-ciclodestrina (HPCD), per aumentare la solubilità della ciclodestrina e garantire le condizioni sink del tamoxifene.

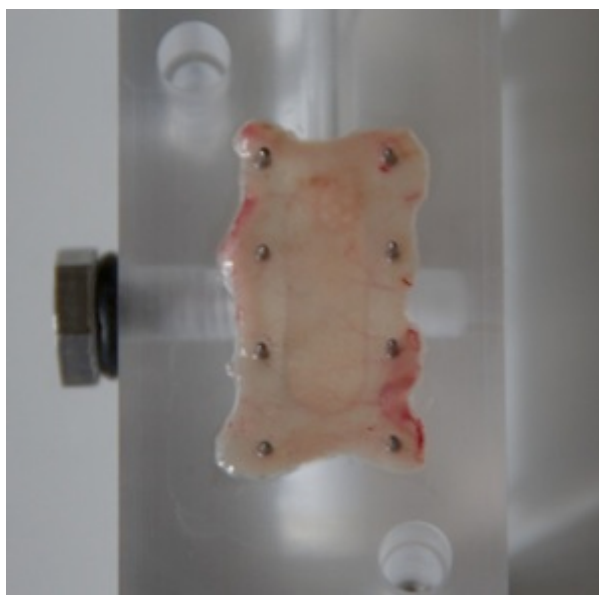


Figura 32: *Sezioni di tessuto intestinale di ratto (digiuno),
posta sulla camera di Ussing.*

Alla fine, dopo che si è raggiunta la temperatura desiderata nelle camere (37°C) per circa 30 minuti, si è aggiunto 1,34 ml di soluzione colloidale a 600 µg/ml di tamoxifene citrato, nel reparto donatore (concentrazione finale 160 µg/ml di tamoxifene citrato).

Per il controllo è stata rimpiazzata la soluzione Ringer di partenza nel compartimento donatore, con una seconda in cui era stato disperso tamoxifene citrato a una concentrazione di 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (105,44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di tamoxifene).

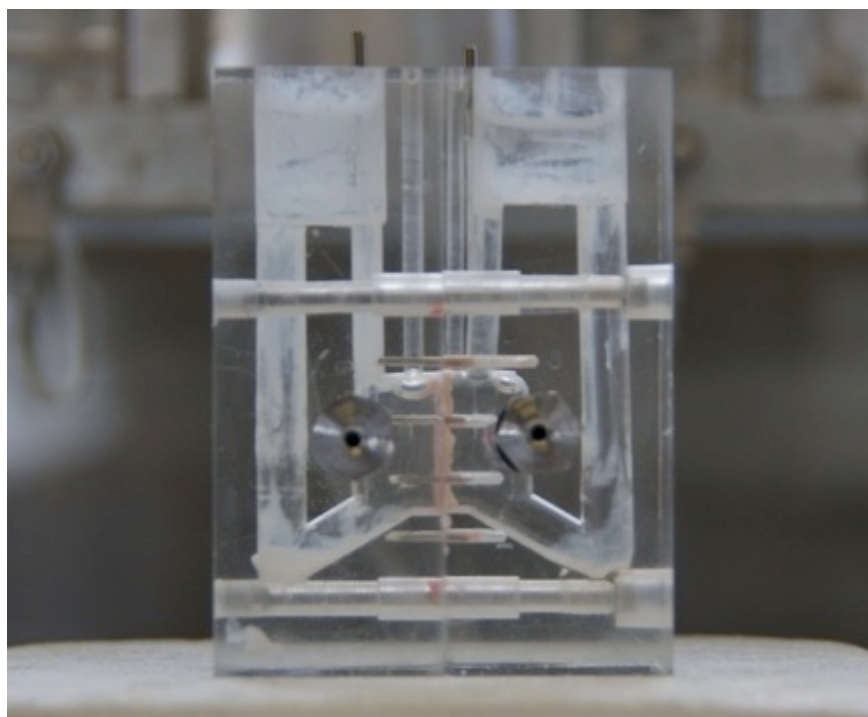


Figura 33: *Camera di Ussing montata, contenente la sezione di tessuto intestinale di ratto.*

A tempi prestabiliti (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 minuti) vengo fatti prelievi nel compartimento recettore da 75 μl che vengono successivamente aggiunti a 75 μl di metanolo e poi congelati per dopo essere analizzati mediante metodica HPLC precedentemente descritta [88; 89]. I prelievi vengono reintegrati con la stessa

quantità di soluzione di Ringer preriscaldata alla temperatura dell'esperimento (37°C).

Sono state utilizzate tre porzioni di tessuto differenti provenienti da tre differenti animali per valutare ogni formulazione, gli esperimenti sono stati ripetuti in diversi giorni. La quantità cumulativa di tamoxifene permeato (direzione dalla mucosa alla parte serosale) e del 4-OH tamoxifene, metabolizzato dal tessuto intestinale, sono state calcolate, sommate e poi messa in grafico.

Per valutare l'influenza della capacità bioadesiva delle nanoparticelle lecitina/chitosano sull'assorbimento del tamoxifene, sono stati ripetuti esperimenti di permeazione, dove è stato evitato il contatto fisico tra le particelle e la mucosa intestinale. Per questo scopo è stata posizionata una membrana di cellulosa semipermeabile (cut-off: 100000 g/mol) nel compartimento del donatore, sulla superficie del lato luminare della mucosa intestinale.

Sono stati registrati anche i parametri elettrici per valutare la vitalità del tessuto. La differenza di potenziale transmucosale (PD) è stata registrata continuamente grazie a due ponti *agar* saturati con KCl connessi a un morsetto MDVC-2C (Titis Bussines Corporation, Paris, France) tramite elettrodi al calomelano riempiti con una soluzione satura di KCl.

Un cortocircuito di corrente (I_{sc}) posto in mezzo a ogni cella ha permesso di cortocircuitare la PD nell'esperimento. Questo circuito è stato ottenuto tramite, da una parte un ponte d'agar e dall'altra grazie a un elettrodo di platino connesso a

un morsetto automatico MDVC-2C (Titus Bussines Corporation, Paris, France). La corrente fornita (I_{sc}) è stata corretta per la resistenza del fluido e registrata a tempi stabiliti. La resistenza elettrica transmurale (TEER) è stata calcolata dalla legge di Ohm:

$$TEER = \frac{PD}{I_{sc}}$$

dove PD è la differenza di potenziale transmurale e I_{sc} è la corrente di cortocircuito.

Solo i tessuti che mostravano PD maggiore di 2×10^{-3} V e I_{sc} maggiore di 40×10^{-6} A/cm² dopo 30 min di stabilizzazione sono stati utilizzati per gli esperimenti. Un ulteriore strumento di controllo è stato utilizzato alla fine dell'esperimento aggiungendo 25 µl di una soluzione etanolica 2 mM di forskolina nel compartimento seroso. La forskolina aumenta la secrezione degli ioni cloruro dalle cellule, e di conseguenza la I_{sc} . Se non ci sono aumenti nella I_{sc} , si può sospettare che ci siano danni al tessuto, e i dati relativi all'esperimento in questione vengano scartati [90; 91].

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Nanoparticelle chitosano /lecitina

Il sistema colloidale chitosano/lecitina (NCL), per la produzione di nanoparticelle caricate con tamoxifene (NCL-TAM), utilizzate in questo lavoro, ha le caratteristiche per quanto riguarda dimensioni e carica superficiale in Tabella I.

Tabella I: *Caratteristiche sistema NCL-TAM.*

Dimensioni (nm)	$226,3 \pm 16,7$
Indice di polidispersità	$0,106 \pm 0,01$
Potenziale ζ (mV)	$+ 44,59 \pm 2,32$

4.2. NCL cariche con tamoxifene citrato: caratterizzazione

Le caratteristiche delle NCL-TAM, che sono state studiate in questa tesi, sono riportate in Tabella II.

Le nanoparticelle indagate dal punto di vista morfologico mediante microscopia Cryo-TEM (Figura 34), mostrano una forma regolare sferica e una struttura multistrato.

Come si può vedere dalla Tabella II, la dimensione del sistema nanoparticellare è risultata collocarsi intorno ai 100 nm con un indice di polidispersità di $0,126 \pm 0,05$ che può essere considerato tipico di una distribuzione ristretta.

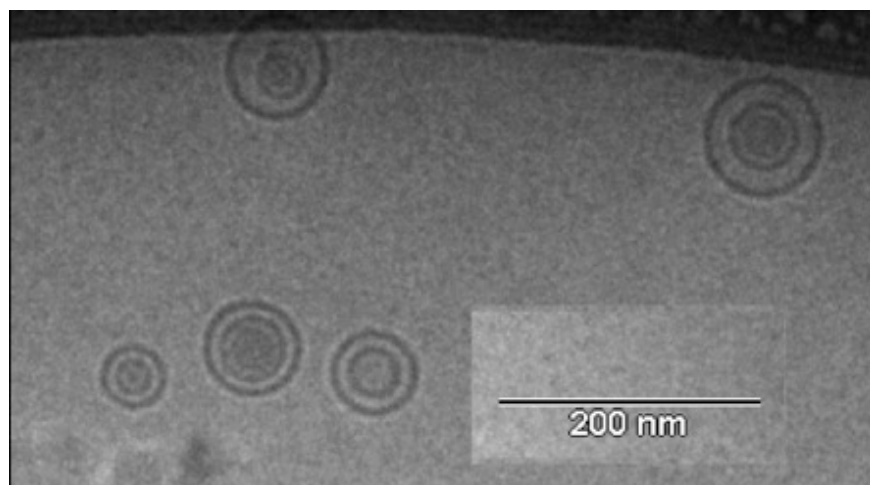


Figura 34: Foto Cryo-TEM del sistema NCL-TAM.

Tabella II: Caratteristiche sistema NCL-TAM.

Dimensioni (nm)	$134,6 \pm 4,7$
Indice di polidispersità	$0,126 \pm 0,05$
Potenziale ζ (mV)	$+ 45,28 \pm 3,34$
Conc. di farmaco totale ($\mu\text{g/ml}$)	600
Caricamento TAM nanoparticelle (%)	$60 \pm 1,82$
TAM in soluzione (%)	$40 \pm 1,38$
TAM precipitato (%)	trascurabile

Il potenziale ζ positivo garantisce al sistema stabilità in ambiente acquoso evitando la formazione di aggregati, con la conseguente flocculazione.

La quantità del farmaco caricato nel sistema nanoparticellare è risultata essere il 60% del tamoxifene totale introdotto nella preparazione.

4.3. Determinazione della solubilità del tamoxifene citrato (TAM)

Al fine di studiare l'influenza del pH sulla solubilità del farmaco, sono state compiute indagini in soluzione acquosa di TAM. Quest'aspetto è molto importante per il rilascio di un farmaco scarsamente solubile in acqua.

È stata misurata la solubilità del TAM a diversi valori di pH: 1,2; 3,0; 4,5 e 7,0.

La Figura 35 mostra i valori di solubilità del tamoxifene citrato, espressa in $\mu\text{g/ml}$, in funzione del pH. Si può osservare un valore massimo della concentrazione del farmaco a pH 3,0 che decresce fino a un valore minimo di solubilità a pH 7,0. Quest'ultimo valore è paragonabile alla concentrazione trovata a pH 1,2.

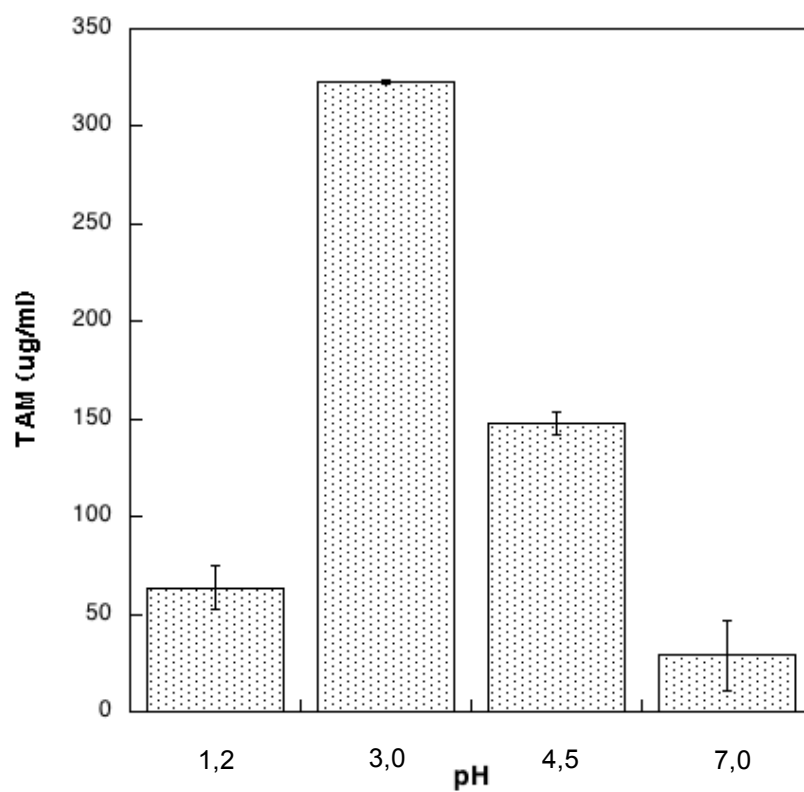


Figura 35: Solubilità del tamoxifene citrato in diverse soluzioni acquose a 25°C.

4.4. Rilascio di tamoxifene citrato dal sistema nanoparticellare lecitina/chitosano (NCL)

Poiché la via prevista per la somministrazione delle nanoparticelle è quella orale, è stata condotta un'indagine del rilascio dalle NCL-TAM a pH 1,2 ($T=37^{\circ}\text{C}$), per valutare la capacità del sistema di rilasciare il principio attivo a pH acido.

L'esperimento di rilascio, ha avuto una durata complessiva di 120 ore.

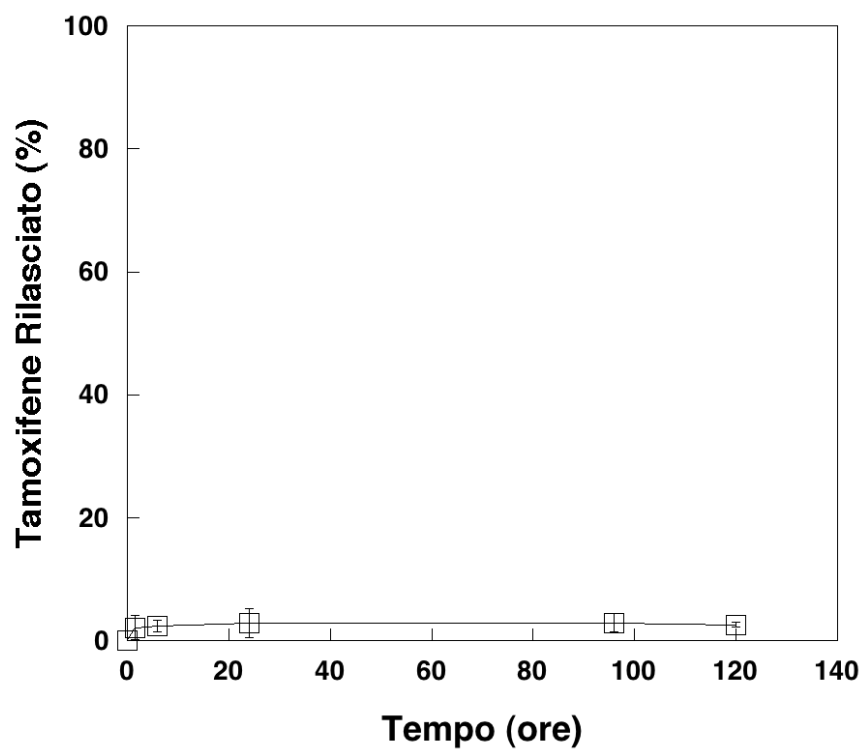


Figura 36: Rilascio di tamoxifene in soluzione a pH 1,2 in funzione del tempo.

L'analisi ha consentito di determinare che il farmaco in soluzione rilasciato dalle nanoparticelle (Figura 36), era una piccola quantità % di tamoxifene citrato che veniva liberata immediatamente senza essere seguita da ulteriore rilascio nel tempo di 24 ore. Il valore di TAM trovato in soluzione è intorno a 1-2 % della quantità di TAM presente nelle nanoparticelle.

In seguito, il rilascio di NCL TAM è stato effettuato anche in fluido intestinale simulato (pH=7,4) a 37°C in presenza di SLS, senza pancreatina; i prelievi sono stati effettuati secondo intervalli di tempo prestabiliti fino alla ventiquattresima ora.

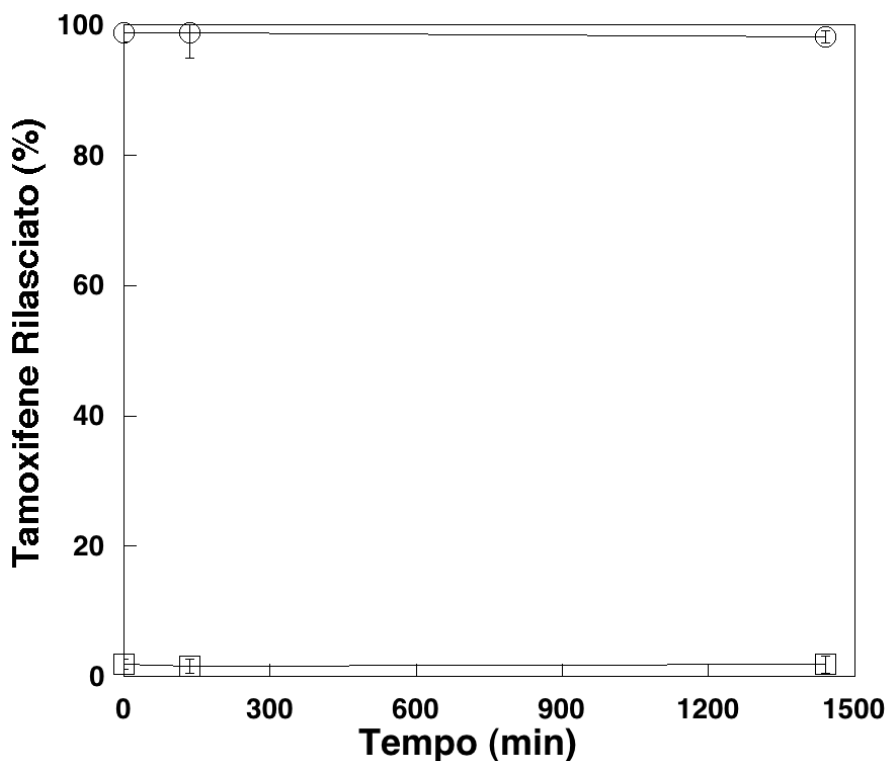


Figura 37: Tamoxifene nelle nanoparticelle (○) e in soluzione (□) a pH 7,4 con SLS in funzione del tempo.

I dati (Figura 37) mostrano che nelle 24 ore non vi è stato rilascio di TAM dal sistema nanoparticellare, in quanto la quantità di tamoxifene presente nelle nanoparticelle e in soluzione non variava nel tempo. Come descritto nella sezione 3.2.6.5., i grafici hanno una doppia curva poiché si è monitorato con determinazione HPLC diretta, sia la quantità di farmaco nelle nanoparticelle sia nella soluzione, in tempi prestabiliti. Questo conferisce un'ulteriore solidità ai dati in quanto si può fare un bilancio di massa del farmaco coinvolto negli esperimenti di rilascio.

4.5. Rilascio di tamoxifene citrato dal sistema nanoparticellare lecitina/chitosano (NCL) a pH 7,4 (37°C) in presenza di enzimi

Dopo la prima serie di esperimenti di rilascio, è stato constatato che né a pH gastrico (1,2) né a pH intestinale (7,4) si aveva un rilascio di TAM dal sistema NCL-TAM, cioè il principio attivo rimaneva bloccato all'interno delle nanoparticelle. Poiché il sistema colloidale preso in esame è costituito da lipidi e polisaccaridi, si è pensato di aggiungere al mezzo di dissoluzione alcuni enzimi che potessero degradare i due componenti fondamentali della nanostruttura.

Dapprima si è utilizzata la pancreatina 1% a pH 7,4, sistema enzimatico complesso composto di amilasi, proteasi e lipasi. Quest'ultimo enzima è specifico per la componente lipidica dei nanovettori e pertanto si presupponeva che potesse

demolire la struttura, avendo come conseguenza il rilascio di tamoxifene dal sistema.

Lo studio del rilascio è stato condotto per un periodo pari a 24 ore.

Dall'andamento delle curve ottenute (Figura 38), si evince che, all'aumentare del tempo la quantità di tamoxifene citrato all'interno delle nanoparticelle (cerchi) diminuiva, mentre il farmaco in soluzione aumentava (quadrati).

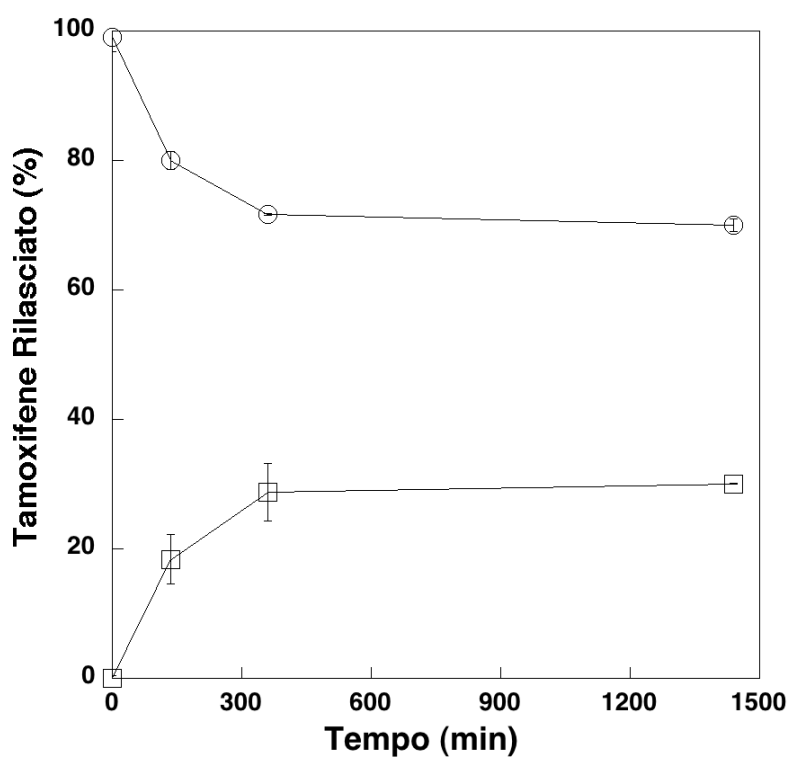


Figura 38: *Tamoxifene nelle nanoparticelle (○) e in soluzione (□) a pH 7,4 con pancreatina 1% p/v e SLS 0,5 % p/v in funzione del tempo.*

In particolare, prime tre ore si aveva un evidente rilascio di TAM dal sistema nanoparticellare quantificato intorno al 20 %; in seguito il rilascio proseguiva in maniera più lenta, quasi a plateau, fino alla ventiquattresima ora, dove raggiungeva il 30%.

Il risultato mostra che vi è stata una completa liberazione del TAM dalle nanoparticelle; il sistema enzimatico utilizzato non è stato capace di degradare completamente la nanostruttura. Di conseguenza, il passo successivo è stato quello di introdurre nel mezzo di rilascio un enzima specifico per i lipidi vale a dire una lipasi a 1000 U/ml (4,2 mg/ml).

Un'unità enzimatica (UE) è la quantità di enzima che provoca la trasformazione di 1 μ mole di substrato per minuto, a 25°C e in condizioni ottimali. Questo enzima presenta un'elevata specificità nella degradazione dei lipidi (lecitina) e l'idea è stata quella di aumentare la degradazione, con la conseguenza diretta di un aumento del rilascio del farmaco.

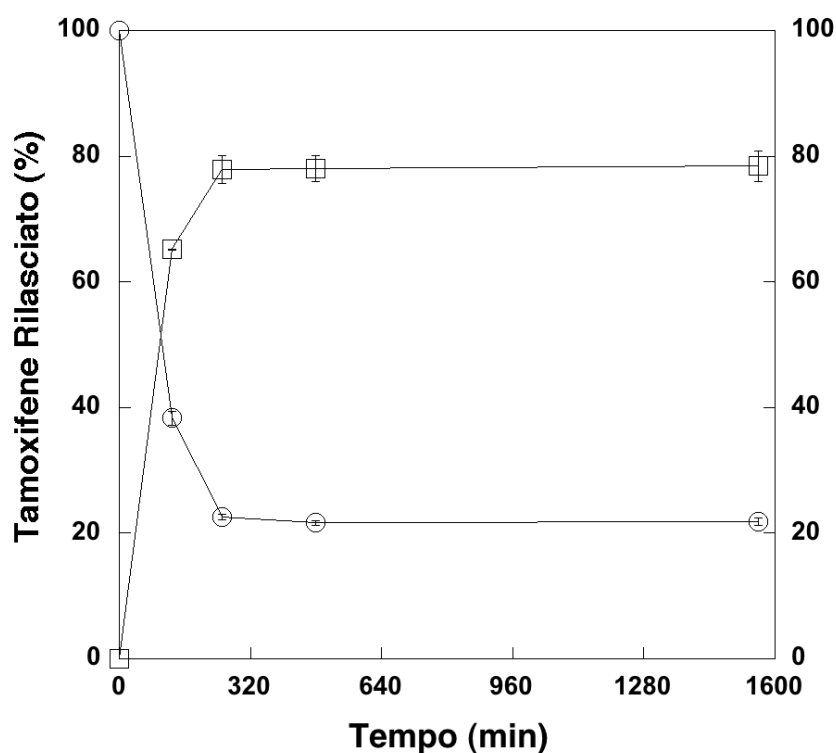


Figura 39: *Tamoxifene nelle nanoparticelle (○) in soluzione (□) a pH 7,4 con lipasi 1000 U/ml e SLS 0,5% p/v in funzione del tempo.*

Come mostrato in Figura 39, si può notare che in presenza di lipasi, viene rilasciato più del 60% di tamoxifene dalle nanoparticelle nelle prime 4 ore, per stabilizzarsi ad un valore di plateau intorno all'79-80% di farmaco liberato. Di contro abbiamo misurato che all'interno del nanosistema rimaneva ancora una quantità di TAM pari al 20-21%.

Il nanosistema studiato è composto, oltre che da lecitina, anche da chitosano, per questa ragione abbiamo pensato di introdurre nel solvente di rilascio un enzima specifico per la componente polisaccaridica come il lisozima a 159 U/ml (3 mg/ml).

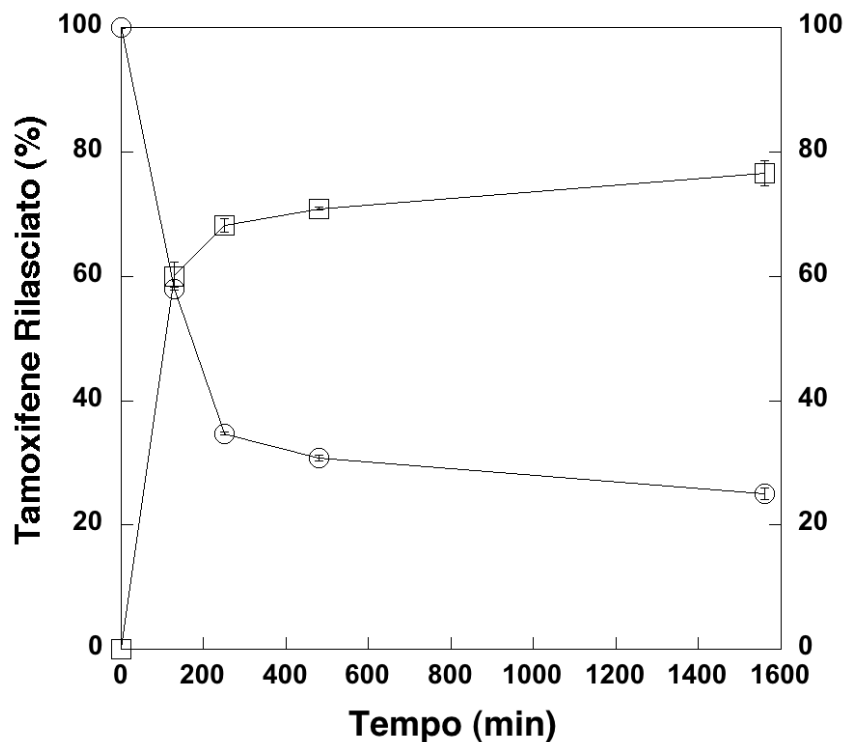


Figura 40: *Tamoxifene nelle nanoparticelle (○) e in soluzione (□) a pH 7,4 con lisozima 159 U/ml e SLS 0,5% p/v in funzione del tempo.*

I risultati di rilascio ottenuti in un mezzo con solo lisozima sono mostrati in Figura 40. Le curve mostrano una quantità di farmaco in soluzione che arriva già dopo 3 ore al 60 % e dopo 24 circa al 75% di rilascio.

In sommario, gli enzimi utilizzati singolarmente non erano in grado di portare al completo rilascio del tamoxifene contenuto nelle nanoparticelle. Si è dunque deciso di considerare i due enzimi per studiare il rilascio del farmaco dal sistema colloidale.

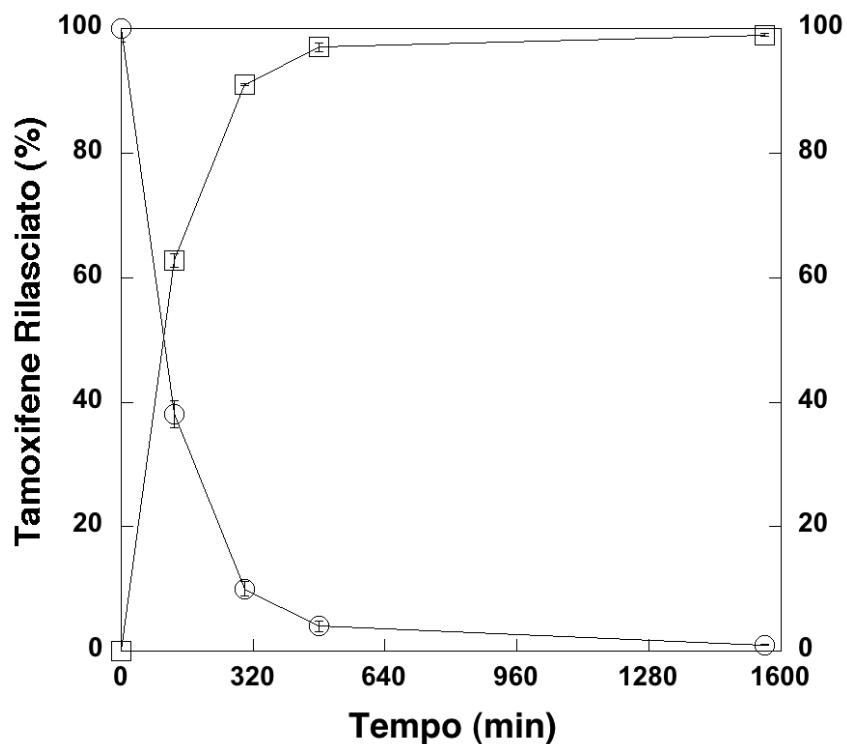


Figura 41: *tamoxifene nelle nanoparticelle (○) e in soluzione (□) a pH 7,4 con lipasi, lisozima e SLS 0,5 % p/v in funzione del tempo.*

Il rilascio ottenuto a pH 7,4 utilizzando una soluzione contenente l'unione sinergica dell'attività destrutturante della lipasi nei confronti dei lipidi e quella del lisozima nei confronti del chitosano è mostrata in Figura 41.

Il grafico mostra che l'utilizzo combinato di 2 enzimi porta alla liberazione di TAM dalle nanoparticelle arrivando ad un valore di farmaco in soluzione pari al 90 % dopo 5 ore e al 98-99 % del farmaco totale presente nelle nanoparticelle.

4.6. Visualizzazione della degradazione di NCL-TAM a pH 7,4 mediante TEM

Con questo esperimento si è cercato di visualizzare la degradazione delle nanoparticelle sottoposte all'esperimento di rilascio a pH 7,4 con i 2 enzimi (lipasi e lisozima) mediante l'analisi al TEM. La nanoparticella in assenza del sistema enzimatico durante il tempo di rilascio presentava una struttura regolare che si avvicinava alla forma sferica, come riportato in Figura 42.

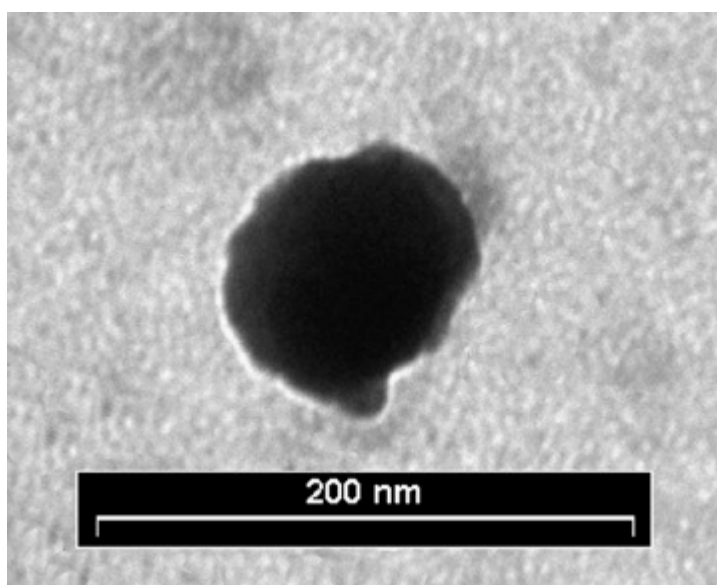


Figura 42: *Sistema nanoparticellare lecitina/chitosano caricato con tamoxifene.*

Dalla Figura 43 si possono vedere di forma globulare e di dimensioni intorno ai 30-50 nm gli enzimi lipasi. Questi infatti, sono stati depositati sul retino da soli e utilizzati come controllo. Si può inoltre vedere come si raggruppano formando piccoli aggregati.

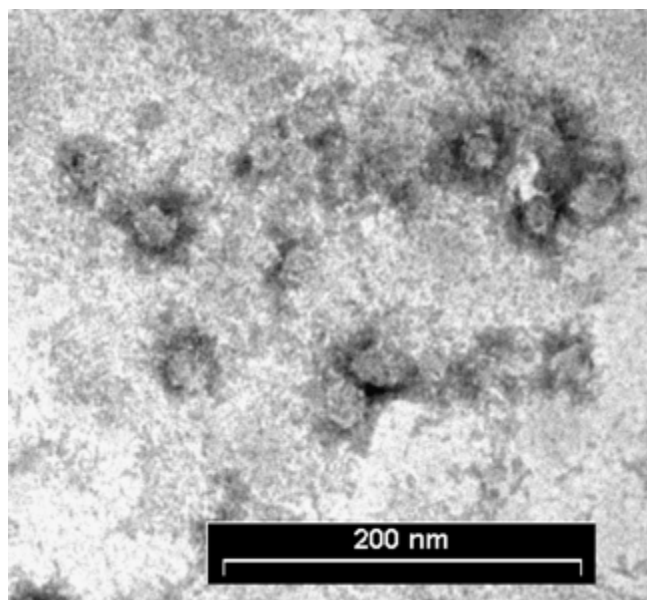


Figure 43: Foto TEM di enzimi lipasi pure da sole.

Dopo un'ora d'incubazione delle nanoparticelle con gli enzimi, le foto alla microscopia elettronica a trasmissione, mostrano le particelle che appaiono come delle sfere scure (Figura 44). Queste sono a contatto con delle particelle meno contrastate di dimensioni circa di 30-40 nm, riconducibili alle proteine enzimatiche presentate in Figura 43.

Queste immagini lasciano presupporre che le particelle siano attaccate in superficie dagli enzimi, che favoriscono la degradazione dei componenti lipidici che costituiscono la particella.

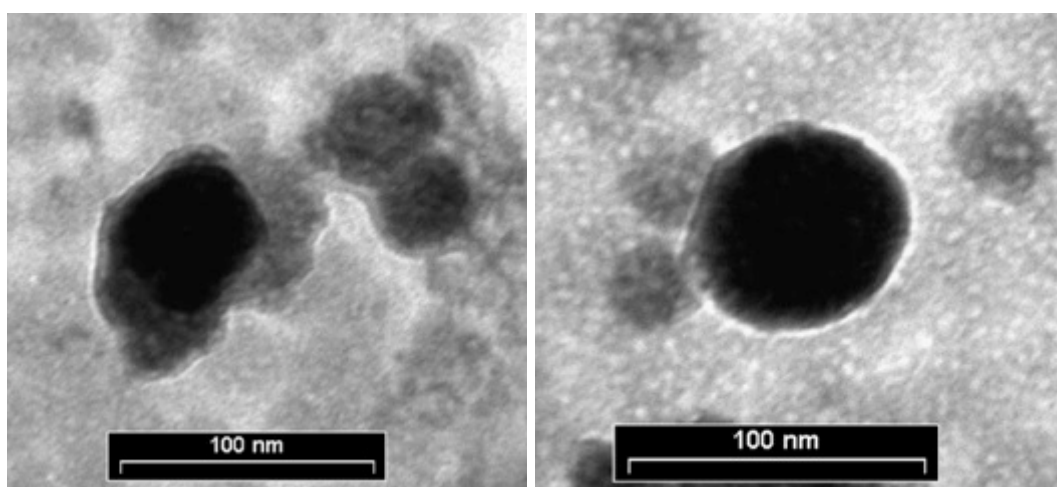


Figura 44: Foto TEM di NCL-TAM con enzimi dopo 1 h.

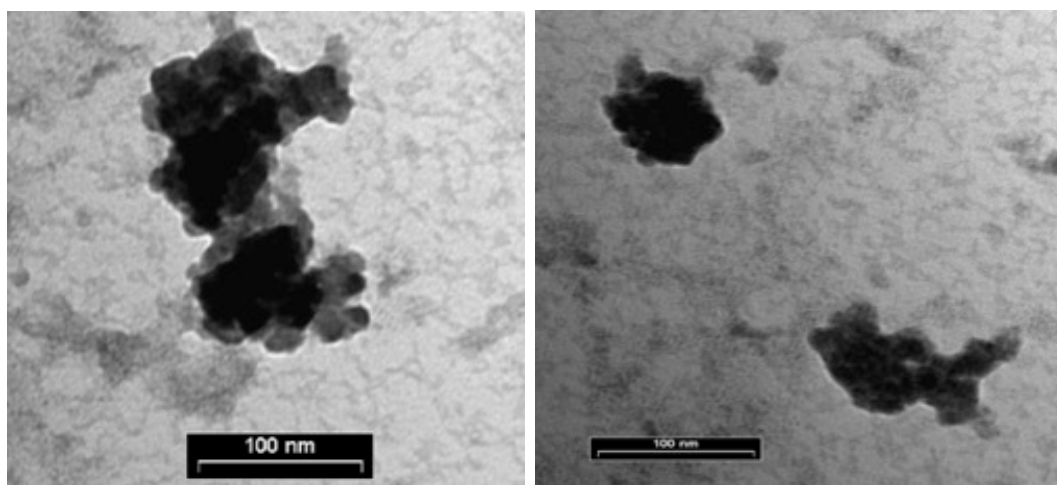


Figure 45: Foto TEM di frammenti di NCL-TAM con enzimi dopo 24 h.

Alla ventiquattresima ora (Figure 45), visionando tutta la superficie del campione non sono stati più individuati sistemi colloidali sferici, come sono stati visti alla prima ora. Infatti, si possono trovare solo delle strutture irregolari o frammenti, che confermano lo smantellamento delle nanoparticelle da parte degli enzimi introdotti.

4.7. Citotossicità MCF-7

Gli esperimenti di citotossicità, svolti sulla linea cellulare MCF-7 sensibile all'azione del tamoxifene, sono stati svolti per verificare la capacità citotossica in vitro del sistema NCL TAM, comparandolo con una soluzione di tamoxifene alla stessa concentrazione.

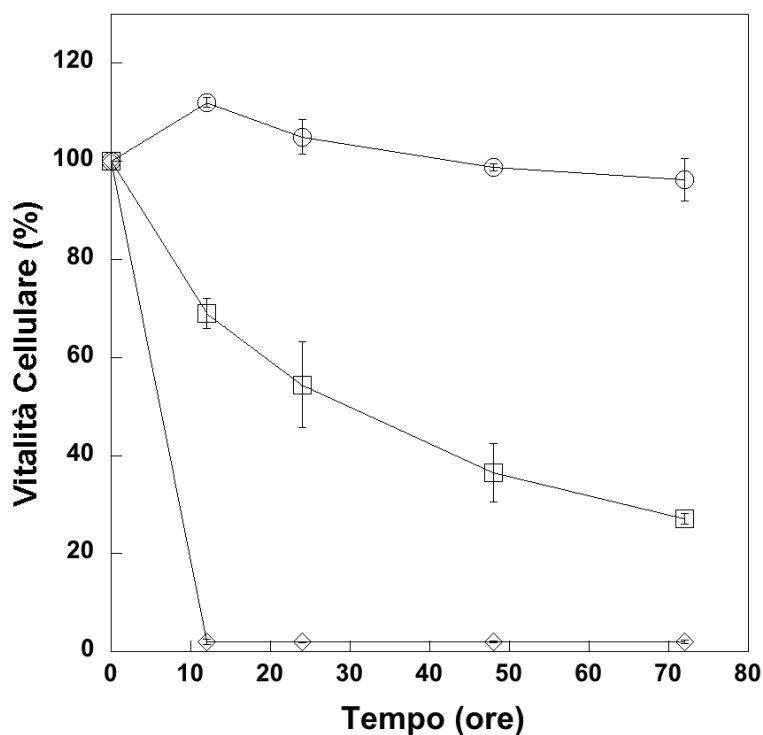


Figure 46: Citotossicità di MCF-7 trattate con: NCL (○), NCL TAM a 10 µg/ml (□) e soluzione di tamoxifene a 10 µg/ml (◇).

La Figura 46 mostra che la soluzione uccide tutte le cellule già dopo 12 ore, questo è dovuto all'immediata disponibilità del farmaco che è immediatamente disponibile in soluzione. Il grafico mostra anche che la citotossicità della

formulazione NCL TAM aumenta nel tempo. Infatti, dopo 12 ore solo il 30 % delle cellule muore, ma dopo 72 ore più del 70 % di cellule muoiono, se confrontate con il controllo.

Questo è ragionevolmente riconducibile al fatto che il farmaco non è immediatamente rilasciato dalle nanoparticelle, ma deve essere liberato prima di arrivare al recettore nucleare delle cellule e svolgere la sua azione. Un'ulteriore spiegazione è che il sistema NCL TAM debba essere trasportato all'interno della cellula, probabilmente tramite endocitosi, e qui degradato da enzimi lisosomiali. Una volta che la particella viene degradata, il farmaco rilasciato può raggiungere il nucleo e agire sul recettore opportuno.

4.8. Captazione ed internalizzazione nelle Caco2 dei nanosistemi NCL

Essendo concepiti per una somministrazione orale, c'è la possibilità che le nanoparticelle possano, incontrando il tessuto intestinale venir captate da queste. La via più probabile per l'assorbimento cellulare di particelle fino a 500 nm è il passaggio transcellulare mediato da endocitosi ad opera degli enterociti [47; 92-94]. Quindi si è pensato di valutare con un test *in vitro* la captazione e l'internalizzazione dei nanosistemi, usando come modello cellule Caco2.

Poiché la presenza del farmaco influisce sulla struttura delle nanoparticelle, sono stati testati i sistemi NCL senza farmaco e quelli caricati con tamoxifene, entrambi marcati con il fluoroforo fluoresceina-DHPE.

Le cellule, dopo incubazione con i campioni fluorescenti per diversi tempi e successivi lavaggi, sono state analizzate tramite citometria di flusso. Un aumento della fluorescenza delle cellule rispetto ai valori basali indicherà che i nanosistemi sono stati captati dalle cellule.

Dai risultati ottenuti tramite citometria di flusso (Figura 47) è emerso che la captazione avveniva in tempi brevi, raggiungendo un plateau fra la terza e l'ottava ora, aumentando alle 24 ore. Inoltre, è stato determinato che l'interazione dei nanosistemi contenenti tamoxifene con le cellule era leggermente inferiore a quella misurata per i nanosistemi senza il farmaco.

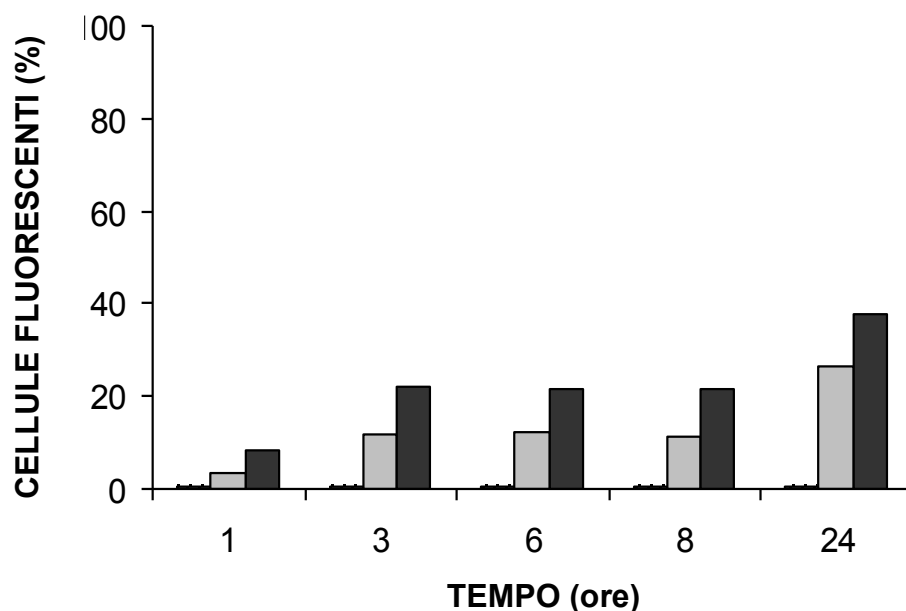


Figura 47: Andamento della fluorescenza delle Caco2 a 37°C e 5 % CO₂ in funzione del tempo di incubazione.

Controllo CACO-2 (bianco), NCL-TAM (grigio) e NCL (nero).

Le differenze evidenziate tra i sistemi carichi di farmaco e le nanoparticelle prive di tamoxifene potrebbero essere attribuite alle diverse proprietà chimico-fisiche esistenti. Infatti le NCL prive di TAM presentano carica superficiale maggiore e dimensioni doppie rispetto a quelle con TAM (Tabella I). Un altro aspetto interessante che è stato osservato da studi precedenti, non inclusi in questo lavoro, è che le nanoparticelle (NCL) contengono una quantità di chitosano molto superiore nella loro struttura (circa il 95% del totale inserito nel sistema), rispetto a quelle caricate con tamoxifene (solo il 5-10%). La quantità di chitosano infatti nel sistema NCL-TAM è solo di 5-10% del totale inserito nella preparazione, mentre per il sistema NCL senza farmaco la percentuale arriva fino al 95-98%.

La presenza di una maggior quantità di chitosano, potrebbe spiegare la maggior capacità delle particelle di entrare nelle cellule, grazie alle proprietà di miglioramento del trasporto.

Per verificare che la fluorescenza misurata fosse dovuta ad una internalizzazione conseguente ad endocitosi e non ad un semplice adsorbimento aspecifico dei nanosistemi sulla superficie cellulare, lo stesso esperimento è stato condotto anche a 4°C. A questa temperatura tutti i processi cellulari, che comportano dispendio energetico, quindi anche i trasporti attivi, vengono rallentati se non inibiti, mentre l'adsorbimento aspecifico è indipendente dalla temperatura.

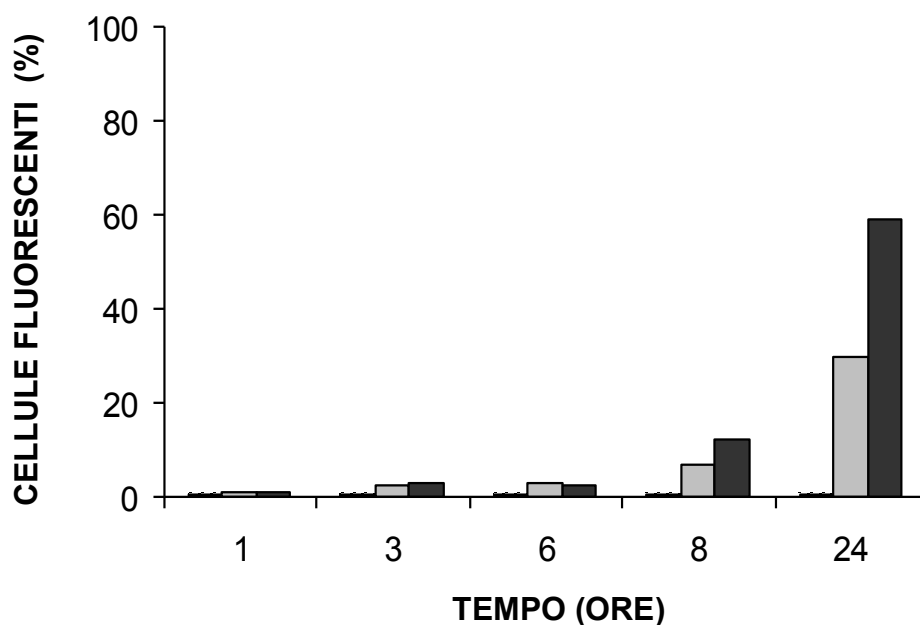


Figura 48: Andamento della fluorescenza delle Caco2 a 4°C e 5 % CO₂ in funzione del tempo di incubazione.
Controllo CACO-2 (bianco), NCL-TAM (grigio) e NCL (nero).

A 4°C la fluorescenza ottenuta era notevolmente inferiore, almeno fino a 6 ore, notando un aumento solo dall'ottava ora (Figura 48); sino alla sesta ora inoltre non si è vista una differenza di fluorescenza tra cellule incubate con NCL e cellule incubate con NCL-TAM 600 µg/ml.

A partire dall'ottava ora, si aveva un aumento della fluorescenza consistente probabilmente a causa di uno stress cellulare. Infatti, ad un'analisi visiva al microscopio ottico è stata vista la perdita della forma caratteristica delle cellule e probabilmente danneggiamento della membrana, questo perché a 4°C e senza CO₂ non si ha un microambiente per le cellule ideale.

4.9. Visualizzazione dell'internalizzazione delle nanoparticelle tramite microscopia confocale

Un successivo esperimento è stato dedicato alla visualizzazione diretta dell'internalizzazione dei nanosistemi nelle cellule CACO-2. L'apparecchiatura utilizzata a tale scopo è stato il microscopio confocale (CLSM). Attraverso un'analisi CLSM, incubando cellule con un campione fluorescente di NCL (Figura 49 e NCL-TAM (Figura 50), è risultato evidente che le nanoparticelle (fluorescenza verde) fossero all'interno delle Caco2 e localizzate intorno ai nuclei (fluorescenza blu) e al citoplasma, dove si potevano vedere i mitocondri (fluorescenza rossa).

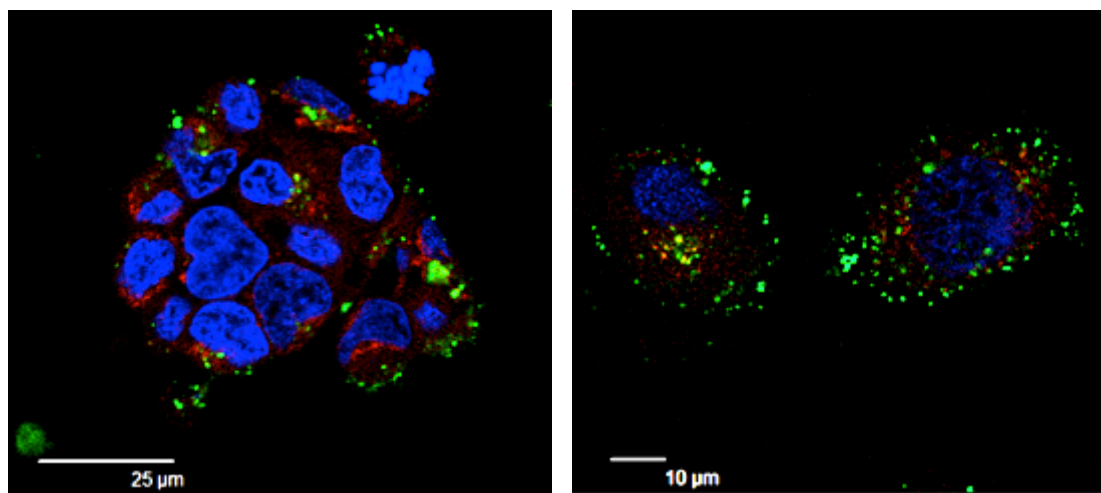


Figure 49: Foto al microscopio confocale di cellule incubate con NCL a 37°C per 24 ore.

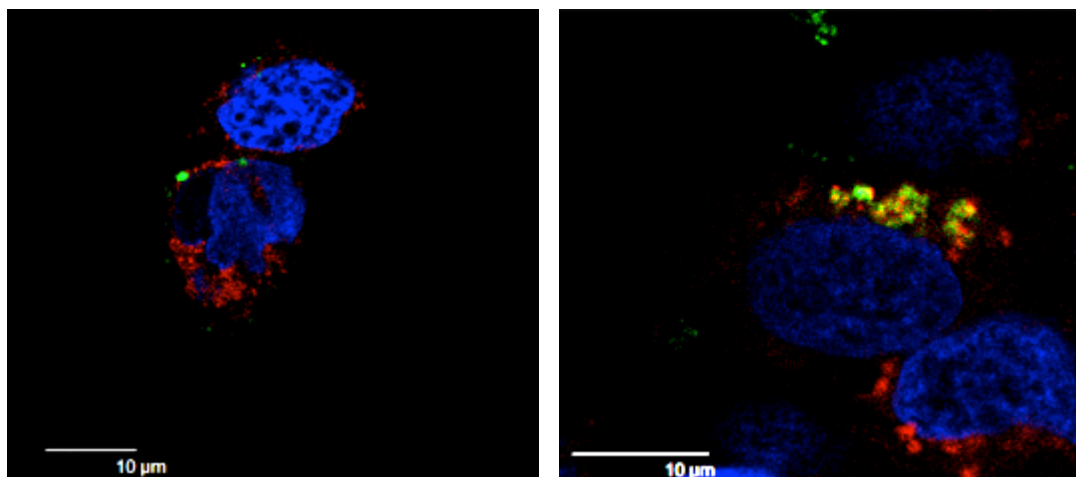


Figure 50: Foto al microscopio confocale di cellule incubate
con NCL-TAM 600 µg/ml a 37°C per 24 ore.

4.10. Permeazione intestinale

Gli studi di permeabilità intestinale sono stati svolti nel periodo trascorso all'estero presso l'Université Paris-Sud 11, UMR-CNRS 8612, Parigi. Gli esperimenti sono stati condotti come riportato nei materiali e metodi sezione 3.2.19.

Il primo studio ha riguardato il trasporto di una sospensione di tamoxifene; questo studio è stato utilizzato come controllo rispetto agli esperimenti successivi. La formulazione colloidale NCL-TAM che è stata studiata in un secondo momento, ha mantenuto le stesse concentrazioni in principio attivo della sospensione TAM e lo stesso protocollo sperimentale.

Com'è possibile vedere dal grafico di Figura 51 in ordinate viene riportata la somma della quantità di tamoxifene (TAM) passato attraverso una determinata superficie intestinale, e del 4-OH tamoxifene (4-OH-TAM) prodotto nella membrana intestinale ad opera del citocromo p-450 (Sezione 3.2.19). Siccome il metabolita mantiene l'azione farmacologica del tamoxifene, la decisione di unire il contributo del tamoxifene, con quella del suo maggior metabolita (Sezione 1.6.3) appare giustificata per l'effetto terapeutico. Dapprima è stato seguito il comportamento del farmaco e del suo metabolita in maniera cumulativa e poi sono stati evidenziati i contributi individuali delle 2 molecole nel reparto recettore della camera di Ussing. Questo comparto dovrebbe mimare la quantità di TAM e 4-OH TAM passato nel circuito sanguigno sistemico dall'intestino.

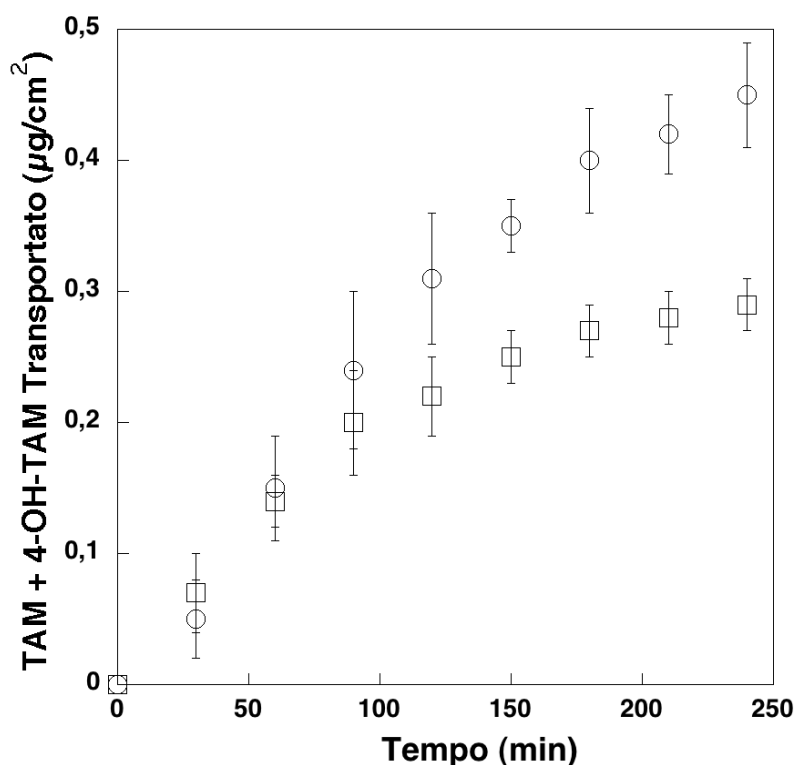


Figura 51: *Tamoxifene e 4-OH-tamoxifene trasportati attraverso il tessuto intestinale sia in sospensione (□) che nanoparticellare NCL TAM (○).*

Come si può vedere dal grafico (Figura 51) già dopo 2 ore è apprezzabile lo scostamento del comportamento della formulazione NCL-TAM rispetto a quella del TAM in sospensione. Infatti, nel caso della formulazione NCL TAM si arriva dopo 4 ore a una quantità permeata di 0,45 µg di TAM per cm², mentre con la sospensione di TAM si raggiunge al massimo 0,25 µg/cm². Questo comportamento osservato è dovuto probabilmente alla capacità delle nanoparticelle di aumentare il passaggio di farmaco attraverso il tessuto intestinale, grazie alla loro capacità di

aderire alla mucosa a causa della loro carica superficiale dovuta alla presenza di chitosano.

Com'è stato osservato in precedenza nella sezione 4.3.1., i sistemi presi in esame, sono degradati da enzimi come pancreatina e lipasi, portando come diretta conseguenza la liberazione di farmaco.

E' stato quindi studiato il trasporto della formulazione NCL-TAM in presenza di enzimi come pancreatina e lipasi, inseriti all'interno del reparto donatore insieme alla formulazione da testare.

Il primo esperimento studiato è stato condotto utilizzando pancreatina come sistema enzimatico. Questa contiene al suo interno anche lipasi che, è un enzima in grado di portare alla demolizione della struttura nanoparticellare. Dalla Figura 52 si può notare come la presenza di pancreatina al 1% (che contiene circa 60 U/ml di lipasi), faccia notevolmente aumentare il trasporto del tamoxifene attraverso il tessuto intestinale. Infatti, fin da subito si può vedere come il comportamento dei nanosistemi si discosti dal TAM in sospensione o della formulazione NCL TAM senza enzima. Dopo 4 ore si può osservare infatti come la quantità di tamoxifene permeato e del suo metabolita sia circa di circa $1,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, contro i $0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di della stessa formulazione senza pancreatina e $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ della sospensione del farmaco. Questo significa che in presenza di lipasi il trasporto aumenta di circa 3,5 volte rispetto a quando non si ha l'enzima e circa di 6,5 volte rispetto alla sospensione di tamoxifene.

L'aumento del trasporto è probabilmente dovuto a differenti fattori, come bioadesione delle particelle alla mucosa intestinale, rilascio massiccio del farmaco in prossimità del tessuto intestinale, e un aumento della permeazione dovuto alla liberazione di componenti dalle nanoparticelle, come lipidi e chitosano che migliorano la permeabilità della membrana al farmaco.

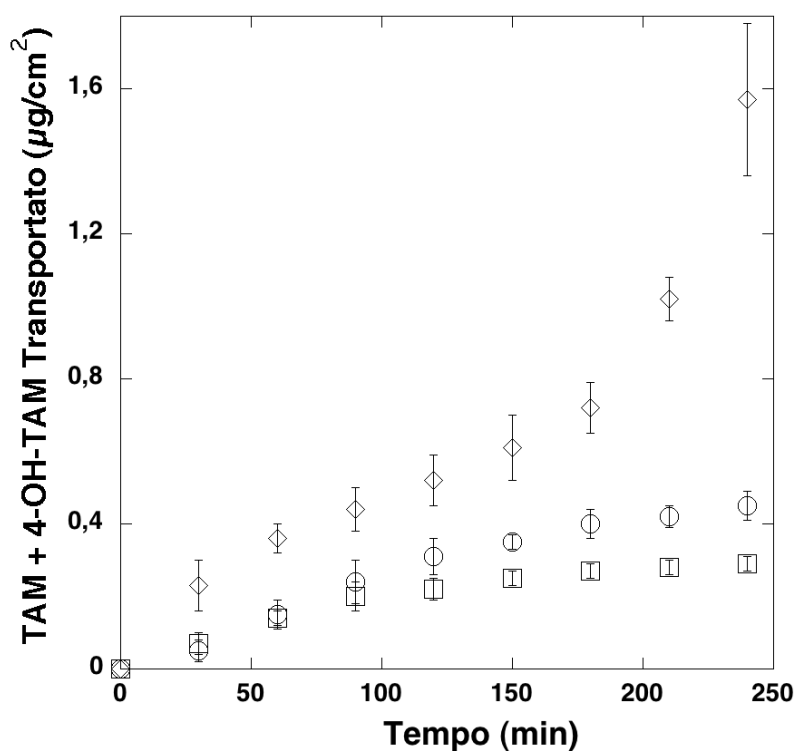


Figura 52: *Tamoxifene e 4-OH tamoxifene trasportati attraverso il tessuto intestinale sia in sospensione ($\square$) che nanoparticellare NCL TAM ($\circ$), che NCL TAM con Pancreatina 1% ($\diamond$).*

In seguito è stato studiato il comportamento della formulazione nanoparticellare in presenza dell'enzima lipasi puro. L'idea di questo esperimento era di verificare che il comportamento della pancreatina sulla formulazione NCL TAM fosse imputabile alla presenza di lipasi e altri enzimi presenti nella pancreatina. La concentrazione delle lipasi utilizzate in questo esperimento è stata di 1000 U/ml, la stessa concentrazione utilizzata per gli esperimenti di rilascio in vitro descritto nelle sezioni precedenti.

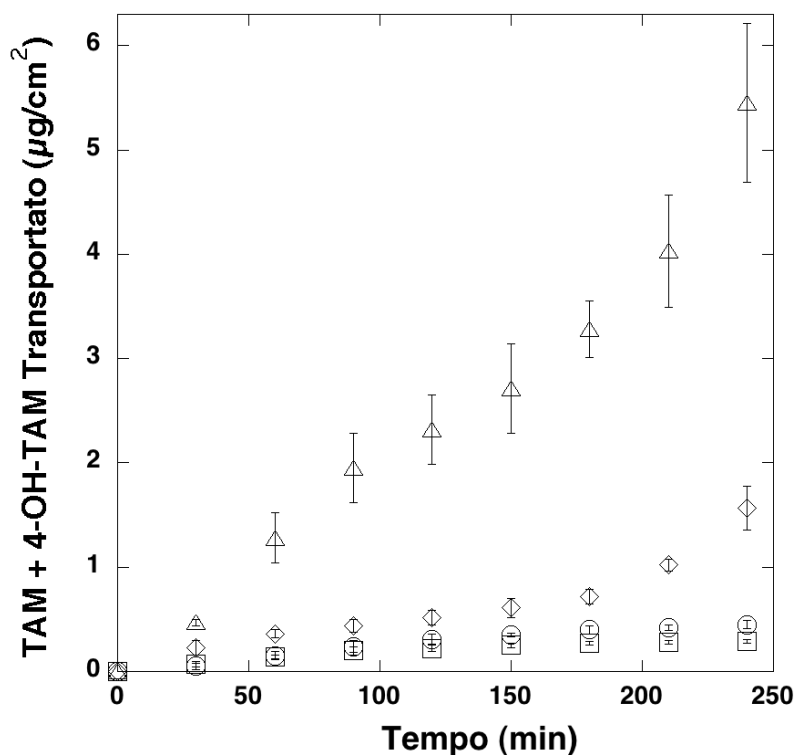


Figura 53: *Tamoxifene e 4-OH tamoxifene trasportato attraverso il tessuto intestinale sia in sospensione (□) che nanoparticellare NCL TAM (○), che NCL TAM con Pancreatina 1% (◇), che NCL TAM con lipasi 1000 U/ml (△).*

La Figura 53 conferma che effettivamente la lipasi degradava massicciamente il sistema che, nell'esperimento ex vivo, si traduceva in un aumento del passaggio attraverso il tessuto intestinale. Si può apprezzare come la presenza di lipasi, aumentava fin dai primi minuti il trasporto di farmaco. Infatti, dopo 4 ore si avevano circa 5,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ trasportati attraverso il tessuto intestinale. Questo vuol dire che si è ottenuto un incremento di 3,5 volte rispetto alla formulazione con pancreatina, 12 volte rispetto al sistema nanoparticellare senza enzimi e 22 volte in più rispetto alla sospensione di tamoxifene. Il comportamento della formulazione NCL TAM in cui è stata aggiunta la lipasi estremizza quello già osservato utilizzando solamente la pancreatina. Il risultato probabilmente è dovuto alla maggiore capacità dell'enzima di destrutturare e demolire il sistema colloidale preso in esame, con la conseguenza di aumentare la quantità di farmaco libero a contatto con la mucosa intestinale e con il tessuto sottostante.

Il passo successivo è stato quello di escludere che l'aumento del trasporto del farmaco attraverso il tessuto, visto nella Figura 53, fosse causato direttamente dall'azione degli enzimi sulla membrana intestinale. Per dimostrare questo abbiamo condotto un esperimento senza NCL TAM, ma solo con la sospensione del principio attivo, in presenza di pancreatina. Il profilo di trasporto è stato confrontato con l'esperimento precedente fatto senza enzimi.

Dalla Figura 54 si può notare come la presenza di pancreatina nella sospensione non aumenta di per se il trasporto di tamoxifene e del suo metabolita attraverso la

membrana intestinale. Si può altresì notare una leggera diminuzione, forse derivante dal fatto che il tamoxifene poteva adsorbirsi in modo aspecifico alla pancreatina sospesa nel compartimento donatore, e quindi fosse meno disponibile per il passaggio intestinale.

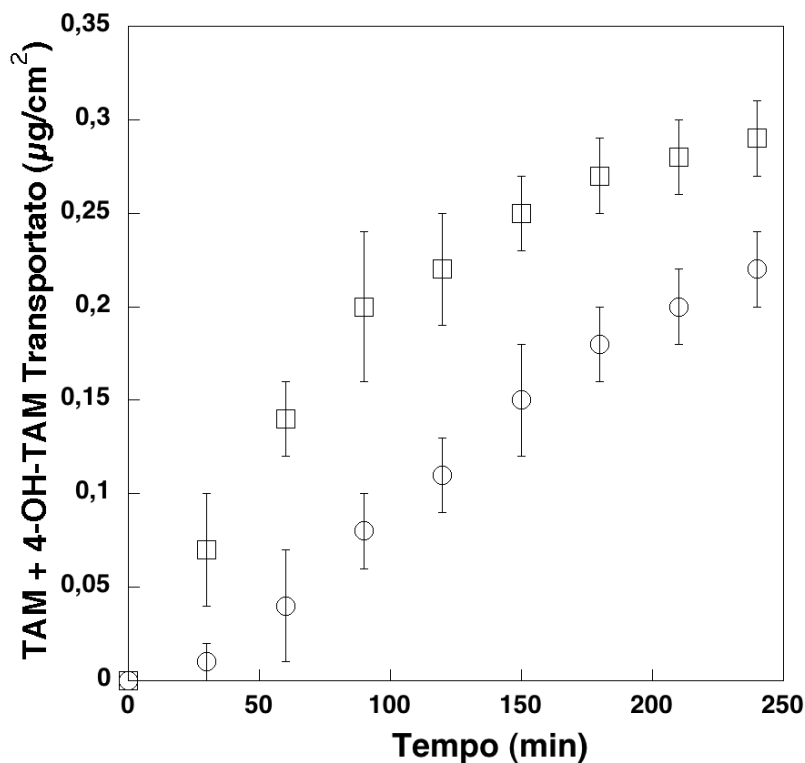


Figura 54: *Tamoxifene e 4-OH tamoxifene trasportati attraverso il tessuto intestinale in sospensione, sia in presenza di pancreatina 1% (○), che senza (□).*

Grazie a questo esperimento si è potuto confermare che l'aumento del trasporto di tamoxifene visto in precedenza era imputabile all'azione degli enzimi direttamente sul sistema colloidale e non ad un effetto indiretto sul tessuto intestinale.

Per indagare ulteriormente le proprietà della formulazione NCL TAM, sono stati modificati gli esperimenti per eliminare le possibilità di bioadesione dal sistema alla mucosa. Questi studi sono stati finalizzati a valutare l'incidenza della bioadesione sulla capacità del sistema colloidale di aumentare il trasporto del farmaco attraverso il tessuto preso in considerazione.

A questo proposito è stato inserito un setto semipermeabile tra intestino e il reparto donatore, con l'intento di permettere il passaggio solo del farmaco, ma non del sistema colloidale. Questo ha consentito di valutare se l'adesione delle particelle alla mucosa intestinale fosse un punto importante nell'aumento del trasporto del farmaco attraverso il tessuto.

Il profilo di trasporto risultante è stato confrontato con l'esperimento NCL-TAM con la presenza di pancreatina 1% senza membrana semipermeabile. Dalla Figura 55 si osserva in maniera piuttosto evidente una differenza nel trasporto rispetto alle due situazioni. Quando le particelle non aderivano alla mucosa (presenza della membrana), non si aveva un aumento del trasporto di farmaco e del relativo metabolita, cosa che accadeva nella situazione senza membrana. Questo studio ha mostrato quanto critica fosse la bioadesione del nanosistema alla mucosa intestinale; infatti, quando si aveva bioadesione il trasporto aumentava circa di 5,5 volte rispetto a quando essa veniva impedita.

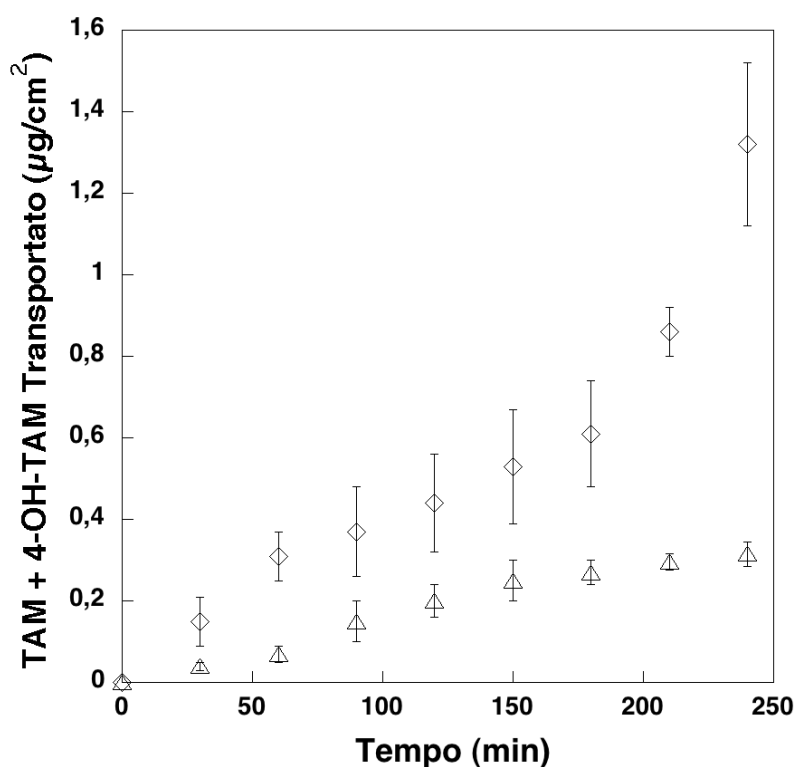


Figura 55: *Tamoxifene e 4-OH tamoxifene trasportati attraverso il tessuto intestinale in formulazione NCL TAM con pancreatina 1%:
con ($\triangle$) e senza ($\diamond$) membrana da dialisi.*

Un comportamento simile è emerso dal confronto del profilo di trasporto prodotto da questo esperimento NCL-TAM 1% pancreatina in presenza di membrana da dialisi e quello risultante dalla sospensione di tamoxifene (Figura 56).

Questo potrebbe voler dire che se il sistema perdesse la bioadesione, si comporterebbe, in termini di trasporto attraverso l'epitelio intestinale, nello stesso modo della sospensione di tamoxifene. Questo dato sottolinea l'importanza della bioadesione alla mucosa intestinale in una formulazione colloidale come quella studiata.

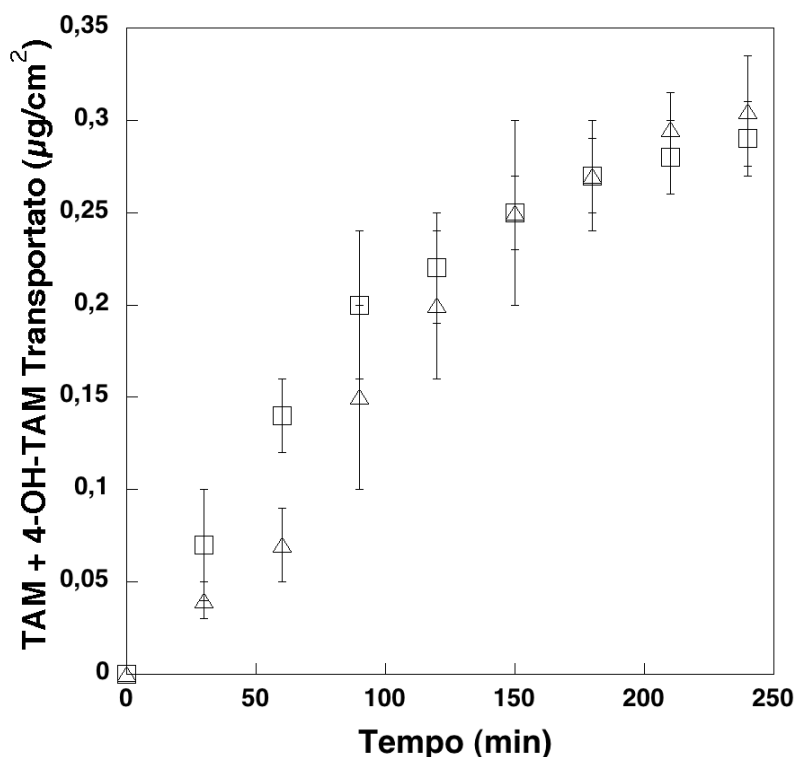


Figura 56: *Tamoxifene e 4-OH tamoxifene trasportati attraverso il tessuto intestinale in sospensione (□) e NCL TAM e pancreatina 1% con membrana da dialisi (△).*

Per verificare che la presenza della membrana semipermeabile, posta tra il tessuto intestinale e il donatore, non alterasse il trasporto attraverso il tessuto intestinale, è

stato fatto un controllo con la sospensione di tamoxifene. Questo esperimento è stato realizzando semplicemente mettendo una membrana semipermeabile, tra il donatore con una sospensione di farmaco e la mucosa.

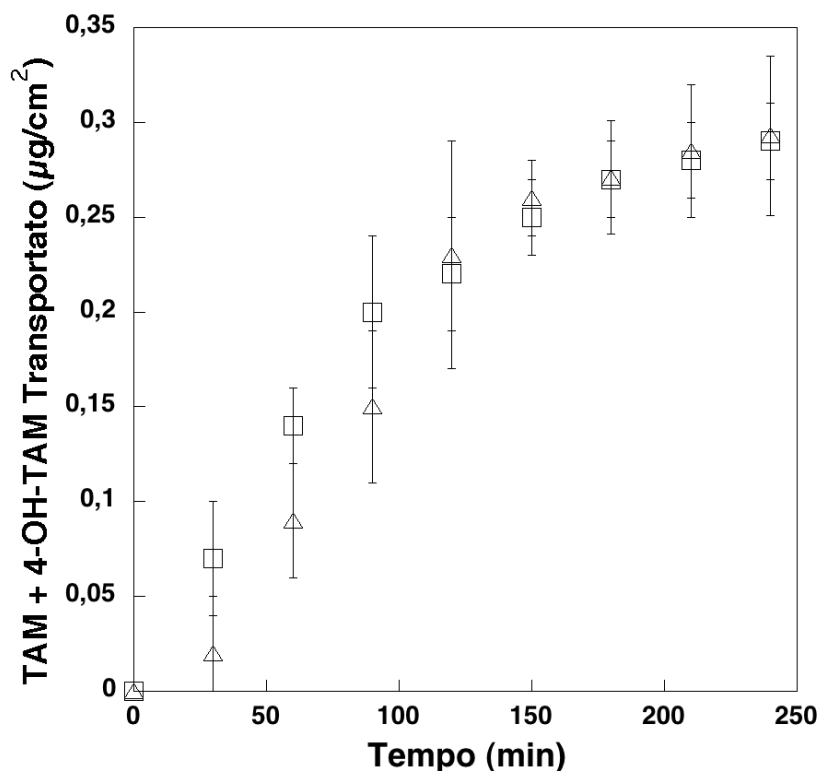


Figura 57: *Tamoxifene e 4-OH tamoxifene trasportati attraverso il tessuto intestinale in sospensione con (Δ) e senza (□) membrana.*

Dalla Figura 57 si può notare che si aveva un eguale comportamento della sospensione colloidale con o senza membrana. Questo ci assicura che non vi erano artefatti nel precedente esperimento (Figura 55) dove, nel sistema NCL TAM con

pancreatina, veniva impedita la bioadesione. La presenza o meno della membrana non ha alterato la cinetica di trasporto del TAM attraverso il tessuto.

I dati ottenuti con gli esperimenti precedenti sono stati elaborati per ottenere il flusso di tamoxifene e del 4-OH tamoxifene attraverso il tessuto intestinale.

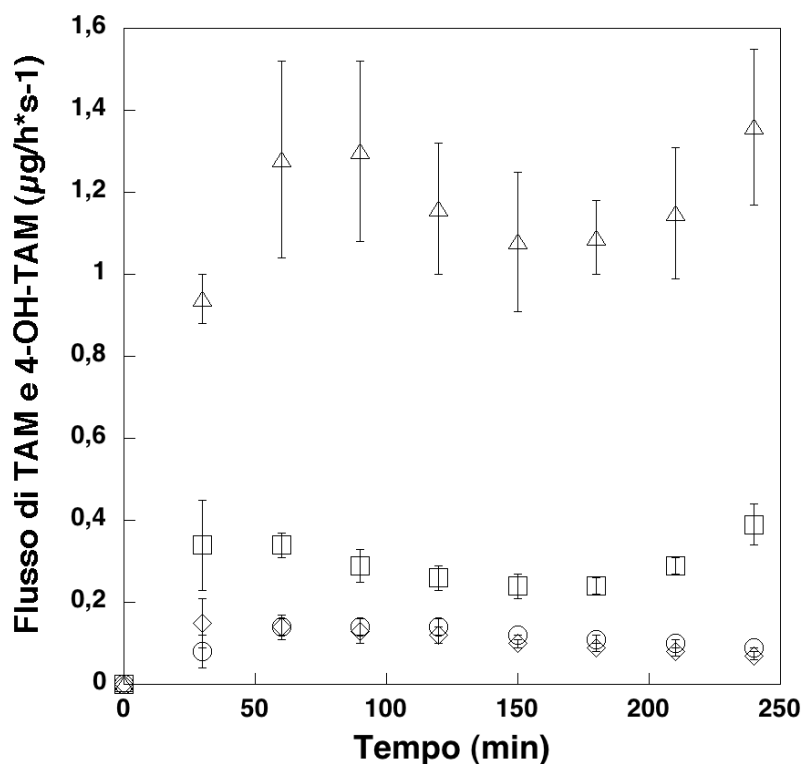


Figura 58: *Flusso di TAM e 4-OH-TAM attraverso il tessuto intestinale: della sospensione di tamoxifene (○) e delle NCL TAM (◇), con pancreatina (□) e con lipasi (△).*

Dalla Figura 58 si può notare come i flussi del farmaco attraverso la membrana intestinale si mantenevano simili quando il tamoxifene era in sospensione o NCL TAM senza enzimi. Quando è stato introdotto un enzima (lipasi) nel sistema

colloidale caricato con il principio attivo, si può notare che i flussi erano decisamente più elevati.

In presenza di NCL TAM con pancreatina il flusso era da subito maggiore di quello della sospensione di farmaco, mantenendo un valore circa costante fino alle 3 ore. Nell'ultima ora il flusso tendeva ad aumentare, ciò che non succedeva in presenza del sistema NCL TAM senza enzimi.

Utilizzando le lipasi nel sistema colloidale, si aveva un andamento simile a quando veniva utilizzata la pancreatina, ma con un flusso superiore. Questo è inferiore alla capacità della lipasi di destrutturare le nanoparticelle e quindi di liberare il farmaco.

4.11. Analisi del 4-OH tamoxifene trasportato attraverso il tessuto intestinale

Come accennato in precedenza, nel compartimento ricevente è stata analizzata non solo la quantità di tamoxifene, ma l'analisi è stata condotta per rilevare anche uno dei suoi maggiori metaboliti, il 4-OH tamoxifene che è, circa 100 volte più potente del tamoxifene. Questa molecola viene prodotta ad opera del citocromo P-450 che è ampiamente presente anche nelle cellule del tessuto intestinale, oltre che nel fegato. Come detto precedentemente, era una delle cause di variabilità inter-paziente nel trattamento con tamoxifene. Siccome ogni individuo ha isoforme differenti di questo enzima, non tutti i pazienti hanno la stessa efficienza di

conversione di tamoxifene in 4-OH tamoxifene. L'impossibilità nel prevedere per ogni paziente la quantità di 4-OH tamoxifene che verrà prodotta grazie al metabolismo intestinale del farmaco assunto, rende la terapia altamente variabile nella sua efficacia. Un metodo per aumentare l'efficacia e rendere la risposta del paziente prevedibile potrebbe essere quello di ridurre la quantità di metabolita (4-OH tamoxifene) e aumentare la quantità di tamoxifene che passa a livello sistemico. Gli esperimenti seguenti hanno mostrato una possibile soluzione per ovviare a questo limite.

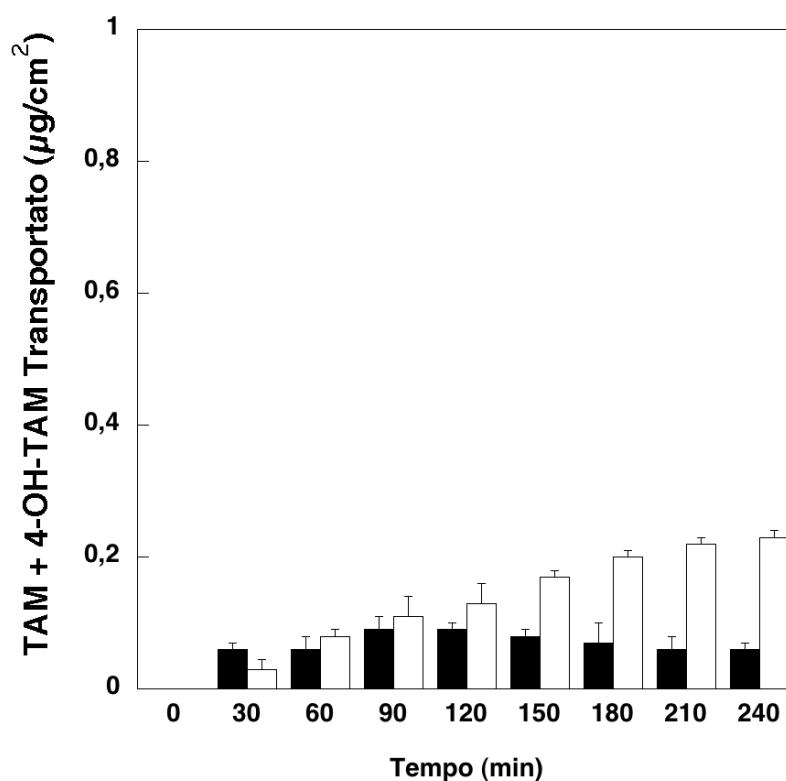


Figura 59: Tamoxifene (barre nere) e 4-OH tamoxifene (barre bianche) ritrovati nel reparto ricevente provenienti da una sospensione di tamoxifene.

Questo non impedisce al farmaco di essere metabolizzato a livello epatico, producendo un metabolita molto potente, ma garantisce che il tamoxifene sia assorbito in quantità nota attraverso l'intestino.

Il primo studio di permeazione attraverso tessuto intestinale di ratto è stato condotto utilizzando una sospensione di tamoxifene a 105 µg/ml.

All'inizio si può notare (Figura 59) un'eguale quantità di tamoxifene e del suo metabolita, ma già dopo la seconda ora il metabolita aumenta e il tamoxifene diminuisce. Alla quarta ora il 4-OH tamoxifene trovato nel ricevente è circa 4 volte più elevato del tamoxifene.

In seguito è stato condotto l'esperimento con il sistema colloidale (NCL TAM) in presenza di pancreatina alla stessa concentrazione della sospensione di tamoxifene. Come abbiamo visto in precedenza questo sistema ha il vantaggio di aumentare il trasporto e quindi il flusso di tamoxifene attraverso il tessuto.

Dalla Figura 60 si può osservare come il comportamento sia differente, non solo per il miglioramento del trasporto, ma anche dal rapporto farmaco/metabolita presente in soluzione nel ricevente. Infatti, dopo la seconda ora la quantità di tamoxifene nel compartimento recettore aumenta rispetto al metabolita.

Dopo 4 ore la quantità di tamoxifene è quasi il triplo della quantità di 4-OH tamoxifene.

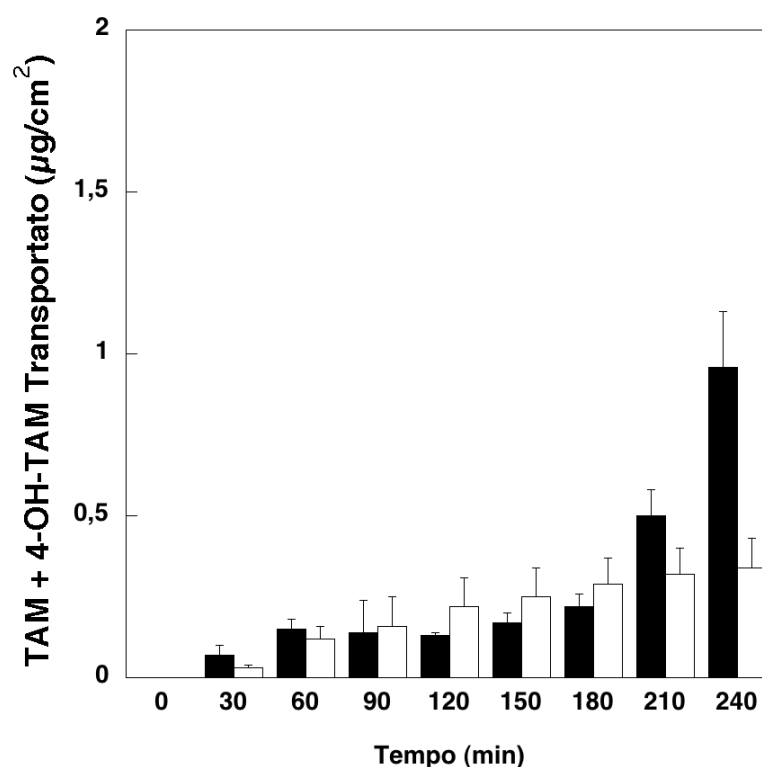


Figura 60: *Tamoxifene (barre nere) e 4-OH tamoxifene (barre bianche) ritrovati nel reparto ricevente provenienti dalla formulazione NCL TAM con pancreatina 1%.*

Dal punto di vista terapeutico questo potrebbe essere interessante in quanto viene limitata la produzione di un metabolita dagli effetti variabili, aumentando la frazione di tamoxifene che raggiunge il circolo sistemico.

L'ultimo passo è stato quello di ripetere l'esperimento utilizzando come formulazione il sistema NCL TAM e come enzima le lipasi pure a 1000 U/ml.

La Figura 61 mostra in modo clamoroso come il rapporto farmaco/metabolita, venga squilibrato a favore del tamoxifene fin dai primi minuti di trasporto.

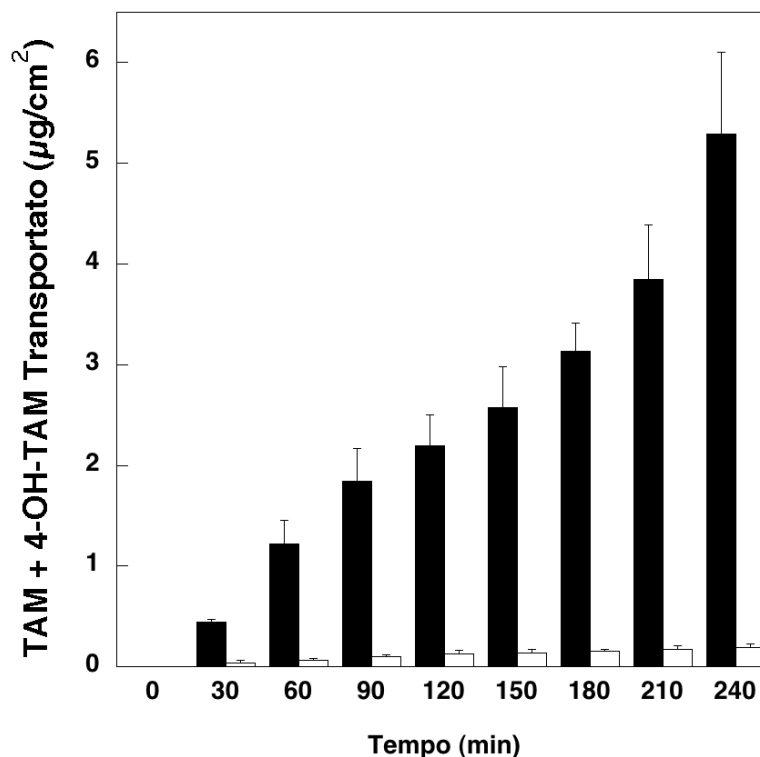


Figura 61: *Tamoxifene (barre nere) e 4-OH tamoxifene (barre bianche) ritrovati nel reparto ricevente provenienti dalla formulazione NCL TAM con lipasi 1000 U/ml.*

Dopo i primi 30 minuti il tamoxifene è già 11 volte maggiore del metabolita, arrivando alla 4° ora 35 volte maggiore.

Se confrontiamo le quantità di 4-OH tamoxifene alla 4° ora delle 3 situazioni appena illustrate vediamo che: NCL TAM con lipasi ha un valore pari a $0,15 \pm 0,04$ µg/cm²; nel caso di NCL TAM con pancreatina il valore è di $0,34 \pm 0,09$ µg/cm² e

quando abbiamo una sospensione di tamoxifene si ha un valore di $0,28 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Quest'ultimo esperimento mette in evidenza come la formulazione NCL TAM non aumenti solo il trasporto di farmaco attraverso la membrana intestinale, ma alteri anche il rapporto farmaco/metabolita nel comparto serosale aumentando la frazione di farmaco a discapito del metabolita.

4.12. Caratterizzazione delle sospensioni NCL-TAM-eccipiente per la produzione di microparticelle

Sono state preparate sospensioni di nanoparticelle di lecitina e chitosano in rapporto 20:1 p/p che contenevano tamoxifene citrato in concentrazione di 600 µg/ml. In ogni sospensione è stato disciolto un eccipiente idrofilo scelto tra α -ciclodestrina (NCL+TAM+ α CD), β -ciclodestrina (NCL+TAM+ β CD), maltodestrina (NCL+TAM+MALTO) e trealosio (NCL+TAM+TREA). L'eccipiente idrofilo costituiva il 75% del peso totale del materiale solido utilizzato per ottenere i sistemi NCL, mentre lecitina, chitosano e tamoxifene costituivano il restante 25%. Le sospensioni colloidali ottenute sono state caratterizzate e confrontate con la sospensione senza eccipiente per valutare se l'eccipiente stesso avesse influenzato le caratteristiche delle nanoparticelle di partenza.

In particolare sono stati determinati i seguenti parametri:

- Distribuzione dimensionale;
- Carica superficiale;
- Morfologia delle nanoparticelle;
- Caricamento del farmaco.

4.12.1. Distribuzione dimensionale

Lo studio della distribuzione dimensionale delle nanoparticelle è stato effettuato dopo l'aggiunta di uno tra gli eccipienti idrofili scelti.

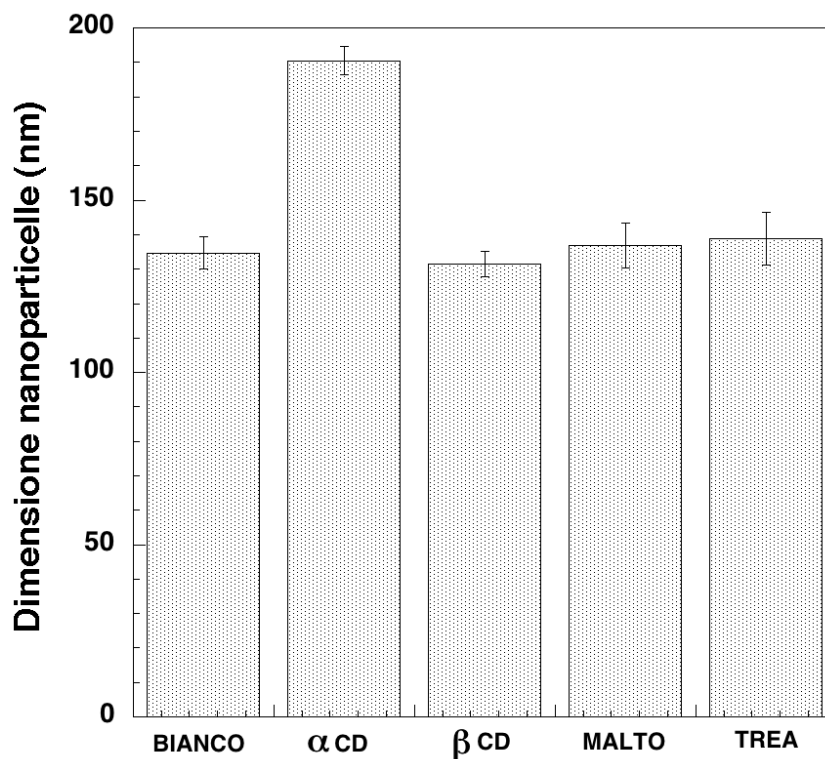


Figura 62: *Analisi dimensionale delle particelle nei lotti NCL-TAM-eccipiente.*

Il lotto NCL-TAM senza eccipienti ha una distribuzione dimensionale media di $134,6 \pm 4,7$ nm; i lotti di NCL-TAM- β CD ($131,5 \pm 3,6$ nm) e NCL-TAM-MALTO ($136,8 \pm 6,5$ nm) ed NCL-TAM-TREA ($138,8 \pm 7,7$ nm) hanno dimensioni paragonabili a quelle del lotto senza eccipiente. L'aggiunta delle α -ciclodestrine (NCL-TAM- α CD = $190,5 \pm 4,2$ nm) aumenta sensibilmente le dimensioni del sistema ma i valori non superano i 200 nm.

Tabella III: *Indice di polidispersità per ogni campione NCL-TAM-eccipiente.*

Campione	Indice di Polidispersità
NCL-TAM- α CD	0,18 $\pm$ 0,02
NCL-TAM- β CD	0,18 $\pm$ 0,02
NCL-TAM-MALTO	0,20 $\pm$ 0,02
NCL-TAM-TREA	0,17 $\pm$ 0,02

L'indice di polidispersità (Tabella III) è risultato basso per tutte le formulazioni indicando che nella sospensione colloidale non si sono formati agglomerati.

4.12.2. Carica Superficiale

Per ogni formulazione di NCL+TAM+eccipiente è stata effettuata l'analisi della carica superficiale con la tecnologia PALS per determinare il potenziale ζ . L'analisi è avvenuta nel mezzo acquoso di produzione.

La Figura 63 mostra la variazione potenziale ζ in funzione dell'eccipiente utilizzato. L'aggiunta delle α -ciclodestrine ha conferito un potenziale di $26,43 \pm 2,85$ mV alla nanoparticella, valore molto simile a quello conferito dal trealosio, $23,00 \pm 1,27$ mV .

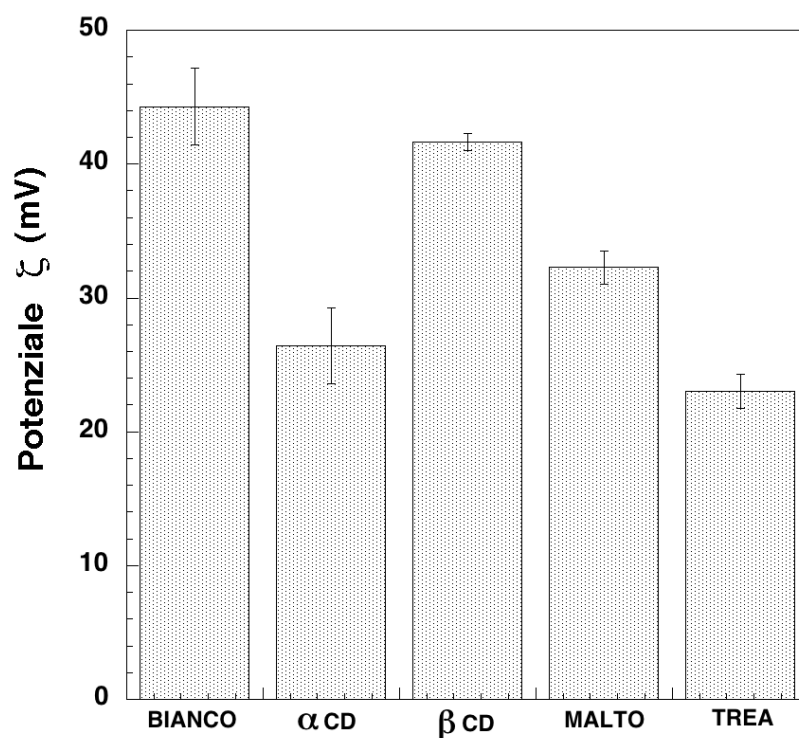


Figura 63: *Analisi del potenziale ζ delle nanoparticelle nei lotti NCL-TAM-eccipiente.*

Se si tiene in considerazione che le nanoparticelle senza eccipiente idrofilo avevano un potenziale di $44,30 \pm 2,9$ mV, si può notare che l'aggiunta delle β -ciclodestrine ha mantenuto complessivamente inalterato il sistema dal punto di vista della carica superficiale ($41,66 \pm 0,62$ mV), mentre gli altri eccipienti idrofili lo hanno abbassato sensibilmente come per esempio la formulazione NCL-TAM-MALTO ha una carica superficiale pari a $32,29 \pm 1,24$ mV.

4.12.3. Morfologia delle nanoparticelle in sospensione

Dopo l'aggiunta degli eccipienti idrofili scelti, è stata caratterizzata la sospensione del sistema colloidale (NCL-TAM).

Questi eccipienti sono stati disciolti nella sospensione di nanoparticelle al fine di permettere la formazione, per essiccamento a spruzzo, di microparticelle nella quali sono state disperse le nanoparticelle.

A seconda dell'eccipiente utilizzato, la morfologia delle strutture nanoparticellari in sospensione variava. Le immagini seguenti, effettuate tramite microscopia SEM, mostrano le diverse sospensioni.

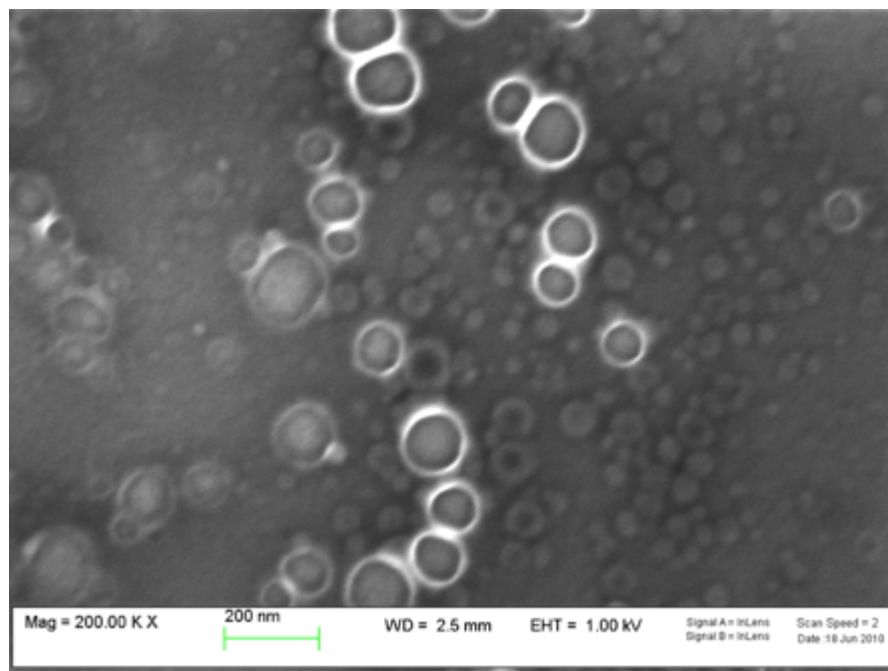


Figura 64: Immagine di NCL-TAM- α CD.

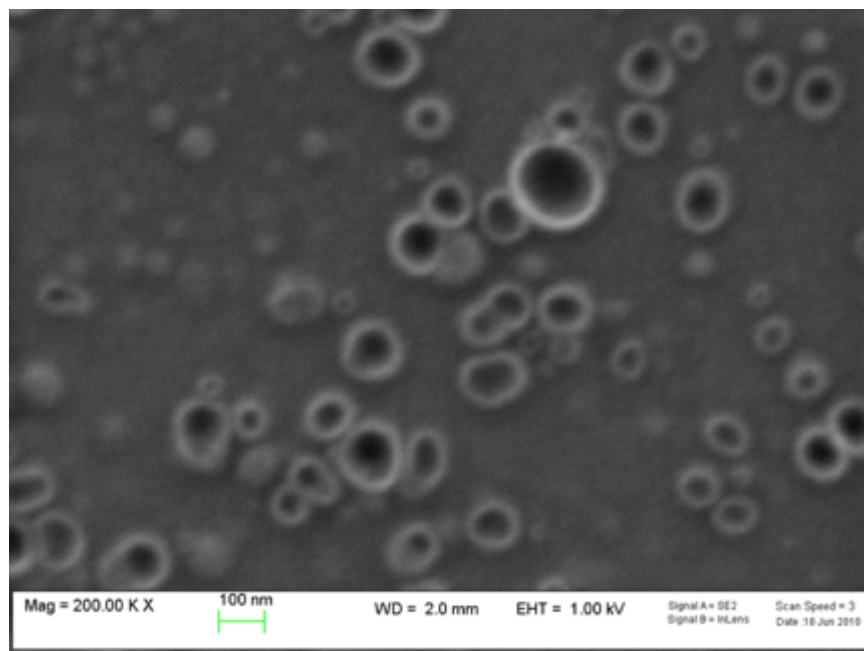


Figura 65: *Immagine di NCL-TAM- β CD.*

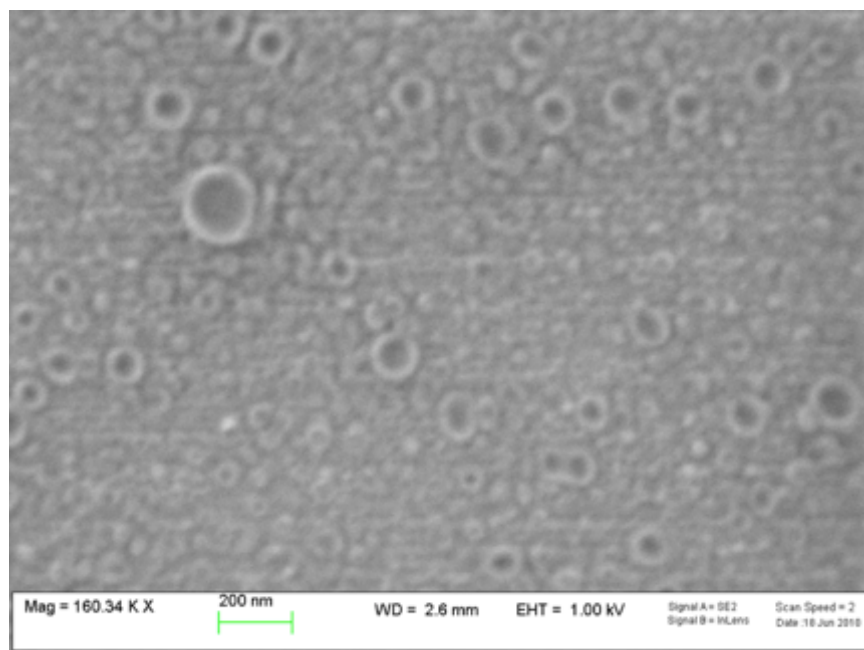
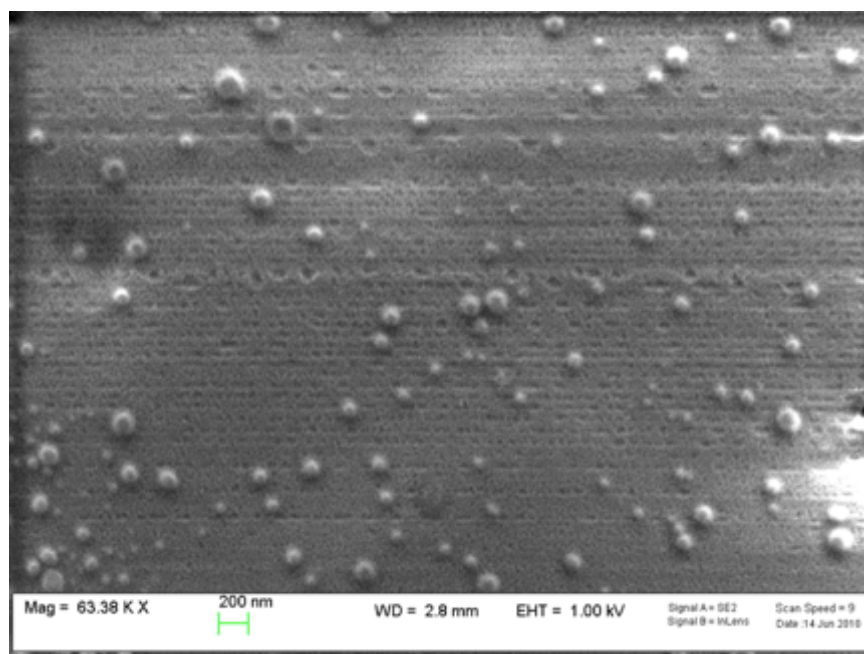


Figura 66: Immagine di NCL-TAM-MALTO.

Figura 67: *Immagine di NCL-TAM-TREA.*

Le immagini del sistema NCL TAM, alle quali sono state aggiunte α -ciclodestrina (Figura 69), β -ciclodestrina (Figura 70) e maltodestrina (Figura 71), mostrano una struttura simile tra loro: sono sferiche, le dimensioni sono comprese tra i 100 e 200 nm e presentano una corona esterna che circonda una porzione centrale ben separata.

La Figura 72 mostra che le nanoparticelle contenenti trealosio osservate nelle stesse condizioni descritte in precedenza, sono ben differenziate e di forma sferica. Le dimensioni sono comprese tra i 100 e i 200 nm, confermando i dati ottenuti dalle analisi dimensionali nella sezione 4.9.1.

4.12.4. Caricamento del farmaco

Per determinare la percentuale d'incapsulamento di TAM nelle nanoparticelle sono state prodotte quattro sospensioni con i diversi eccipienti idrofili. Il metodo analitico utilizzato ha permesso la quantificazione del farmaco rimasto all'interno del sistema NCL e di quello fuoriuscito, sia che si trovasse come precipitato che disciolto (sezione 3.2.7.2).

La sospensione colloidale NCL-TAM è caratterizzata come nella tabella I. Infatti abbiamo una quantità di farmaco all'interno delle nanoparticelle pari a $60 \pm 1,82$ % e una quantità di principio attivo in soluzione pari a $40 \pm 1,38$ % e il precipitato è

trascurabile. Dopo l'aggiunta degli eccipienti, le ripartizioni del farmaco nel sistema nanoparticellare ottenute sono state differenti come mostra la Figura 73.

Dal grafico in Figura 73 si può notare inoltre, che l'aggiunta di α -ciclodestrina e maltodestrina ha mantenuto una ripartizione delle diverse forme di TAM simile a quella del sistema NCL-TAM senza aggiunta di eccipienti idrofili. Questo può significare che gli eccipienti non interagiscono con il sistema lecitina/chitosano, non alterandone così la struttura e di conseguenza la quantità di farmaco al loro interno. I sistemi NCL-TAM+ β CD invece, presentano una quantità di farmaco inferiore (22,5%), rispetto al controllo NCL-TAM, all'interno della nanoparticella. Probabilmente questo è dovuto all'interazione della β -ciclodestrina con gli elementi strutturali della nanoparticella: in particolare lecitina e il tamoxifene stesso, provocando così l'uscita del farmaco dalla particella.

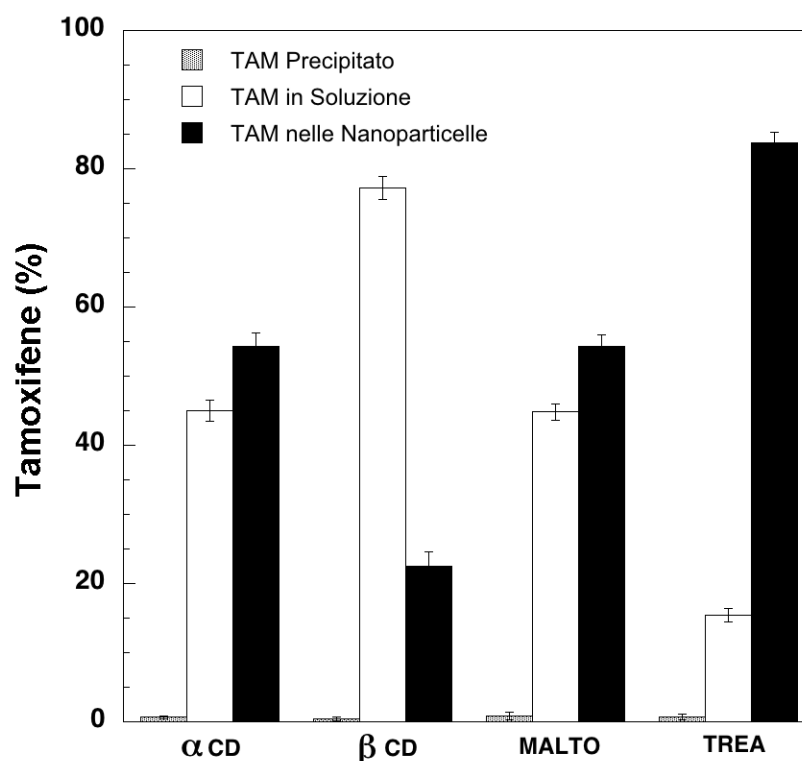


Figura 68: Efficienza d'incapsulamento nei vari sistemi NCL-TAM-eccipiente.

Questo viene anche confermato dal fatto che il principio attivo mancante nel nanosistema è stato ritrovato in soluzione. La percentuale di farmaco contenuta all'interno del sistema NCL-TAM con trealosio ha un valore molto elevato (83%), diminuendo di contro la quantità di tamoxifene in soluzione (17%). Questo dato appare controverso, considerando che il trealosio è stato aggiunto come gli altri eccipienti dopo la produzione del sistema colloidale, e difficilmente avrebbe potuto causare un maggiore incapsulamento di farmaco. Il dato è di notevole interesse poiché, la sua spiegazione potrebbe aiutare a migliorare l'efficienza di

incapsulazione del farmaco senza variare i parametri strutturali della nanoparticella come dimensione, carica superficiale e indice di polidispersità.

4.13. Formulazione di polveri

In questa parte si è prodotta una polvere micronizzata attraverso tecnologia spray-drying. I sistemi ottenuti verranno d'ora in poi siglati NCL-M-eccipiente (Figura 74).

La sospensione spruzzata era costituita da 75% di eccipiente disciolto sul peso totale del solido presente.

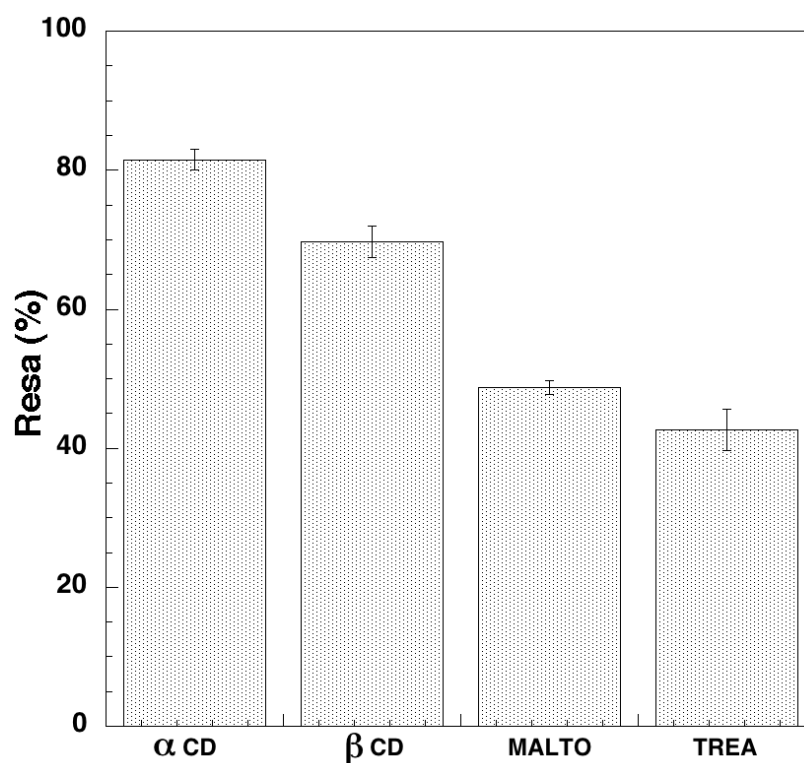


Figura 69: Resa delle polveri ottenute con spray-drying
(esprese come NCL-M-eccipiente).

Le rese delle polveri di NCL-M- α CD e NCL-M- β CD sono state molto alte, rispettivamente 69,69% e 81,48%. La resa del lotto NCL-M MALTO spruzzato era del 48,76%; la polvere rimasta nel ciclone era trascurabile. La resa del lotto NCL-TAMTREA era del 42,61%.

Le polveri ottenute sono state quindi caratterizzate per quanto riguarda:

- distribuzione dimensionale;
- morfologia delle microparticelle.

4.13.1. Distribuzione dimensionale

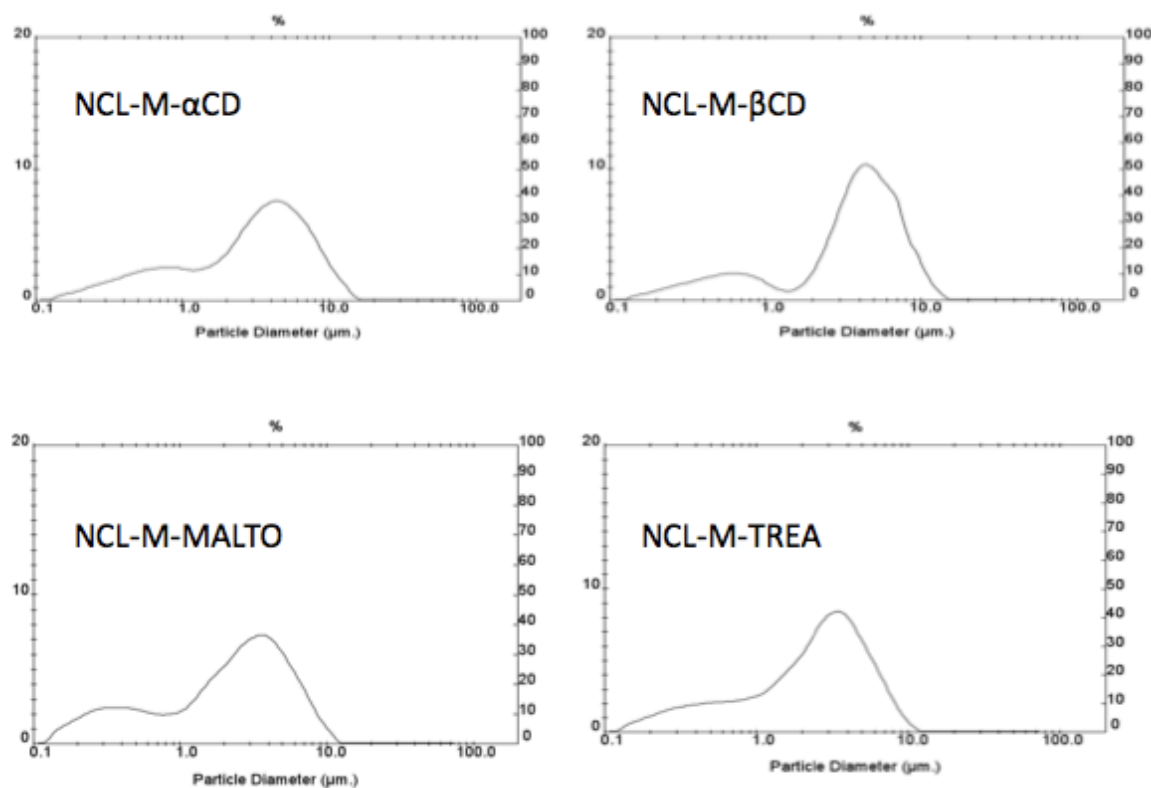


Figura 70: Distribuzione dimensionale delle polveri
ottenute dai lotti NCL-M-eccipiente.

La distribuzione dimensionale, determinata mediante lo strumento Malvern Mastersizer, era tale per cui le polveri NCL-M-αCD, NCL-M-TREA presentavano un dv_{50} pari a rispettivamente $3,80 \pm 0,53$ e $3,90 \pm 0,12$ μm. I lotti NCL-M-βCD e NCL-M-MALTO invece hanno presentato un dv_{50} inferiore, rispettivamente di $2,4 \pm 0,60$ e $2,72 \pm 0,12$ μm. Questo assicura che le polveri prodotte abbiano

effettivamente una dimensione dell'ordine dei micron e con una polidispersità non troppo elevata.

4.13.2. Morfologia delle microparticelle

E' stata confrontata la morfologia delle microparticelle ottenute attraverso microscopia SEM.

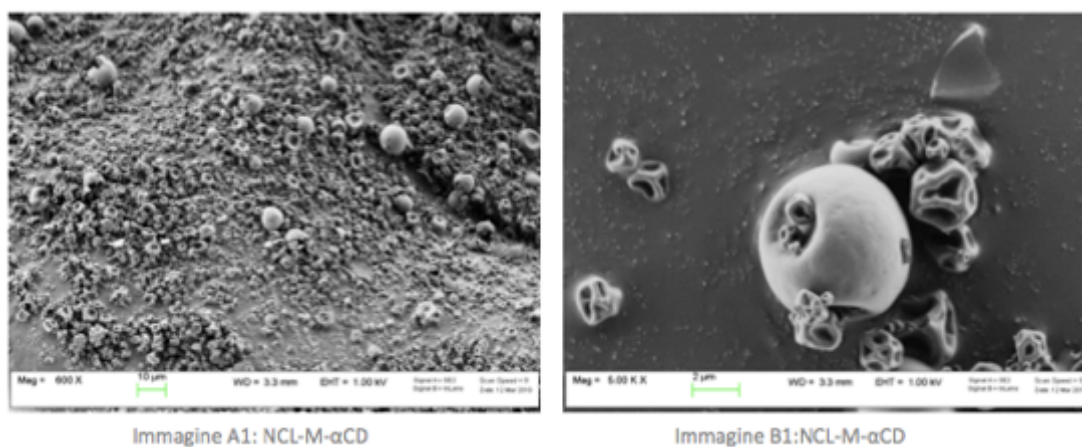


Figura 71: Analisi al SEM di NCL-M- α CD.

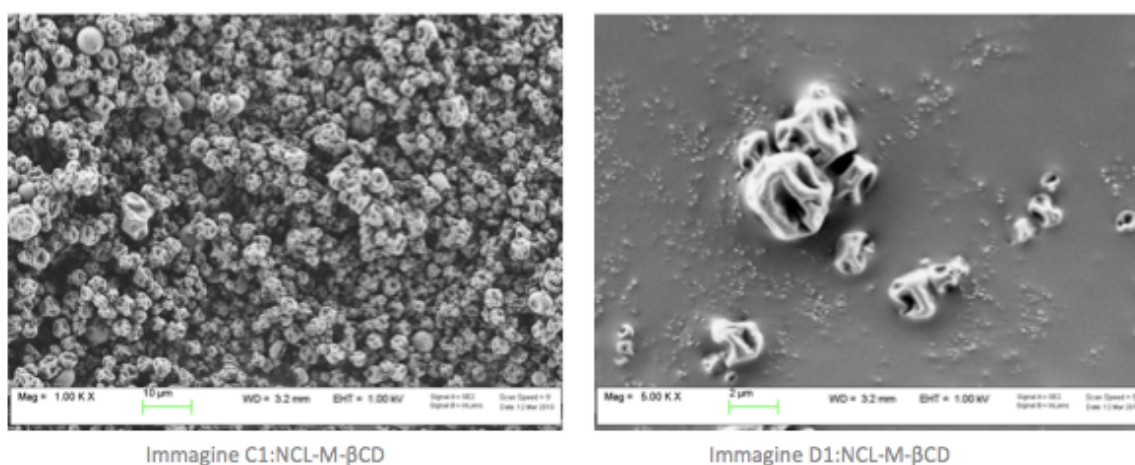


Figura 72: Analisi al SEM di NCL-M- β CD.

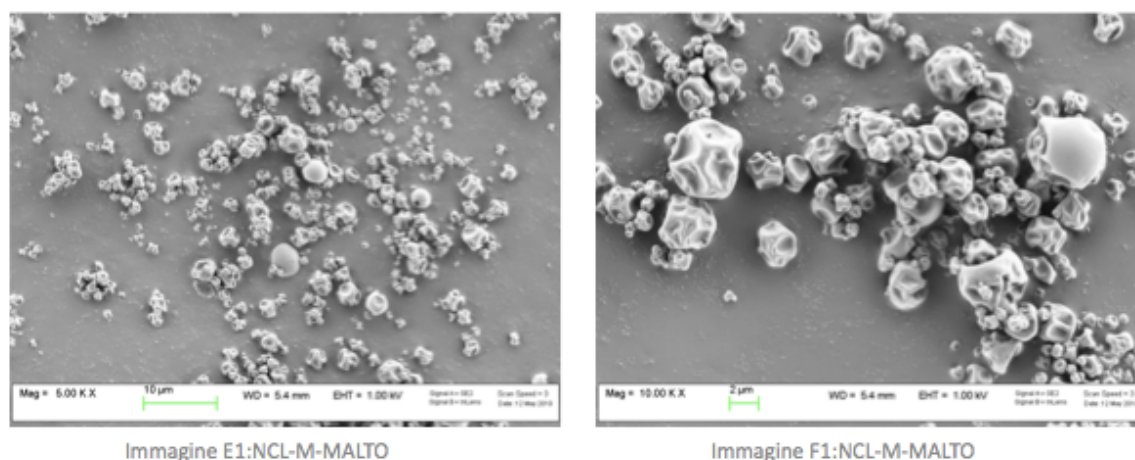


Figura 73: *Analisi al SEM di NCL-M-MALTO.*

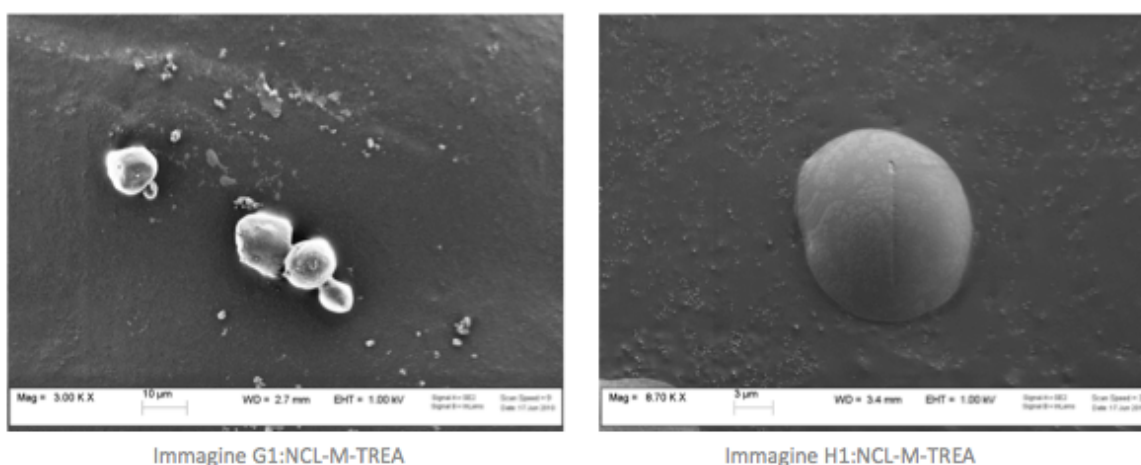


Figura 74: *Analisi al SEM di NCL-M-TREA.*

Come si può chiaramente osservare dalle immagini, le microparticelle delle polveri NCL-M- α CD, NCL-M- β CD e NCL-M-MALTO sono molto simili tra loro per aspetto, forma, struttura della superficie e morfologia delle stesse. La struttura

appare parzialmente collassata e le microparticelle sembrano cave e con delle invaginazione, suggerendo una bassa densità della particella. La polvere con trealosio presenta invece microparticelle con caratteristiche differenti circa la struttura superficiale. Infatti, come si può notare dalla Figura 74, le particelle presentano una superficie liscia e senza invaginazioni, invece presenti nelle altre formulazioni.

4.14. Rigenerazione di nanoparticelle in fluidi biologici simulati a partire delle microparticelle

Le polveri prodotte, una volta a contatto con i fluidi biologici simulati, quali il fluido gastrico simulato (FGS) e il fluido intestinale simulato (FIS), devono permettere il ripristino delle nanoparticelle di partenza attraverso la dissoluzione dell'eccipiente idrofilo. Le polveri prodotte sono state disciolte nei fluidi simulati dando luogo a sospensioni colloidali sulle quali sono state misurate le dimensioni.

Le microparticelle disperse nel fluido gastrico simulato (FGS), come mostrato nella Figura 75, tornano di dimensioni nanometriche dopo la disgregazione dell'eccipiente idrofilo, non riuscendo però a raggiungere le dimensioni del nanosistema originale. Per le formulazioni NCL-M- α CD, NCL-M- β CD e NCL-M-TREA le dimensioni sono di circa 400 nm.

Le nanoparticelle rigenerate contenenti maltodestrine presentano una dimensione quasi doppia rispetto alle altre sospensioni colloidali (circa 800 nm).

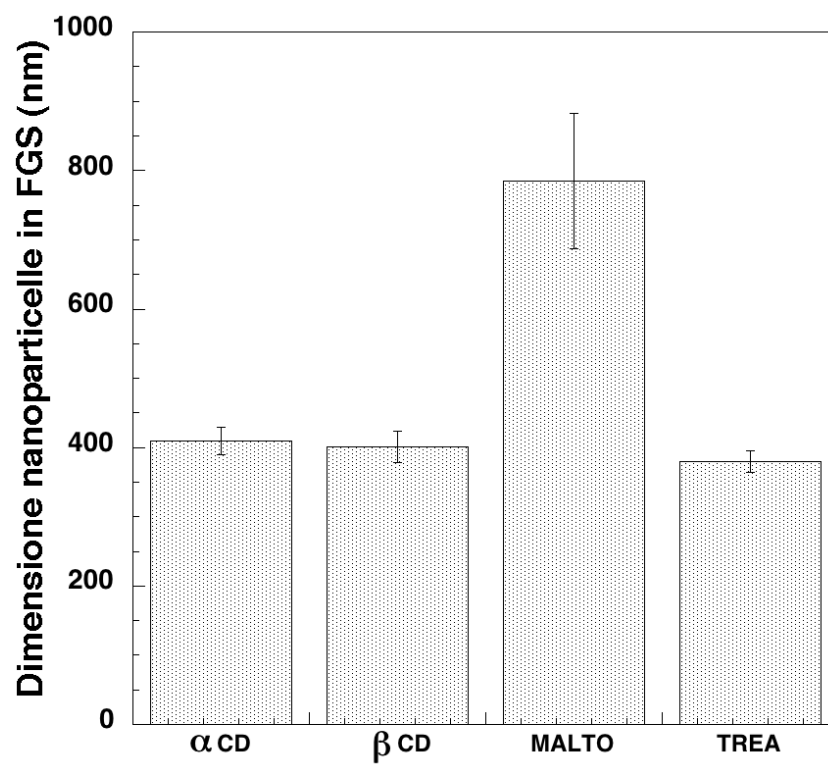


Figura 75: Distribuzione dimensionale delle particelle in FGS (esprese come NCL-M-eccipiente).

Tabella IV: Indice di polidispersità dei campioni NCL-M-eccipiente in FGS.

Campione	Indice di Polidispersità
NCL-M-αCD	0,30±0,03
NCL-M-βCD	0,29±0,01
NCL-M-MALTO	0,38±0,03
NCL-M-TREA	0,29±0,01

L'indice di polidispersità è abbastanza alto per tutti i lotti, supera lo 0,20 (Tabella IV). Questi dati insieme (dimensioni e indice di polidispersità), descrivono un sistema che non è esattamente quello di partenza (NCL-TAM) cioè, si potrebbero avere aggregati e differenti popolazioni dimensionali di particelle nella dispersione colloidale. Queste infatti potrebbero non assumere le dimensioni e un indice di polidispersità originale, probabilmente a causa del processo di spray-drying, che può contribuire così alla formazione di aggregati di dimensioni maggiori.

La formazione di particelle di dimensioni nanometriche si osserva anche quando le microparticelle vengono disperse in un fluido intestinale simulato (FIS) (Figura 76). Nel grafico si può osservare che le formulazioni NCL-M- α CD e NCL-M-TREA hanno particelle di dimensioni simili, attorno ai 400 nm; mentre in quella NCL-M- β CD le particelle presentano dimensioni al di sotto del 300 nm. Per quanto riguarda le polveri prodotte con maltodestrine, una volta a contatto con FIS, le dimensioni misurate sono paragonabili a quelle ottenute nel FGS.

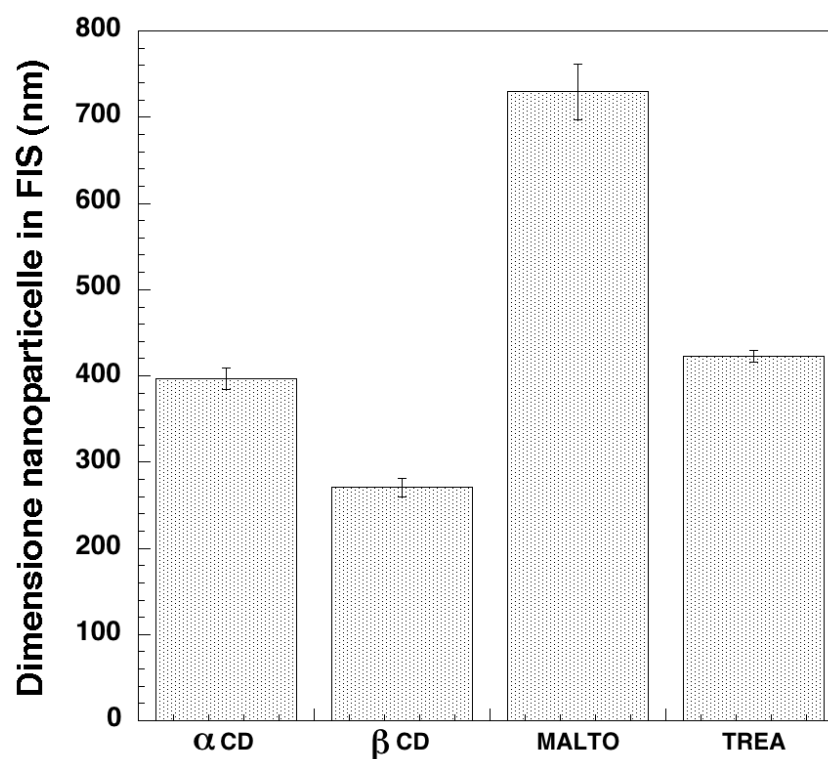


Figura 76: Distribuzione dimensionale delle particelle in FIS
(esprese come NCL-M-eccipiente).

Tabella V: Indice di polidispersità dei campioni NCL-M-eccipiente in FIS.

Campione	Indice di Polidispersità
NCL-M- α CD	0,24 $\pm$ 0,03
NCL-M- β CD	0,23 $\pm$ 0,02
NCL-M-MALTO	0,23 $\pm$ 0,02
NCL-M-TREA	0,19 $\pm$ 0,01

L'indice di polidispersità che si ottiene dalle formulazioni microparticellari nel FIS sono risultati abbastanza alti (Tabella IV), anche se inferiori a quelli ottenuti per ridispersione nel FGS (Tabella III). Questo sottolinea ugualmente che non si ha più un sistema poco polidisperso come NCL-TAM ma, un sistema che ha diverse popolazioni di particelle di dimensioni differenti.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nell'ambito di questo lavoro di dottorato hanno permesso di acquisire nuove conoscenze riguardando il comportamento di una formulazione colloidale formata da chitosano e lecitina caricata con l'antitumorale tamoxifene.

Il rilascio del farmaco dalle nanoparticelle nelle 24 ore è fortemente rallentato sia in fluido gastrico simulato che in quello intestinale. Il tamoxifene rimane intrappolato nella struttura del nanosistema, essendo così protetto da agenti chimici e fisici. È stato interessante scoprire che l'azione di alcuni enzimi, come lipasi e lisozima, provocano la liberazione del farmaco, dai nanosistemi, in quanto gli enzimi utilizzati sono in grado di demolire le nanoparticelle. Questi enzimi che sono presenti, sia a livello cellulare, che a livello del lume intestinale, in vivo potrebbero liberare il tamoxifene trasportato dal sistema NCL-TAM. L'interesse di questa formulazione è che il farmaco è fortemente trattenuto dalla nanoparticella, eventualmente ricostituita da una polvere di microparticelle. Viene rilasciato solo nel luogo in cui il sistema può essere degradato dall'intervento di enzimi in grado di demolire lipidi e polisaccaridi. Nel caso del sistema da noi progettato questo potrebbe a livello intestinale, in prossimità delle mucose dove il farmaco viene assorbito.

Si è potuto constatare in vitro anche, che a livello cellulare sono presenti degli enzimi che degradano le nanoparticelle, con un conseguente rilascio di farmaco.

Infatti gli esperimenti di citotossicità hanno evidenziato che la mortalità cellulare dovuta alle nanoparticelle aumentava progressivamente con il tempo di contatto della formulazione. Questo, a confronto con la soluzione di tamoxifene, suggerisce che il farmaco nel nanosistema non sia immediatamente disponibile, ma solo dopo che venga osservata la sua destrutturazione dai sistemi enzimatici interni alla cellula.

L'accumulo cellulare del nanosistema è stato evidenziato da esperimenti di captazione in cellule intestinali. Infatti tramite studi di citofluorimetria è stato dimostrato che le nanoparticelle vengono catturate dalle cellule intestinali tramite endocitosi. La microscopia confocale ha confermato l'up-take.

Il miglioramento della permeazione del farmaco grazie al sistema NCL-TAM, rispetto una sospensione di farmaco, è stato provato con esperimenti di permeazione ex vivo attraverso intestino di ratto. Negli esperimenti di permeazione si è visto che il trasporto di farmaco delle nanoparticelle attraverso l'intestino aumentava di quasi 6 volte quando si utilizzava NCL-TAM in presenza, nel lato luminale, di pancreatina all' 1%. Si è anche notato che un passaggio critico per quest'aumento di trasporto, era che il sistema colloidale avesse la possibilità di aderire alla mucosa intestinale. La bioadesione del sistema si è dimostrata pertanto un elemento fondamentale per il nanosistema.

Studi condotti sul metabolita principale del tamoxifene, il 4-OH tamoxifene, hanno mostrato un cambiamento del rapporto tra farmaco/metabolita nel compartimento recettore, utilizzando la formulazione NCL-TAM.

E' stato dimostrato che quando si utilizzava una sospensione di tamoxifene, nel compartimento ricevente vi era una quantità 4 volte superiore di 4-OH tamoxifene rispetto al farmaco integro. Questo suggerisce che il farmaco subisca un significativo intervento metabolico attraverso il tessuto intestinale.

Viceversa, utilizzando la formulazione studiata si è constatata una situazione opposta: la quantità di tamoxifene rispetto al metabolita era quasi il triplo quando era presente pancreatina nel compartimento luminale assieme ai nanovettori e 35 volte utilizzando la lipasi. Si è potuto valutare che la quantità di metabolita alla 4^a ora non era significativamente differente nei diversi casi, ciò che cambiava era la quantità di tamoxifene. Una possibile spiegazione è che in presenza di nanoparticelle, ed enzimi, il tamoxifene non passi più per via intracellulare ma per via paracellulare, eludendo così il metabolismo. Il maggior accesso alla via paracellulare potrebbe essere dovuto al fatto che il chitosano è da tempo studiato come *permeation enhancer*, grazie alla sua capacità di aprire in maniera reversibile le *tight junctions* nei tessuti di assorbimento [95-98].

Questo risultato è di particolare interesse poiché, la variabilità interpaziente del farmaco è stata attribuita anche alla formazione non prevedibile di 4-OH tamoxifene a livello intestinale. Con le nanoparticelle, aumentando la quantità di

tamoxifene, a discapito del metabolita, è possibile diminuire questo limite non controllabile e tipico di questa terapia.

Il sistema colloidale è stato trasportato in una polvere microparticellare che, ridispersa in fluidi biologici, rigenerava il sistema nanoparticellare di origine. Sono state preparate microparticelle con eccipienti idrofili tramite il processo spray-drying, con rese molto buone per alfa e beta ciclodestrine e leggermente inferiori per maltodestrine e trealosio. La ridispersione ha ricostituito sistemi con dimensioni e indice di polidispersità maggiore rispetto a quelli di partenza, pur comunque rimanendo nel campo dei nanovettori. I materiali che hanno dato i risultati migliori sono state le ciclodestrine e il trealosio, che danno delle ridispersioni di circa 400 nm di diametro. Per quanto riguarda il caricamento di farmaco all'interno del sistema colloidale si è osservato che, con l' α -ciclodestrina e le maltodestrine si hanno dei valori di caricamento simili al sistema NCL-TAM, mentre con le β -ciclodestrine si aveva una diminuzione. Nella formulazione con il trealosio si ha avuto un risultato controverso: infatti, si ha un aumento della quantità di farmaco caricato nelle nanoparticelle. Questo può essere uno spunto per studi futuri. Alcuni studi dovranno essere condotti per ottimizzare la formulazione solida, ma quelle più promettenti sembrerebbero quelle con α -ciclodestrina e trealosio.

Il sistema studiato possiede incoraggianti caratteristiche per quanto riguarda la produzione di sistemi nanoparticellari per la somministrazione orale di

tamoxifene, nella cura del cancro al seno. Grazie al miglioramento dell'assorbimento intestinale di farmaco, allo sbilanciamento verso il tamoxifene nel rapporto tamoxifene/metabolita del compartimento ricevente, e alla produzione di polveri facilmente maneggiabili, la preparazione di una nuova formulazione per uso orale è diventata accessibile. Condurre studi in vivo per accertare l'effettivo potenziale del sistema nanoparticellare lecitina/chitosano caricato con tamoxifene è lo sviluppo per il futuro.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] www.airc.it.
- [2] Darnell, J. E. & Lodish, H. Molecular cell biology. *Book* (1986).
- [3] Robbins, S. L. Pathologic Basis of Disease. *Book* (2002).
- [4] Bonadonna, Cuna, R. d. & Valagussa. Medicina Oncologica. *Elsevier - Masson* (2007).
- [5] DeMario, M. D. & Ratain, M. J. Oral chemotherapy: rationale and future directions. *J Clin Oncol* 16, 2557-2567 (1998).
- [6] Sparreboom, A., de Jonge, M. J. & Verweij, J. The use of oral cytotoxic and cytostatic drugs in cancer treatment. *Eur J Cancer* 38, 18-22 (2002).
- [7] Osborne, C. K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 339, 1609-1618 (1998).
- [8] Banna, G. L. et al. Anticancer oral therapy: emerging related issues. *Cancer Treatment Reviews* 36, 595-605 (2010).
- [9] Kurtz, J. E., Andrès, E., Natarajan-Amé, S., Noel, E. & Dufour, P. Oral chemotherapy in colorectal cancer treatment: review of the literature. *Eur J Intern Med* 14, 18-25 (2003).

- [10] Saeki, T., Tsuruo, T., Sato, W. & Nishikawa, K. Drug resistance in chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 56 Suppl 1, 84-89 (2005).
- [11] Fardel, O., Lecœur, V. & Guillouzo, A. The P-Glycoprotein Multidrug Transporter. *Gen. Pharmac.* 1-9 (2002).
- [12] Hunter, J. & Hirst, B. H. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1-29 (2003).
- [13] Kruijtz, C. M., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. *Oncologist* 7, 516-530 (2002).
- [14] Lee, K. et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 108, 241-250 (2008).
- [15] P. Colombo, P. L. C. A. G., E. Menegatti, E. Vidale. *Principi di Tecnologie Farmaceutiche* (Casa Editrice Ambrosiana, 2006).
- [16] Brigger, I. et al. Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *International journal of pharmaceuticals* 214, 37-42 (2001).

- [17] Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 631-651 (2002).
- [18] Zamboni, W. C. Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. *Clin Cancer Res* 11, 8230-8234 (2005).
- [19] Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J* 19, 311-330 (2005).
- [20] De Jong, W. H. & Borm, P. J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International journal of nanomedicine* 3, 133-149 (2008).
- [21] Brannon-Peppas, L. & Blanchette, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1649-1659 (2004).
- [22] Duncan, R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer* 6, 688-701 (2006).
- [23] Farrell, D., Ptak, K. & Panaro, N. J. Nanotechnology-Based Cancer Therapeutics Promise and Challenge Lessons Learned Through the NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer. *Pharmaceutical Research*
- [24] Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5, 161-171 (2005).
- [25] Freitas, R. A. What is nanomedicine? *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 1, 2-9 (2005).
- [26] Haley, B. & Frenkel, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 26, 57-64 (2008).

- [27] Chan, J. M. et al. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials* 30, 1627-1634 (2009).
- [28] Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 65, 271-284 (2000).
- [29] Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* (2010).
- [30] Maeda, H., Sawa, T. & Konno, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 74, 47-61 (2001).
- [31] Torchilin, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev* (2010).
- [32] Maeda, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem* 21, 797-802 (2010).
- [33] Torchilin, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 1532-1555 (2006).
- [34] Duchêne, D., Ponchel, G. & Wouessidjewe, D. Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 29-40 (1999).

- [35] Torchilin, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J* 9, E128-47 (2007).
- [36] Craig Jordan, V. Long-term tamoxifen treatment for breast cancer - Page 27. 289 (1994).
- [37] Shin, S. C., Choi, J. S. & Li, X. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International journal of pharmaceutics* 313, 144-149 (2006).
- [38] Goodman Gilman, A., Rall, T. W., Nies, A. S. & Taylor, P. *Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics* 1990).
- [39] Crewe, H., Notley, L., Wunsch, R., Lennard, M. & Gillam, E. Metabolism of Tamoxifen by Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes: Formation of the 4-Hydroxy, 4'-Hydroxy and N-Desmethyl Metabolites and Isomerization of trans-4-Hydroxytamoxifen. *Drug Metabolism and Disposition* 30, 869 (2002).
- [40] Gallicchio, L. et al. Medication use, tamoxifen (TAM), and TAM metabolite concentrations in women with breast cancer. *Cancer Lett* 211, 57-67 (2004).
- [41] Lim, Y., Desta, Z., Flockhart, D. & Skaar, T. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 55, 471-478 (2005).
- [42] Wiseman, H. & Lewis, D. The metabolism of tamoxifen by human cytochromes P450 is rationalized by molecular modelling of the enzyme-

- substrate interactions: potential importance to its proposed anti-carcinogenic/carcinogenic actions. *Carcinogenesis* 17, 1357 (1996).
- [43] Gallicchio, L. et al. Association of tamoxifen (TAM) and TAM metabolite concentrations with self-reported side effects of TAM in women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 85, 89-97 (2004).
- [44] Zhao, X. J., Jones, D. R., Wang, Y. H., Grimm, S. W. & Hall, S. D. Reversible and irreversible inhibition of CYP3A enzymes by tamoxifen and metabolites. *Xenobiotica* 32, 863-878 (2002).
- [45] Garcia-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D. & Alonso, M. J. A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 25, 133-143 (2005).
- [46] Holpuch, A. S. et al. Nanoparticles for local drug delivery to the oral mucosa: proof of principle studies. *Pharm Res* 27, 1224-1236 (2010).
- [47] Jung, T. et al. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 50, 147-160 (2000).

- [48] Prego, C., Fabre, M., Torres, D. & Alonso, M. J. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharm Res* 23, 549-556 (2006).
- [49] Davis, M. E., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews Drug discovery* 7, 771-782 (2008).
- [50] Lai, S. K., Wang, Y. Y. & Hanes, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 158-171 (2009).
- [51] Ponchel, G. & Irache, J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev* 34, 191-219 (1998).
- [52] Jani, P., Halbert, G. W., Langridge, J. & Florence, A. T. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol* 42, 821-826 (1990).
- [53] Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E. & Benoit, J. P. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. *Nanomedicine (Lond)* 5, 287-306 (2010).
- [54] Norris, D. A., Puri, N. & Sinko, P. J. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv Drug Deliv Rev* 34, 135-154 (1998).

- [55] Koo, O. M., Rubinstein, I. & Onyuksel, H. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: a novel nanomedicine. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 1, 77-84 (2005).
- [56] Miura, H., Onishi, H., Sasatsu, M. & Machida, Y. Antitumor characteristics of methoxypolyethylene glycol-poly(DL-lactic acid) nanoparticles containing camptothecin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 97, 101-113 (2004).
- [57] Zhang, L. et al. Camptothecin derivative-loaded poly(caprolactone-co-lactide)-b-PEG-b-poly(caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their biodistribution in mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 96, 135-148 (2004).
- [58] Yang, S., Zhu, J., Lu, Y., Liang, B. & Yang, C. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res* 16, 751-757 (1999).
- [59] Memisoglu-Bilensoy, E. et al. Tamoxifen citrate loaded amphiphilic beta-cyclodextrin nanoparticles: in vitro characterization and cytotoxicity. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 104, 489-496 (2005).
- [60] Shenoy, D. B. & Amiji, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International journal of pharmaceutics* 293, 261-270 (2005).

- [61] Behrens, I., Pena, A. I., Alonso, M. J. & Kissel, T. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm Res* 19, 1185-1193 (2002).
- [62] Pan, Y. et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International journal of pharmaceutics* 249, 139-147 (2002).
- [63] Sonvico, F. et al. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International journal of pharmaceutics* 324, 67-73 (2006).
- [64] Senyigit, T. et al. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 142, 368-373 (2010).
- [65] Sogias, I. A., Williams, A. C. & Khutoryanskiy, V. V. Why is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules* (2008).
- [66] Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N. & Aminabhavi, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 100, 5-28 (2004).
- [67] Smith, J., Wood, E. & Dornish, M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm Res* 21, 43-49 (2004).

- [68] Hafner, A., Lovrić, J., Voinovich, D. & Filipović-Grčić, J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* 1-9 (2009).
- [69] Kumar, R. & Katare, O. P. Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. *AAPS PharmSciTech* 6, E298-310 (2005).
- [70] Buckley, M. M. & Goa, K. L. Tamoxifen. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use. *Drugs* 37, 451-490 (1989).
- [71] Fuchs, W. S. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of tamoxifen in postmenopausal healthy women. *Arzneimittelforschung* 46, 418-422 (1996).
- [72] Bekaii-Saab, T. S., Perloff, M. D., Weemhoff, J. L., Greenblatt, D. J. & von Moltke, L. L. Interactions of tamoxifen, N-desmethyldtamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with P-glycoprotein and CYP3A. *Biopharm Drug Dispos* 25, 283-289 (2004).
- [73] Chen, G., Yin, S., Maiti, S. & Shao, X. 4-Hydroxytamoxifen sulfation metabolism. *J Biochem Mol Toxicol* 16, 279-285 (2002).
- [74] Dehal, S. S. & Kupfer, D. Cytochrome P-450 3A and 2D6 catalyze ortho hydroxylation of 4-hydroxytamoxifen and 3-hydroxytamoxifen (droloxifene)

- yielding tamoxifen catechol: involvement of catechols in covalent binding to hepatic proteins. *Drug Metab Dispos* 27, 681-688 (1999).
- [75] Lien, E., Solheim, E., Kvinnsland, S. & Ueland, P. Identification of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen as a metabolite of tamoxifen in human bile. *Cancer Res* 48, 2304 (1988).
- [76] Zhan, M. et al. Profiles of tamoxifen-related side effects by race and smoking status in women with breast cancer. *Cancer Detect Prev* 31, 384-390 (2007).
- [77] Braga, R. M. et al. In vitro dissolution test of tamoxifen citrate preparations. *Bollettino chimico farmaceutico* 140, 467-470 (2001).
- [78] Carrier, R. L., Miller, L. A. & Ahmed, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 123, 78-99 (2007).
- [79] Duchêne, D., Wouessidjewe, D. & Ponchel, G. Cyclodextrins and carrier systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 62, 263-268 (1999).
- [80] Irie, T. & Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 86, 147-162 (1997).
- [81] Salmaso, S. et al. Specific antitumor targetable beta-cyclodextrin-poly(ethylene glycol)-folic acid drug delivery bioconjugate. *Bioconjug Chem* 15, 997-1004 (2004).

- [82] Galmarini, M. V., Chirife, J. & Zamora, M. C. Determination and correlation of the water activity of unsaturated, supersaturated and saturated trehalose solutions. *LWT-Food Science and ...* (2008).
- [83] Muller, J., Boller, T. & Wiemken, A. Trehalose and trehalase in plants: Recent developments. *Plant Sci* 112, 1-9 (1995).
- [84] Petinari, L., Kohn, L. K., de Carvalho, J. E. & Genari, S. C. Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. *Cell Biol Int* 28, 531-539 (2004).
- [85] Artursson, P. & Borchardt, R. T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res* 14, 1655-1658 (1997).
- [86] Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 27-43 (2001).
- [87] Cartiera, M. S., Johnson, K. M., Rajendran, V., Caplan, M. J. & Saltzman, W. M. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials* 30, 2790-2798 (2009).
- [88] Polentarutti, B. I. et al. Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics. *Pharm Res* 16, 446-454 (1999).

- [89] van de Kerkhof, E. G. et al. Innovative methods to study human intestinal drug metabolism in vitro: precision-cut slices compared with ussing chamber preparations. *Drug Metab Dispos* 34, 1893-1902 (2006).
- [90] Agüeros, M. et al. Combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. *Eur J Pharm Sci* 38, 405-413 (2009).
- [91] Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Farabollini, A., Palmieri, G. F. & Ponchel, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials* 28, 2233-2243 (2007).
- [92] Ma, Z. & Lim, L. Y. Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. *Pharm Res* 20, 1812-1819 (2003).
- [93] Nam, H. Y. et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 135, 259-267 (2009).
- [94] Sandri, G. et al. Insulin-loaded nanoparticles based on N-trimethyl chitosan: in vitro (Caco-2 model) and ex vivo (excised rat jejunum, duodenum, and ileum) evaluation of penetration enhancement properties. *AAPS PharmSciTech* 11, 362-371 (2010).
- [95] Bernkop-Schnürch, A., Kast, C. E. & Guggi, D. Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: thiomers/GSH

systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 93, 95-103 (2003).

- [96] Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Chacun, H. & Ponchel, G. Specific permeability modulation of intestinal paracellular pathway by chitosan-poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 69, 436-444 (2008).
- [97] Gonzalez-Mariscal, L., Hernández, S. & Vega, J. Inventions designed to enhance drug delivery across epithelial and endothelial cells through the paracellular pathway. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2, 145-176 (2008).
- [98] Vllasaliu, D. et al. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: comparison with chitosan solution. *International journal of pharmaceutics* 400, 183-193 (2010).

Ringraziamenti

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

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

Un sentito ringraziamento va al Prof. Gilles Ponchel per la sua competenza e gentilezza e a Silvia Mazzaferro per avermi aiutato a svolgere parte di questa tesi e per avermi accolto a Parigi, facendomi sentire come a casa.

Ringrazio il Dott. Fabio Sonvico per il valido aiuto che mi ha sostenuto in tutte le fasi di questo percorso. Un ringraziamento va alla Dott.ssa Alessandra Rossi e la Dott.ssa Francesca Buttini per il loro valido supporto.

Desidero ringraziare inoltre Edoardo Marcotti per aver contribuito alla realizzazione di questo lavoro di tesi.

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

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