

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA



DIPARTIMENTO FARMACEUTICO

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Sede Amministrativa: PARMA

**SOLUBILIZZAZIONE DI FARMACI DI
CLASSE II E DI CLASSE IV MEDIANTE
POLOSSAMERI**

TUTORE:

CHIAR.MA PROF.SSA PATRIZIA SANTI

TESI DI DOTTORATO DI:

Dott.ssa BENEDETTA VIETTI

XXI CICLO 2006-2008

INDICE

CAPITOLO I.....	7
Introduzione	7
1. PROBLEMI E STRATEGIE NELLA FORMULAZIONE DI FARMACI POCO SOLUBILI.....	7
1.1 BIOPHARMACEUTIC CLASSIFICATION SYSTEM (BCS).....	7
1.2 FATTORI CHE INFLUENZANO LA DISSOLUZIONE.....	9
1.3 STRATEGIE PER AUMENTARE LA SOLUBILITÀ DEI FARMACI.....	10
1.3.1 Modifiche di tipo chimico.....	10
1.3.2 Approcci formulativi.....	12
1.3.3 Modifiche fisiche	19
2. MICELLE POLIMERICHE COME ECCIPIENTI SOLUBILIZZANTI NELLA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI.....	21
2.1 DEFINIZIONE.....	21
2.2 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE	22
2.3 COMPOSIZIONE	22
2.4 FORMULAZIONE	23
2.5 SOMMINISTRAZIONE ORALE	24
2.6 SISTEMI COLLOIDALI PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI ATTRAVERSO LA PELLE.....	27
2.6.1 La pelle come barriera anatomica.....	27
2.6.2 La pelle come barriera di diffusione	27
2.6.3 La pelle come barriera nano porosa semipermeabile.....	28
2.6.4 Localizzazione e natura dei percorsi idrofili all'interno della pelle	28
2.6.5 Interazioni di sistemi colloidali con la pelle	28
3. POLOSSAMERI TRIBLOCK COPOLIMERI	30
3.1.1 Proprietà di aggregazione dei polossameri	31
3.1.2 Solubilizzazione in micelle di polossameri di farmaci scarsamente solubili.....	35
3.1.3 Stabilizzazione delle micelle	37
3.1.4 Significato biologico delle micelle e degli unimeri	39
3.1.5 Caratteristiche chimico fisiche di Pluronic® F127.....	39

3.1.6 Applicazioni farmaceutiche di Pluronic® F127	43
3.1.7 Proprietà farmacologiche di Pluronic® F127	50
3.1.8 Pluronic® F127: dati tossicologici	52
3.1.9 I polossameri ed il problema della multi resistenza a farmaci nei tumori	53
4. CELLULE CACO-2 COME MODELLO IN VITRO PER LO STUDIO DELL'ASSORBIMENTO INTESTINALE.....	60
4.1 MECCANISMI DI TRASPORTO ATTRAVERSO GLI ENTEROCITI.....	63
4.1.1 Diffusione passiva.....	63
4.1.2 Via paracellulare	65
4.1.3 Endocitosi	67
4.1.4 Meccanismi di efflusso	70
CAPITOLO II.....	74
Scopo della ricerca	74
CAPITOLO III	77
Parte sperimentale	77
1. MATERIALI	77
2. METODI.....	86
2.1 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI POLOSSAMERI.....	86
2.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI SATURE DI FARMACI IN SOLUZIONI DI POLOSSAMERI.....	87
2.3 ANALISI DELLE DIMENSIONI DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI IN PRESENZA ED IN ASSENZA DI FARMACI MEDIANTE TECNICA DLS (Dynamic Light Scattering).....	88
2.4 SOLUBILIZZAZIONE DI FARMACI DI CLASSE II E DI CLASSE IV IN MICELLE DI POLOSSAMERI.....	91
2.4.1 Analisi cromatografica.....	91
2.5 ESPERIMENTI DI TRASPORTO DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2	94
2.6 EFFETTO DEI POLOSSAMERI SULLA PERMEAZIONE TRANSDERMICA DI DAPSONE, CLOROTIAZIDE E DIGOSSINA	100
2.6.1 Approvvigionamento e preparazione dei tessuti.....	100
2.7 VALUTAZIONE <i>EX-VIVO</i> DELLE BIOADESIONE DI POLOSSAMERI ALLA VESCICA URINARIA SUINA	102

2.7.1 Approvvigionamento e preparazione dei tessuti.....	102
2.7.2 Preparazione e caratterizzazione delle compresse di polimeri	102
2.7.3 Descrizione dello strumento dinamometro	102
2.7.4 Procedura sperimentale.....	103
2.7.5 Analisi statistica.....	104
CAPITOLO IV	106
Risultati e discussione	106
1. ANALISI DELLE DIMENSIONI DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI MEDIANTE TECNICA DLS (Dynamic Light Scattering)	106
1.1 ANALISI DLS IN ASSENZA DI FARMACO	106
1.2 ANALISI DLS IN PRESENZA DI FARMACO.....	108
2. SOLUBILIZZAZIONE DI FARMACI DI CLASSE II E DI CLASSE IV IN MICELLE DI POLOSSAMERI	111
3. ESPERIMENTI DI TRASPORTO DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2.....	120
3.1 MISURA DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSEPITELIALE.....	120
3.2 TEST DI CITOTOSSICITÀ DELLA LATTATO DEIDROGENASI.....	123
3.3 TRASPORTO DI DAPSONE ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2	123
3.4 TRASPORTO DI CLOROTIAZIDE ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2	128
3.5 VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA P-gp DA PARTE DI PLURONIC® P85 MEDIANTE TRASPORTO DI DIGOSSINA ATTRAVERSO LE CELLULE CACO- 2.....	132
4. EFFETTO DEI POLOSSAMERI SULLA PERMEAZIONE TRANSDERMICA DI DAPSONE, CLOROTIAZIDE E DIGOSSINA	136
5. VALUTAZIONE <i>EX-VIVO</i> DELLA BIOADESIONE DI POLOSSAMERI ALLA VESCICA URINARIA SUINA	143
5.1 ESPERIMENTI PRELIMINARI	143
5.2 INFLUENZA DEL TEMPO DI CONTATTO	147
5.3 PROPRIETÀ MUCOADESIVE DEI POLOSSAMERI	149
CAPITOLO V	153
Conclusioni.....	153
BIBLIOGRAFIA	157

CAPITOLO I

Introduzione

CAPITOLO I

Introduzione

1. PROBLEMI E STRATEGIE NELLA FORMULAZIONE DI FARMACI POCO SOLUBILI

Recentemente i progressi nella ricerca biotecnologica e nella sintesi combinatoriale, uniti ai metodi di *high throughput screening* per la valutazione dell'attività farmacologica, hanno portato alla scoperta di un elevato numero di composti farmacologicamente attivi (New Chemical Entities, NCEs). Questi approcci razionali nell'ambito del *drug design* non sono però accompagnati da altrettanti progressi nell'ambito del *drug delivery*, in quanto le nuove molecole spesso non mostrano caratteristiche favorevoli per la loro somministrazione [1]. Nell'ambito dei NCEs, il numero dei candidati di natura lipofila è sicuramente prevalente; a causa della bassa solubilità in acqua, molecole che potenzialmente possiedono una buona attività farmacodinamica non raggiungono il mercato farmaceutico a causa della loro limitata biodisponibilità. Inoltre, un numero non trascurabile di molecole scarsamente solubili sono somministrate a dosi ben più elevate del necessario, per poter ottenere livelli plasmatici terapeutici, con ripercussioni tossicologiche rilevanti [2, 3]. Per questo motivo, le strategie per aumentare la solubilità in acqua e la velocità di dissoluzione di farmaci sono oggetto di ricerche costanti che ricoprono una rilevanza sempre più crescente.

1.1 BIOPHARMACEUTIC CLASSIFICATION SYSTEM (BCS)

Al fine di orientare l'approccio più adatto per aumentare la biodisponibilità orale di candidati farmacologicamente attivi, il formulatore necessita di identificare alcune caratteristiche essenziali, riguardanti soprattutto le proprietà chimico-fisiche (solubilità, velocità di dissoluzione, stabilità) e biofarmaceutiche (permeabilità) della molecola. Per questo motivo, la Food and Drug Administration (FDA), in collaborazione con Amidon *et al.*, ha proposto una classificazione dei farmaci in uno schema scientifico chiamato Biopharmaceutic Classification System (BCS) [4]. Secondo questo criterio tutti i farmaci sono classificati in

quattro categorie in funzione della loro solubilità e permeabilità (Fig.1); questi ultimi sono parametri chiave nel processo di assorbimento di farmaci per diffusione passiva, come dimostrato dalla prima legge di Fick (Eq.1):

$$J_w = P_w \times C_w \quad \text{Equazione 1}$$

Dove J_w rappresenta il flusso diffusivo ($\text{mg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) attraverso la membrana (*wall*), P_w è il coefficiente di permeabilità ($\text{cm} \times \text{s}^{-1}$) attraverso la membrana e C_w è la concentrazione del farmaco ($\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$).

Farmaci di Classe I non presentano difficoltà in ambito formulativo in quanto presentano un'elevata solubilità ed una elevata permeabilità di membrana [5]. Al contrario, farmaci di Classe IV presentano una bassa solubilità ed una bassa permeabilità e presentano notevoli difficoltà nell'ambito del *drug delivery*. Tra questi due estremi, le proprietà di farmaci che appartengono alla Classe II (bassa solubilità -elevata permeabilità) sono suscettibili di modifiche formulative al fine di aumentare la loro biodisponibilità orale. Per quanto riguarda i farmaci di Classe III (elevata solubilità, bassa permeabilità), l'approccio più razionale risulta essere quello di rivedere il processo di ottimizzazione e selezionare un candidato con proprietà biofarmaceutiche più favorevoli. Solamente i farmaci di Classe II e Classe IV saranno oggetto di discussione in questo lavoro, in quanto presentano un problema di solubilità.

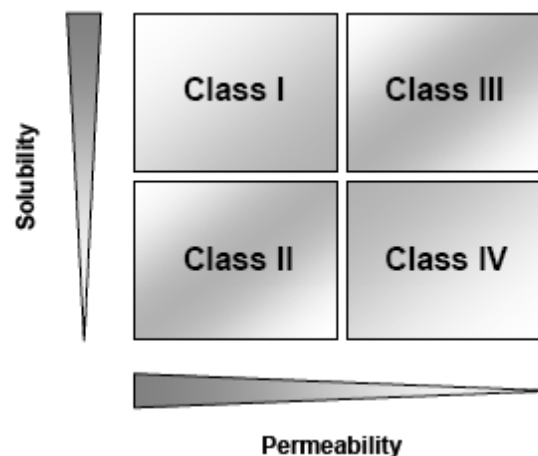


Figura 1. Rappresentazione schematica del Biopharmaceutic Classification System (BCS) (da Amidon et al. , [4]).

Circa il 70% delle NCEs appartengono alla Classe II, il 20% sono classificate nella Classe IV ed il restante 10% si distribuisce equamente tra la Classe I e la Classe III, mentre la distribuzione dei farmaci attualmente commercializzati è approssimativamente: Classe I – 35%; Classe II – 30%; Classe III – 25%; Classe IV – 10% [6].

Il BCS classifica un farmaco come altamente solubile quando la più elevata dose è solubile in 250 ml o in un volume inferiore di mezzo acquoso all'interno di un range di pH 1-7.5 a 37°C [7]. Un farmaco è considerato altamente permeabile quando il 90% della dose somministrata è assorbito, percentuale basata sulla determinazione del bilancio di massa o comparata ad una dose endovenosa di riferimento.

Il sistema BCS descrive inoltre tre numeri correlati alle proprietà fisico-chimiche e biofarmaceutiche del farmaco, al fine di completarne la caratterizzazione. Essi sono: il Dose number (Do), il Dissolution number (Dn) e l'Absorption number (An). Il farmaco "ideale" dovrebbe presentare valori elevati di Dn e An e un basso Do [7].

1.2 FATTORI CHE INFLUENZANO LA DISSOLUZIONE

Per essere assorbito per diffusione passiva, un farmaco incorporato in una forma di dosaggio deve superare un passaggio critico chiamato dissoluzione. La dissoluzione è un processo che dipende da due parametri distinti: la velocità di dissoluzione e la solubilità. Il primo rappresenta la velocità alla quale il farmaco fuoriesce dalla forma di dosaggio per essere disperso all'interno del mezzo che la circonda, il secondo esprime la quantità massima di soluto dissolta in un solvente all'equilibrio; entrambi i parametri influenzano la biodisponibilità del farmaco. Infatti, il flusso di farmaco che attraversa la barriera gastrointestinale è proporzionale al gradiente di farmaco solubilizzato tra il lume gastrointestinale ed il torrente circolatorio. Un farmaco è quindi classificato come poco solubile se il suo tempo di dissoluzione è più lungo del tempo di residenza all'interno del tratto gastrointestinale, con una conseguente bassa biodisponibilità. Allo stesso modo, un farmaco con una solubilità in acqua inferiore a 10 µg/ml è generalmente considerato poco solubile e presenterà problemi di biodisponibilità [7].

I fattori principali che influenzano la cinetica di dissoluzione di un farmaco possono essere identificati nell'equazione di Noyes-Withney, modificata da Nernst-Brunner e Levich [8] (Eq. 2):

$$DR = \frac{dX_d}{dt} = \frac{AxD}{\delta} x \left[C_s - \frac{X_d}{V} \right]$$

Equazione 2

dove DR rappresenta la velocità di dissoluzione, A la superficie del farmaco in forma solida, D il coefficiente di diffusione del farmaco, δ è lo spessore dello strato di diffusione adiacente alla superficie del farmaco, C_s è la solubilità del farmaco alla saturazione, X_d è la quantità di farmaco già solubilizzata e V è il volume del mezzo di dissoluzione. Come si può comprendere da questa equazione, la velocità di dissoluzione varia in funzione della dimensione particellare, della bagnabilità e della solubilità; ciò sta a significare che per composti la cui dissoluzione è limitata dalla solubilità o dalla velocità di diffusione, qualsiasi fattore che aumenti la solubilità ne migliorerà la biodisponibilità. Oltre a parametri chimico-fisici, anche parametri fisiologici quali il pH, la presenza di sali biliari, la viscosità del contenuto intestinale e la motilità possono influenzare la dissoluzione del farmaco all'interno del tratto gastrointestinale [9].

1.3 STRATEGIE PER AUMENTARE LA SOLUBILITÀ DEI FARMACI

La scelta della formulazione è spesso di cruciale importanza ai fini di ottenere un prodotto farmaceutico per la somministrazione di farmaci poco solubili. Differenti strategie possono essere utilizzate per aumentare la solubilità reale o apparente di una sostanza in acqua; esse possono essere raggruppate in tre categorie, ciascuna delle quali presenta vantaggi e limitazioni. Esse sono rappresentate da: modifiche di tipo chimico, strategie di tipo formulativo e variazioni di tipo fisico (Fig. 2).

1.3.1 Modifiche di tipo chimico

Al fine di aumentare la biodisponibilità orale, può essere necessario aumentare la solubilità apportando delle modifiche chimiche a regioni della molecola diverse dal gruppo farmacoforo. L'incorporazione di gruppi ionizzabili o polari all'interno della struttura o l'inserimento di gruppi che diminuiscono il punto di fusione della molecola, la formazione di sali e l'approccio dei pro-farmaci rappresentano i metodi principali nell'ottimizzazione della

solubilità, anche se risultano essere quelli più dispendiosi in termini di tempo e risorse, rispetto ad altri approcci [10].

L'introduzione di gruppi solubilizzanti all'interno di una struttura scarsamente solubile può essere effettuata secondo varie metodologie che dipendono da: 1) il tipo di gruppo introdotto; 2) la reversibilità dell'inserimento; 3) la posizione del gruppo incorporato.

Tutte queste modifiche chimiche possono risultare fallimentari in seguito all'eventuale precipitazione dell'acido o della base liberi dal sale, indotta da una variazione di pH all'interno del tratto gastrointestinale. Nonostante ciò, l'aumento dell'area superficiale generato dalla precipitazione del farmaco in particelle di piccole dimensioni può contribuire ad aumentare la velocità di dissoluzione [11].

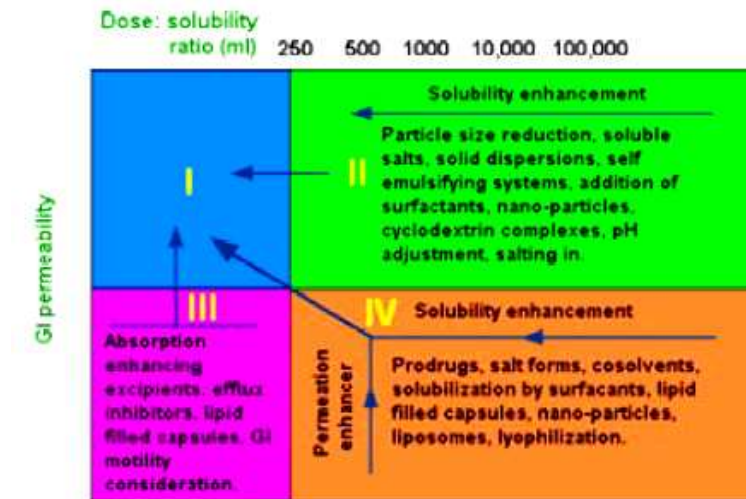


Figura 2. Schema rappresentante i metodi per aumentare la solubilità dei farmaci in relazione alla loro classificazione nel sistema BCS (da R. Fassihi, 2002).

1.3.1.1 Tipo di gruppo introdotto

I gruppi chimici generalmente introdotti sono: ammine, ammidi, gruppi alcolici, acidi carbossilici, acidi sulfonici, gruppi fosfato. Questi gruppi sono ionizzabili oppure sono in grado di formare legami idrogeno relativamente forti; i gruppi acidi e basici sono utili per la formazione di sali [12].

1.3.1.2 La reversibilità del legame

Il tipo di gruppo selezionato dipende anche dal tipo di legame chimico richiesto. Gruppi che sono direttamente legati a scheletri carboniosi del composto di base tramite legami poco reattivi di tipo C-C, C-O, C-N, sono difficilmente scindibili [10, 12]. Gruppi legati tramite legami esterei, amidici, fosfato, solfato o glicosidici sono più facilmente metabolizzati per riformare il composto di partenza nel momento in cui il derivato è trasferito dal sito di somministrazione al sito d'azione. Composti con questo tipo di gruppi solubilizzanti sono veri e propri pro-farmaci, che sono in genere inattivi o significativamente meno attivi del composto di partenza. Una volta somministrati, i pro-farmaci sono metabolizzati *in vivo* nella forma attiva del composto. La velocità di ricostituzione del composto di partenza dipende, oltre che dal tipo di legame chimico, anche dalla via di somministrazione, che può influenzare in maniera significativa l'attività del farmaco.

1.3.1.3 La posizione del gruppo incorporato

Al fine di mantenere l'attività mostrata dal composto di riferimento, il gruppo solubilizzante dovrebbe essere inserito in una parte della molecola non implicata nell'attività farmacologica, non coinvolta cioè nell'interazione farmaco-recettore [10, 12]. Di conseguenza, il metodo utilizzato per introdurre un nuovo gruppo solubilizzante e la sua posizione all'interno della molecola dipenderanno dalle reattività relative del farmacoforo e della restante porzione della molecola.

1.3.2 Approcci formulativi

Dal momento che non risulta sempre possibile incorporare un gruppo ionizzabile o polare all'interno della struttura di un composto farmacologicamente attivo, si può adottare un approccio differente riguardante la formulazione all'interno della quale il farmaco è contenuto, al fine di aumentarne la solubilità. A questo scopo, l'utilizzo di cosolventi, correzioni di pH, dispersioni all'interno di carriers e l'utilizzo di tensioattivi rappresentano i metodi principali a disposizione dei formulatori.

1.3.2.1 Co-solventi

L'utilizzo di co-solventi può aumentare la solubilità del farmaco di diversi ordini di grandezza. In questo tipo di approccio, il farmaco poco solubile è prima dissolto in un solvente organico miscibile con l'acqua e successivamente viene aggiunto il mezzo acquoso. Alcuni dei più comuni co-solventi utilizzati in campo farmaceutico sono: propilen glicole, polietilene glicole ed etanolo [13]. L'introduzione di un co-solvente può aumentare la solubilità di molecole idrofobiche riducendo la costante dielettrica del solvente. L'equazione di Hildebrand può essere utilizzata per predire la solubilità di un farmaco in un solvente specifico (Eq. 3).

$$\chi_{sp} = \Delta^2 \times V / (R \times T) \quad \text{Equazione 3}$$

dove Δ rappresenta la differenza tra i parametri di solubilità del farmaco e del co-solvente, V è il volume molare del farmaco, R è la costante dei gas e T la temperatura espressa in gradi Kelvin. La grandezza Δ è stata divisa in 3 componenti da Hansen, per evidenziare il contributo delle forze di dispersione tra gli atomi (δ_d), delle forze di dipolo permanenti tra le molecole (δ_p), della capacità di formare legami idrogeno (δ_h), secondo l'equazione seguente (Eq.4):

$$\Delta = \left[(\delta_s - \delta_p)_{dispersion}^2 + (\delta_s - \delta_p)_{polarity}^2 + (\delta_s - \delta_p)_{hydrogen}^2 \right]^{1/2} \quad \text{Equazione 4}$$

Il principale problema correlato con l'uso di co-solventi risulta essere la precipitazione del farmaco con la diluizione dopo somministrazione. Inoltre, la tossicità dei co-solventi ne limita l'utilizzo a basse concentrazioni nella formulazione liquida finale [3].

1.3.2.2 Correzioni del pH

Accanto ai processi di salificazione, la correzione del pH della formulazione rappresenta il più comune approccio per aumentare la solubilità di un farmaco; un intervallo di pH tra 2 e 11 è generalmente accettato per formulazioni orali [14].

Per composti che possiedono gruppi ionizzabili come un acido carbossilico (HA), la solubilità varia in funzione del pH. Il pH di una soluzione di un acido debole è correlato al pKa di tale

gruppo e alla concentrazione delle forme ionizzata e non ionizzata, come espresso dall'equazione di Handerson-Hasselbach (Eq. 5):

$$pH = pKa + \log\left(\frac{A^-}{HA}\right) \quad \text{Equazione 5}$$

Se la molecola è solubilizzata ad un valore di pH diverso dal suo pKa, la sua solubilità sarà modificata in quanto nuove forze intermolecolari, principalmente attrazioni ioniche, sono introdotte. Per esempio, un gruppo acido carbossilico (-COOH) ha un pKa intorno a 4 e se il pH è portato al di sopra di 4 il gruppo -COOH è convertito nella forma -COO⁻. La carica negativa interagisce con le parziali cariche positive degli atomi di idrogeno delle molecole d'acqua. L'effetto del pH sulla solubilità di acidi deboli può essere descritta dalla seguente equazione (Eq. 6):

$$pH_p = pKa + \log\left(\frac{S - S_0}{S_0}\right) \quad \text{Equazione 6}$$

dove pH_p è il pH al di sotto del quale l'acido in forma dissociata precipita dalla soluzione, S è la solubilità totale ed S₀ è la solubilità molare dell'acido indissociato. Si assume generalmente che la forma ionizzata sia completamente solubile.

Lo stesso concetto può essere descritto per una base debole (Eq. 7):

$$pH_p = pK_w + pK_b + \log\left(\frac{S_0}{S - S_0}\right) \quad \text{Equazione 7}$$

dove pK_w è il pK dell'acqua, pK_b quello della base, pH_p è il valore di pH al di sopra del quale la base libera precipita dalla soluzione.

1.3.2.3 Complessazione

La complessazione si basa su forze relativamente deboli quali le forze di London, legami idrogeno ed interazioni idrofobiche, al fine di aumentare la solubilità apparente del farmaco

[15]. All'aumentare della concentrazione dell'agente complessante, aumenta la concentrazione del farmaco, fino ad un valore limite. In alcuni casi può verificarsi la precipitazione del complesso dalla soluzione (ad esempio utilizzando ciclodestrine poco solubili). Esistono molti tipi di agenti complessanti; in Tabella I ne sono riportati alcuni fra i più comuni.

L'inclusione all'interno delle ciclodestrine (CD) è senza dubbio il metodo più sfruttato di complessazione di farmaci poco solubili [2, 16-18]. Le ciclodestrine aumentano la solubilità di composti lipofili attraverso la complessazione farmaco-CD (1:1, 1:2 o di ordine superiore), favorita dall'ambiente idrofobico presente nella cavità della ciclodestrina. In questi oligosaccaridi ciclici la presenza di atomi di ossigeno glicosidici elettrone-ricchi è responsabile della apolarità della cavità, mentre i gruppi idrossilici esposti alla superficie esterna sono responsabili della solvatazione delle ciclodestrine.

Tabella I. Esempi di categorie di complessazione in composti farmaceutici.

TIPO	ESEMPIO
Chelati	EDTA,EGTA
Inclusione	Ciclodestrine, acido colico
Complessi molecolari	Polimeri
Coordinazione	Cloruro di esaamino cobalto III
Metallo-olefine	Ferrocene

Derivati delle ciclodestrine, quali l'idrossipropil- β -ciclodestrina, sono stati sviluppati per aumentare la loro solubilità o diminuirne la tossicità. Oltre alla loro capacità di aumentare la solubilità e la velocità di dissoluzione, le ciclodestrine trovano ulteriori applicazioni in campo farmaceutico, in quanto possono essere impiegate per aumentare la stabilità dei composti, ridurre l'evaporazione, trasformare liquidi ed oli in polveri scorrevoli o mascherare sapori ed odori sgradevoli [18].

1.3.2.4 Dispersione del farmaco in *carriers*

La miscelazione di un farmaco poco solubile con un *carrier* solubile in acqua, ad esempio polietilen-glicole, PVP, derivati della cellulosa, urea, poli-oli, consente di ottenere una miscela all'interno della quale il farmaco è presente in uno stato amorfo (dispersione solida) o molecolarmente solubilizzato (soluzione solida) [19, 20]. In contatto con un mezzo acquoso, questi materiali solidi, semisolidi o cerosi iniziano a disintegrarsi rapidamente. Una piccola quantità del farmaco solubilizzato satura il contenuto del lume intestinale mentre la restante parte di farmaco precipita sottoforma di particelle sub-microniche. Di conseguenza, l'aumento consistente dell'area superficiale genera un aumento della velocità di dissoluzione e della biodisponibilità del farmaco.

Miscele eutettiche formanti dispersioni solide possono inoltre essere utilizzate per minimizzare temperature di fusione al fine di impedire la degradazione dei farmaci.

Numerose limitazioni nei processi di produzione di dispersioni solide sono rappresentate dalla difficoltà della riproducibilità delle caratteristiche fisico-chimiche, dell'ottimizzazione del processo su scala industriale e dal problema della loro dissoluzione nel tratto gastrointestinale.

Quest'ultimo limite è stato superato introducendo tensioattivi auto-emulsionanti nella composizione di dispersioni solide, per evitare la formazione di agglomerati [21].

Dispersioni/soluzioni solide di farmaci sono prodotte tramite i metodi di estrusione per fusione, evaporazione del solvente o tramite la combinazione di questi. Metodi basati sull'evaporazione del solvente non sono tanto convenienti dal punto di vista produttivo in quanto i solventi residui sono problematici dal punto di vista regolatorio. Il processo di estrusione per fusione consente in un tempo molto breve (± 1 min) la fusione, l'omogeneizzazione e l'estrusione di dispersioni/soluzioni solide evitando la degradazione di composti termosensibili [20]. Dispersioni/soluzioni solide che possono essere formulate sia in capsule (pellets) o in compresse, rappresentano non solo un approccio promettente per l'aumento della solubilità di farmaci ma anche un metodo per ritardare o controllare il rilascio di farmaci nel tratto gastrointestinale, mediante la modulazione della composizione del polimero per ottenere una forma di dosaggio a rilascio modificato.

1.3.2.5 Uso di tensioattivi

I tensioattivi, o agenti emulsionanti, o surfattanti, sono composti anfifilici naturali o sintetici che agiscono all'interfaccia della fase acquosa e lipofila e permettono la stabilizzazione delle emulsioni diminuendo la tensione interfacciale [2]. Molti tensioattivi possono anche assemblarsi in soluzione formando aggregati. Alcuni di questi aggregati sono noti come micelle. La concentrazione alla quale i tensioattivi iniziano ad formare micelle è detta concentrazione micellare critica (CMC). Quando le micelle si formano in acqua, le loro code apolari si assemblano a formare un *core* idrofobico, mentre le teste idrofiliche costituiscono un guscio esterno a contatto con l'acqua. I tensioattivi sono spesso classificati in quattro gruppi principali: anionici, cationici, non ionici, zwitterionici. Questi composti anfifilici possono essere impiegati per formare differenti tipi di formulazioni, permettendo la solubilizzazione di composti scarsamente solubili. Queste categorie di formulazioni possono essere classificate sulla base della loro composizione, come mostrato nella Tabella II.

Formulazioni basate sulle emulsioni sono composte da acqua, olio e tensioattivi al fine di produrre emulsioni olio-in-acqua (O/W) caratterizzate da un ampio intervallo di diametro particellare (20-100 nm). Queste emulsioni richiedono energia per la loro formazione e sono termodinamicamente instabili; pertanto non sono utilizzabili per applicazioni commerciali.

Tabella II. Classificazione di formulazioni costituite da tensioattivi o lipidi in relazione ai loro costituenti.

	ACQUA	OLIO	TENSIOATTIVO	ALTRI
Emulsione	√	√	√	
Microemulsione	√	√	√	+ co-tensioattivo
SEDDS		√	√	± cosolvente
SMEDDS		√	√	
Micelle polimeriche	√		√	
Micelle polimeriche auto-assemblanti			√	

L'aggiunta di co-surfattanti di natura lipofila consente la formazione di una microemulsione termodinamicamente stabile, che forma spontaneamente gocce di dimensioni sub-microniche

(<0.1 μm) in determinate condizioni. Infatti, nei diagrammi di fase ternari si ritrova solo una piccola porzione isotropica generante microemulsioni [22].

Forme di dosaggio auto emulsionanti (*Self-Emulsifying Drug Delivery Systems*, SEDDS) e forme di dosaggio auto formanti microemulsioni (*Self-MicroEmulsifying Drug Delivery Systems*, SMEDDS) sono costituite da miscele omogenee di oli, tensioattivi ed eventualmente co-solventi, i quali formano rispettivamente emulsioni O/W e microemulsioni in seguito all'aggiunta di acqua. La principale caratteristica di queste formulazioni è che esse non contengono acqua e che il processo di emulsione avviene spontaneamente a contatto con i fluidi gastrointestinali dopo la somministrazione, per effetto del guadagno entropico. L'assenza di fase acquosa esterna aumenta la stabilità del farmaco durante la sua permanenza all'interno della formulazione. Ad esempio, applicazioni commerciali di questi sistemi sono disponibili per la somministrazione di ciclosporina A (Sandimmune[®], SEDDS e Neoral[®], SMEDDS). La principale differenza tra SEDDS e SMEDDS sta nel fatto che SEDDS generano emulsioni grossolane (*coarse*), mentre SMEDDS producono dispersioni colloidali all'interno del tratto gastrointestinale. Di conseguenza, formulazioni basate su SMEDDS mostrano una minore variabilità intra- ed inter-individuale, aumentando nello stesso tempo la biodisponibilità del farmaco per effetto dell'aumento dell'area superficiale delle microgocce. Tutti i sistemi menzionati possono anche essere classificati come formulazioni lipidiche. Esse comprendono emulsioni lipidiche (costituite principalmente da trigliceridi), SEDDS, SMEDDS, liposomi, nanoparticelle solide lipidiche (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) e micelle fosfolipidiche [23].

Recentemente, un nuovo tipo di tensioattivo costituito da polimeri di natura anfifilica è stato sviluppato per ampliare il campo di esistenza delle formulazioni tradizionali. Le micelle polimeriche che si formano presentano caratteristiche che le rendono particolarmente adatte per il *drug delivery*: sono di piccole dimensioni (<50-100 nm), sono altamente stabili nei fluidi fisiologici, possiedono proprietà “*stealth*” e sono in grado di aumentare la solubilità di un'ampia gamma di farmaci scarsamente solubili [24-27]. Inoltre, le micelle polimeriche non contengono oli nella fase interna dell'emulsione, in quanto essa è costituita dalla porzione idrofobica dei tensioattivi stessi. Sebbene alcune micelle polimeriche necessitino dell'impiego di solventi organici o di un passaggio di dialisi per essere costituite, micelle polimeriche auto-assemblanti sono in grado di formare spontaneamente emulsioni a contatto con i fluidi

gastrointestinali. Questo nuovo approccio nella solubilizzazione sarà oggetto di ulteriore discussione.

1.3.3 Modifiche fisiche

1.1.1.1 Riduzioni della dimensione particellare

Come già menzionato, la biodisponibilità di un farmaco scarsamente solubile può essere migliorata aumentando la sua solubilità apparente e la sua velocità di dissoluzione. Un modo per raggiungere questo scopo è rappresentato dalla riduzione della dimensione particellare, che induce un significativo aumento dell'area superficiale e, di conseguenza, della velocità di dissoluzione (Eq. 2, paragrafo 1.2).

La micronizzazione fu il metodo inizialmente introdotto per ridurre le dimensioni particellari. Un ampio intervallo di dimensioni particellari (0.1-25 μm) è ottenuto applicando tecniche di macinazione a getto d'aria o colloidale [2, 28]. Questi processi presentano numerose limitazioni; inoltre, l'aumento dell'area superficiale è spesso insufficiente per assicurare una completa dissoluzione durante il transito intestinale. Questa tecnica non può essere impiegata per farmaci che hanno un elevato Numero di dose (Do). Infine, l'ampio intervallo di distribuzione dimensionale delle particelle è responsabile del cosiddetto fenomeno di Ostwald per le formulazioni liquide, che consiste nella crescita dimensionale delle particelle più grandi, a discapito di quelle più piccole che tendono a scomparire; ciò è dovuto alle differenti solubilità alla saturazione e ai gradienti di concentrazione tra differenti popolazioni particellari [29].

La riduzione a dimensione nanometriche è stata in seguito sviluppata per superare gli svantaggi della micronizzazione. Questa tecnica consente di ottenere particelle di dimensioni sub-microniche (100-250 nm) con una ristretta distribuzione dimensionale [7]. Queste caratteristiche consentono di evitare il fenomeno di Ostwald e nel contempo di aumentare notevolmente la velocità di dissoluzione, mediante un considerevole aumento dell'area superficiale e un aumento della solubilità alla saturazione. Questo fenomeno è attribuito all'effetto Gibbs-Thompson (altrimenti noto come effetto Ostwald-Freudlich o effetto Kelvin), che descrive la relazione esistente tra la curvatura delle particelle, l'energia interfacciale e la solubilità. Secondo questa teoria, particelle convesse e con un piccolo raggio

di curvatura sono energeticamente sfavorite e presentano un'elevata tensione di vapore. Di conseguenza queste particelle sono soggette a una dissoluzione preferenziale e possiedono più elevati equilibri di solubilità. In alcuni casi, il loro equilibrio di solubilità può risultare al di sopra della saturazione, con conseguente precipitazione e formazione di particelle di dimensioni maggiori.

I problemi di stabilità chimica e fisica risultanti dalle particelle nanometriche sono rilevanti tanto quanto i problemi di umettabilità delle nanosospensioni idrofobiche. Pochi metodi esistono per ottenere nanosospensioni di particelle. Possono essere ottenute sia per cicli multipli di omogeneizzazione ad alta pressione, sia per precipitazione con solventi organici miscibili in acqua (con le già citate limitazioni) o tramite la macinazione ad elevata energia [2, 7].

1.3.3.1 Ricristallizzazione

Molte sostanze solide possono esistere in differenti forme fisiche. Il polimorfismo è definito come la capacità di una sostanza di esistere in due o più forme cristalline che presentano differenti arrangiamenti e/o conformazioni della molecola nel reticolo cristallino [30]. Solidi amorfi consistono in arrangiamenti disordinati delle molecole e non possiedono un reticolo cristallino definito.

I polimorfi di uno stesso farmaco possono avere differenti proprietà chimiche e fisiche quali punto di fusione, reattività chimica, solubilità apparente, velocità di dissoluzione, proprietà ottiche ed elettriche, pressione di vapore, densità. Queste proprietà hanno conseguenze dirette sulle caratteristiche del prodotto farmaceutico quali stabilità, dissoluzione, biodisponibilità. La selezione di un polimorfo altamente solubile dovrebbe essere fatta in accordo con le sue caratteristiche di stabilità fisica e chimica. Quindi, non può essere esclusa la possibilità di conversione di un polimorfo metastabile ad elevata energia in una forma cristallina a bassa energia scarsamente solubile, promossa da variazioni nelle condizioni ambientali, nei processi di fabbricazione o per effetto del tempo [2].

2. MICELLE POLIMERICHE COME ECCIPIENTI SOLUBILIZZANTI NELLA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI

2.1 DEFINIZIONE

Numerose definizioni possono essere date ai sistemi micellari. In generale, si può affermare che una soluzione micellare è un sistema colloidale di associazione di macromolecole anfifiliche (tensioattivi o copolimeri). Queste molecole, ad un determinato valore di concentrazione detto concentrazione micellare critica (CMC) formano delle associazioni tridimensionali aventi dimensioni che dipendono dalla loro architettura [31]. Le micelle hanno generalmente delle dimensioni comprese tra i 10 ed i 50 nanometri e sono formate dall'associazione di 50-100 molecole anfifiliche.

In un mezzo acquoso, le porzioni idrofobiche si uniscono e formano una zona centrale idrofoba (*core*), mentre le porzioni idrofiliche si ritrovano all'esterno. Questa cavità apolare idrofoba permette di ospitare farmaci poco solubili in soluzione acquosa e anche di proteggerli da degradazioni o di modificare la loro distribuzione all'interno dell'organismo. Dopo somministrazione endovenosa, le micelle permettono di prolungare i tempi di permanenza all'interno del circolo sistemico [32] ed un targeting passivo di organi o siti tumorali.

Il maggiore ostacolo riscontrato nell'utilizzo delle micelle polimeriche è rappresentato dalla loro stabilità nei fluidi biologici e dalla loro emivita all'interno dell'organismo. Micelle di grandi dimensioni sono immediatamente catturate dai macrofagi; micelle caratterizzate da elevati valori di CMC si dissociano rapidamente in seguito a diluizione e i monomeri costitutivi sono eliminati per filtrazione renale. Una piccola dimensione nonché l'utilizzo del PEG come corona idrofila assicurano una lunga circolazione sanguigna [33]. Una piccola dimensione conferisce inoltre alle micelle la capacità di attraversare i tessuti endoteliali intestinali e la barriera ematoencefalica [32]. In generale, le micelle di dimensioni comprese tra i 10 ed i 50 nm passano attraverso le cellule degli epitelii per endocitosi.

2.2 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE

Al di sotto della loro concentrazione micellare critica (CMC), i tensioattivi sono dispersi sotto forma di unimeri preferenzialmente all'interfaccia aria/acqua a causa della loro natura anfifilica. All'aumentare della concentrazione del tensioattivo fino ad un valore che determina la saturazione dell'interfaccia (CMC), gli unimeri si auto-assemblano in strutture micellari. Questo processo di associazione riguarda un numero di unimeri che varia dalle decine alle centinaia fino a formare micelle sferiche (nella maggior parte dei casi) con una dimensione regolare che varia dai 20 ai 100 nm (Fig. 3) [3, 24]. La porzione idrofobica va a costituire il *core* della micella mentre la porzione idrofilica forma il guscio polare esposto al mezzo acquoso. Il *core* idrofobico viene quindi stabilizzato dalla superficie idrofila, che forma un'interfaccia tra la fase acquosa e l'interno apolare. Unimeri liberi in soluzione e unimeri aggregati in micelle sono in costante equilibrio. La CMC è regolata termodinamicamente e dipende principalmente dalla composizione dei segmenti idrofobici formanti il *core*. Di conseguenza, un aumento nella idrofobicità o nella lunghezza della porzione lipofila degli unimeri diminuisce la CMC e quindi assicura una migliore stabilità cinetica (al di sotto della CMC) e termodinamica (al di sopra della CMC) delle micelle, ritardando la loro disorganizzazione in unimeri. La CMC di micelle costituite da block copolimeri è generalmente nell'ordine di 10^{-6} – 10^{-7} M mentre quelle dei tensioattivi convenzionali a basso peso molecolare è dell'ordine di 10^{-3} – 10^{-4} M [3].

2.3 COMPOSIZIONE

Gli eccipienti polimerici formanti micelle sono costituiti da unimeri anfifilici che includono generalmente monomeri di polietilene glicole (PEG) come porzione idrofila. Questo polimero, approvato dall'FDA, è neutro e facilmente idratante ed è largamente impiegato per minimizzare le interazioni del materiale di interesse con proteine, cellule o enzimi [34]. Anche se il PEG è il più diffuso componente idrofilo, altri polimeri con queste caratteristiche sono utilizzati, ad esempio la poli(*N*-isopropilacrilamide) [35], il poli(*N*-vinil-2-pirrolidone) [36] e il poli(vinil alcol) [37].

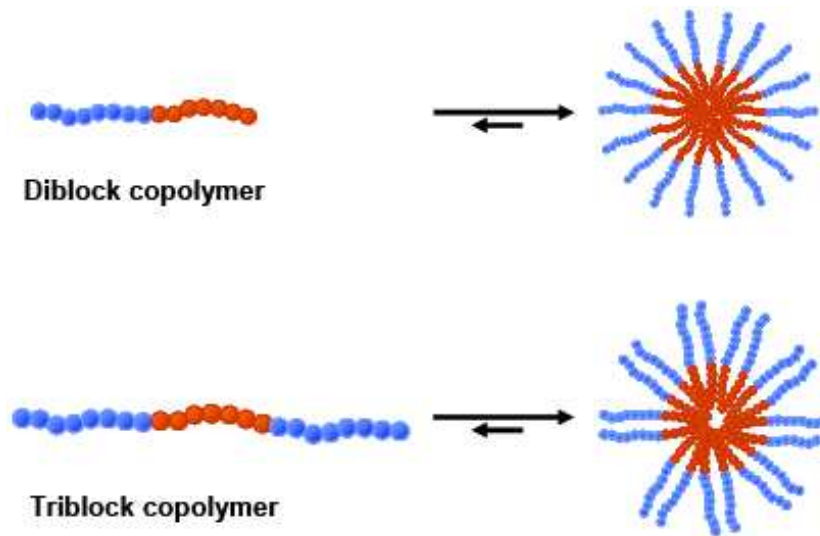


Figura 3. Rappresentazione di differenti costruzioni di copolimeri nella forma di unimeri o autoassemblati in micelle al di sopra del loro valore di concentrazione micellare critica (CMC).

Per quanto riguarda la porzione idrofobica delle micelle polimeriche, è utilizzata una grande varietà di materiali, che possono essere raggruppati in tre categorie: poli(propilene ossido), poli(esteri) e poli(L-aminoacidi) [3, 24]. Una successione di monomeri idrofobici costituenti la porzione apolare dell'unimero è legata covalentemente ad una successione di monomeri idrofilici al fine di costituire un unimero anfifilico. Questo tipo di assemblaggio è detto "diblock copolimero" (A-B) (Fig. 3).

Nel caso di un "triblock copolimero" (A-B-A), due porzioni idrofobiche circondano la porzione idrofila. Il polimero idrofilico può anche costituire una catena principale alla quale i blocchi idrofobici sono attaccati come catene laterali (copolimero "graft").

Mentre i poli(esteri) e poli (L-aminoacidi) sono biodegradabili (e riassorbiti nel caso dei poli(L-aminoacidi)), i poli (propilene ossidi) sono escreti immodificati dopo filtrazione renale [3].

2.4 FORMULAZIONE

I metodi di preparazione di micelle, così come il caricamento del farmaco all'interno del *core*, sono dipendenti dalle caratteristiche chimico-fisiche del polimero. Nel caso di polimeri

moderatamente idrofobici, è applicato il metodo della dissoluzione diretta. Il farmaco scarsamente solubile è solubilizzato nel polimero sotto agitazione e l'aggiunta di una fase acquosa determina la formazione dell'emulsione e l'inclusione del farmaco all'interno del *core* [38].

Nel caso di polimeri insolubili in acqua possono essere impiegati vari metodi: dissoluzione in solvente organico, seguito da un processo di dialisi acquosa, oppure il metodo del *casting*, che consiste nella formazione di un'emulsione o/w seguita dall'evaporazione del solvente o da una liofilizzazione al fine di produrre le micelle caricate di farmaco (Fig. 4).

Per i polimeri di natura anfifilica, quali ad esempio i polossameri, oggetto di questa ricerca, i metodi di preparazione delle micelle e caricamento del farmaco all'interno del loro *core* lipofilo (che verranno descritti più dettagliatamente in seguito), risultano essere relativamente semplici: essi consistono essenzialmente in metodi di dissoluzione a caldo [39] o a freddo (metodo "Schmolka", [40]).

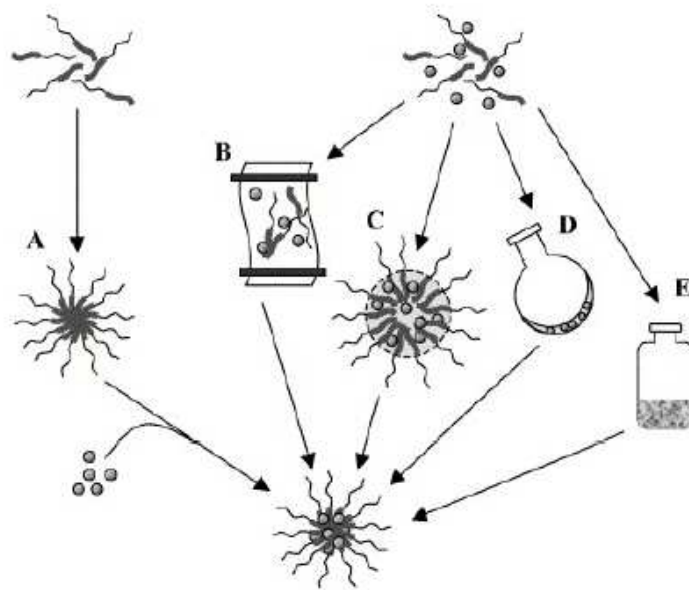


Figura 4. Differenti metodi per il caricamento di farmaci all'interno di micelle polimeriche: (A) equilibrio, (B) dialisi, (C) emulsione O/W, (D) solution casting, (E) freeze drying (da Gaucher *et al.*, 2005 [39]).

2.5 SOMMINISTRAZIONE ORALE

Come descritto in precedenza, varie strategie possono essere valutate da parte del formulatore per superare problemi di solubilità dei farmaci. Per composti ionizzabili, la soluzione più

comune risulta essere l'impiego di forme salificate e aggiustamenti del pH. Nonostante ciò, non può essere trascurato il problema della precipitazione del farmaco al momento del contatto con i fluidi gastrointestinali dovuto alle variazioni di pH nel tratto gastrointestinale (Fig. 5).

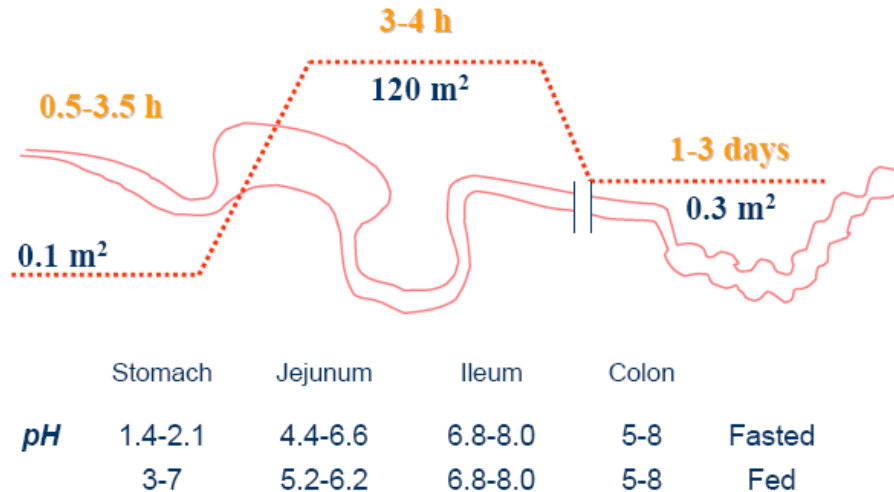


Figura 5. Rappresentazione schematica del tratto gastrointestinale: superficie, tempo di residenza e pH dello stomaco e delle varie porzioni dell'intestino (fonte: Nikem Research).

Per quanto riguarda composti non ionizzabili, l'uso dei tensioattivi convenzionali o co-solventi può anch'esso portare alla precipitazione del farmaco in seguito a diluizione del composto solubilizzato nei fluidi fisiologici [24].

La necessità di creare un più efficiente *carrier*/solubilizzante per composti farmaceutici lipofili ha condotto allo sviluppo di un nuovo tipo di tensioattivi basati su strutture polimeriche.

Le micelle polimeriche sono strutture nanometriche (100 nm) formate da copolimeri anfifilici costituiti da porzioni idrofiliche e lipofiliche che si auto assemblano in acqua, al di sopra di un certo valore di concentrazione detta concentrazione micellare critica (CMC) [26]. Le micelle sono costituite da una porzione interna, detta *core*, ed una porzione esterna, detta *shell*. A causa della natura idrofobica del *core*, esse risultano particolarmente adatte alla solubilizzazione di molecole insolubili, alla protezione contro la degradazione chimica ed enzimatica e per il rilascio modificato all'interno di varie formulazioni [3]. A seconda della

specificità e delle proprietà dei gruppi funzionali presenti sia nella porzione interna che nella porzione esterna delle micelle, le interazioni micella-farmaco avranno un carattere chimico, fisico o elettrostatico.

Le micelle polimeriche sono più sicure in termini di tossicità rispetto agli agenti solubilizzanti normalmente utilizzati per la somministrazione parenterale, quali l'olio di ricino polietossilato (Cremophor EL) o il polisorbato 80 (Tween 80) [13, 27, 41, 42].

Micelle con blocchi costituiti da poli(etilen ossido) sono stericamente stabilizzate e subiscono una minore opsonizzazione e sequestro da parte dei macrofagi del sistema reticolo endoteliale (RES) (Stealth[®]), conferendo alle micelle un maggior tempo di permanenza in circolo [43, 44]. Inoltre, la loro dimensione nanometrica permette una buona distribuzione anche nei piccoli capillari, oltre che l'extravasazione negli intersizi vascolari tumorali [24]. Queste caratteristiche di aumentata permeabilità e ritenzione ("*Enhanced Permeability and Retention*", EPR), sono estremamente utili per il *targeting* passivo di farmaci antitumorali, che sono spesso poco solubili.

L'importanza di trasportatori per l'efflusso di farmaci (ad esempio la glicoproteina P, P-gp) in trattamenti farmacologici ha portato allo sviluppo di inibitori per questi trasportatori in associazione ai farmaci somministrati in terapia [45, 46]. Alcuni tipi di micelle polimeriche inibiscono le P-gp e sono quindi in grado di ridurre l'efflusso di farmaci in differenti tessuti, come in tumori resistenti a farmaci, all'interno del tratto gastrointestinale e a livello della barriera ematoencefalica, offrendo un metodo per superare il problema della resistenza o dello scarso assorbimento [47].

Le micelle polimeriche risultano essere inoltre versatili rispetto alle esigenze formulative in quanto possono presentare porzioni funzionalizzate per il *drug targeting* o pH-sensibili ed infine tali formulazioni possono essere sterilizzate facilmente. Per la combinazione di queste vantaggiose caratteristiche, l'uso di micelle polimeriche è una delle più promettenti strategie nell'ambito delle nanotecnologie [27, 48].

2.6 SISTEMI COLLOIDALI PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI ATTRAVERSO LA PELLE

La pelle rappresenta uno dei più organizzati ed efficienti sistemi barriera del nostro organismo, che si oppone al passaggio della maggior parte delle molecole tranne quelle lipofile di piccole dimensioni. L'ottenimento di flussi di farmaco costanti e sufficientemente elevati attraverso la pelle, senza alterarne le sue caratteristiche di permeabilità, rappresenta pertanto un obiettivo difficilmente raggiungibile. La somministrazione di farmaci attraverso la pelle mediante l'impiego di sistemi non invasivi può essere ottenuta mediante l'impiego di *carriers* colloidali.

2.6.1 La pelle come barriera anatomica

La pelle umana rappresenta un sistema complesso di trasporto con una caratteristica organizzazione anatomica e chimica. La porzione più importante che garantisce la funzionalità di barriera è rappresentata dallo strato più esterno, lo strato corneo, costituito da strati di corneociti strettamente impacchettati tra loro, organizzati in gruppi di circa dodici celle per strato (*clusters*). Lo strato corneo della pelle dei mammiferi è costituito da circa 15 strati di corneociti, con uno spessore totale che va dai 6 agli 8 μm . I corneociti sono uniti tra di loro dai desmosomi e isolati da speciali lipidi intercellulari adesi alle membrane cellulari. La qualità, la cristallinità e la quantità totale (<15% in peso) dei lipidi dello strato corneo determinano le caratteristiche della pelle quale sistema barriera altamente efficiente.

2.6.2 La pelle come barriera di diffusione

Dal punto di vista della permeabilità, la barriera cutanea è assimilabile ad uno strato lipidico all'interno del quale le molecole si spostano per trasporto di tipo diffusivo. Il processo è regolato essenzialmente dalle caratteristiche di idrofilia e lipofilia della molecola permeante, dalle sue dimensioni e dalla sua capacità di formare legami idrogeno. Di conseguenza, molecole dal peso molecolare maggiore di qualche centinaio di Dalton e/o altamente polari (comprese le molecole d'acqua) non possono attraversare efficientemente la pelle per diffusione.

La maggior parte di colloidali di grosse dimensioni non è in grado di penetrare all'interno della pelle in quantità significativa; solamente i sistemi costituiti da particelle di dimensioni

inferiori ai 10 μm sono in grado di attraversare la barriera cutanea sfruttando gli annessi cutanei (follicolo pilifero).

2.6.3 La pelle come barriera nano porosa semipermeabile

Dal punto di vista della permeabilità, la pelle si comporta come una barriera meccanica nanoporosa percorsa da un elevato numero di aperture semicircolari. La sezione di tali pori è considerata variare secondo alcuni autori da 0.4 a 36 nm, secondo altri da 20 a 30 nm; una informazione precisa e dettagliata a riguardo non è attualmente disponibile. Si assume in generale che la distribuzione dimensionale dei pori sia non simmetrica, con un picco attorno ai 20 nm. La densità dei pori aperti all'interno della pelle è stimata essere attorno ai 10^8 - $10^9/\text{cm}^2$, ottenuta mediante misure di corrente elettrica transcutanea (ionoforesi) e misure di flusso di acqua.

2.6.4 Localizzazione e natura dei percorsi idrofili all'interno della pelle

Le caratteristiche di barriera della pelle non risultano essere uniformi in quanto i percorsi idrofili che separano i corneociti di uno stesso cluster dipendono dal grado di idratazione, che varia in relazione a differenti pressioni e stress subiti dalla pelle nelle varie zone dell'organismo. Essi presentano elevate resistenze alla permeazione, che vanno dai lipidi intercellulari alla membrana del corneocita adiacente. Al contrario, i cammini idrofili che legano diversi *clusters* di corneociti presentano una minore resistenza alla permeazione e possono agire come una via shunt, molto ampia e aperta in modo permanente.

2.6.5 Interazioni di sistemi colloidali con la pelle

Le micelle anfifiliche di vari polimeri rappresentano i più piccoli sistemi colloidali contemplati per l'applicazione transdermica. Esse hanno una dimensione che varia dai 10 ai 30-40 nm. La dimensione della maggior parte dei nanocolloidi inorganici, quali le particelle di oro o di biossido di titanio, hanno delle dimensioni paragonabili. Queste strutture compatte, quasi sferiche sono praticamente indeformabili; solamente quelle di forma allungata possono muoversi in direzione perpendicolare al loro asse per pochi nanometri, mentre i sistemi deformabili o "soft" sono in grado di percorrere distanze pari a diverse centinaia di nanometri. L'interazione di un farmaco con un sistema colloidale a livello cutaneo spesso ha come conseguenza una scarsa ripartizione del farmaco all'interno della barriera ed una conseguente

diminuzione del trasporto. Un sistema colloidale può anche avere un effetto positivo nel trasporto transdermico di un farmaco: può ridurre lo spessore cutaneo per effetto di una riorganizzazione lipidica indotta per effetto oclusivo, effetto tanto maggiore quanto maggiore è la lipofilia del farmaco.

Inoltre i sistemi colloidali possono indurre modifiche nell'attività del solvente alla superficie cutanea che possono influenzare la velocità di diffusione del farmaco attraverso lo strato corneo. Il risultato può essere positivo o negativo, a seconda dell'aumento o della diminuzione della solubilità.

Il flusso di un farmaco attraverso una membrana dipende dalla sua attività termodinamica (o grado di saturazione). La variazione della solubilità apportate dall'inclusione di una molecola in un sistema micellare possono pertanto avere ripercussioni significative sul flusso, come mostrato dall'equazione di Higuchi (Eq. 8) che correla il flusso di farmaco con l'attività termodinamica:

$$J = \frac{Da}{\gamma_m h} \quad \text{Equazione 8}$$

dove D è il coefficiente di diffusione, a è l'attività termodinamica della molecola permeante, γ_m è il coefficiente di attività della molecola permeante e h è lo spessore della membrana.

3. POLOSSAMERI TRIBLOCK COPOLIMERI

I polossameri sono i polimeri anfifilici più ampiamente studiati per le applicazioni in campo formulativo sono derivati dei copolimeri poli(etilen ossido)- poli(propilen ossido)-poli(etilenossido) (PEO-PPO-PEO) [49, 50]. I Pluronic[®] sono polossameri a catena lineare; la loro struttura generale è mostrata nella Figura 6.

Questi polimeri appartengono alla famiglia dei cosiddetti “eccipienti funzionali o materiali intelligenti”. Questo nuovo concetto mette in discussione la definizione di eccipiente inerte, in quanto è oramai accettato che numerosi polimeri di largo impiego possiedono caratteristiche funzionali, sfruttate e studiate in ambito formulativo al fine di modificare l’attività e le caratteristiche sfavorevoli di un farmaco.

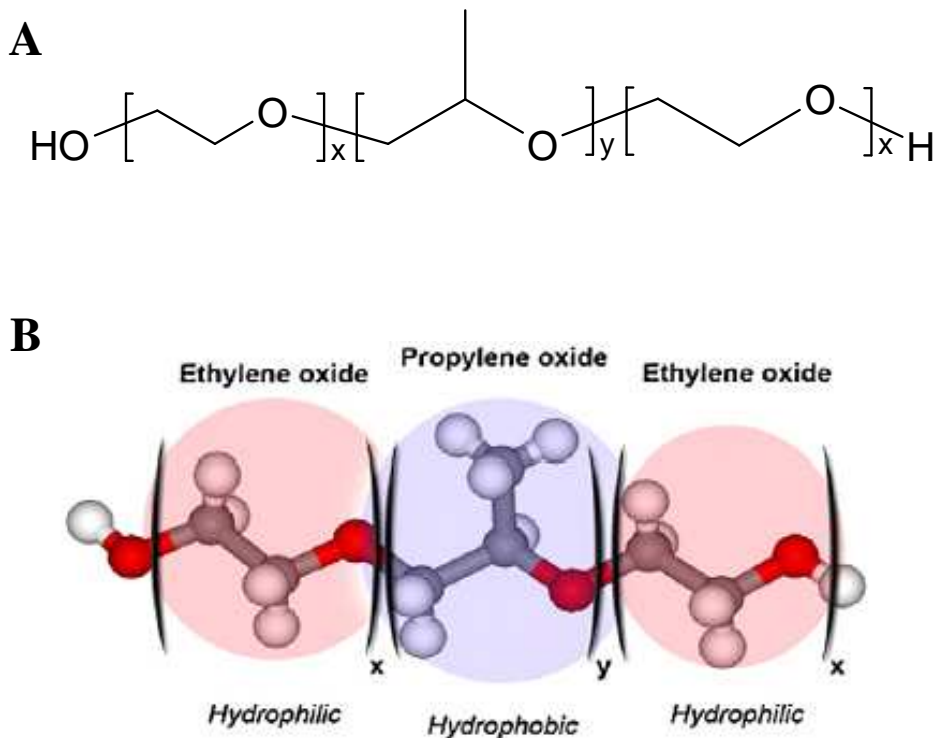


Figura 6. Struttura generale dei Pluronic[®]: A: lineare; B: tridimensionale da: Batrakova *et al.*, [51].

Soluzioni acquose di polossameri mostrano una transizione solido-gel se riscaldate (spesso ad una temperatura attorno ai 37° C), il che li rende particolarmente interessanti per la progettazione di matrici iniettabili per applicazioni biomediche poco invasive [40, 52].

Essi possono essere iniettati/impiantati come liquidi poco viscosi che formano impianti solidi per riscaldamento. Questi materiali sono non irritanti se applicati a livello topico o sottocutaneo, provocano lieve irritazione se amministrati per via intramuscolare o intraperitoneale [53] e mostrano una buona citocompatibilità quando posti a contatto con differenti tipi di cellule [54, 55].

Anche se materiali di tipo PEO-PPO-PEO sono non degradabili, molecole con un peso molecolare in un intervallo compreso tra i 10 e i 15 kDa sono generalmente filtrate dal rene ed eliminate nelle urine. Kabanov et al. hanno studiato le cinetiche di distribuzione di Pluronic® P85 [56]. I loro studi hanno dimostrato che la *clearance* renale degli unimeri del polimero rappresenta la via di eliminazione principale. In aggiunta, una porzione significativa di P85 è riassorbita nel sangue.

Numerosi PEO-PPO copolimeri sono stati approvati dall'FDA e dall'EPA come materiali termo-viscosizzanti e hanno trovato applicazione come additivi nei cibi, come eccipienti farmaceutici e anche come prodotti in campo agricolo [57-59]. Si presentano generalmente sottoforma di granuli bianchi, cerosi, dotati di buona scorrevolezza, inodori ed insapori [60] o come liquidi altamente viscosi. Soluzioni acquose di polossameri in presenza di alcali, acidi e ioni metallici sono molto stabili; questi copolimeri risultano solubili in solventi organici polari e non polari e risultano disponibili in vari pesi molecolari (Tabella III).

3.1.1 Proprietà di aggregazione dei polossameri

Uno dei metodi maggiormente utilizzati per la determinazione della CMC e della CMT (temperatura critica di micellizzazione) è rappresentato dal metodo del pirene, una sonda fluorescente [61]. Vengono misurati lo shift verso il blu del suo spettro di emissione e lo shift verso il rosso del suo spettro di eccitamento in seguito al passaggio della molecola da un ambiente acquoso ad un ambiente idrofobico.

Il processo di micellizzazione dei polossameri in acqua è regolato da vari fattori, che si possono suddividere in parametri che dipendono dalle caratteristiche del polimero e parametri ambientali.

Tabella III. Caratteristiche fisico-chimiche dei più comuni Pluronic®.

Copolimero	PM (Da) ^a	No. Medio EO (x) ^b	unità	No. Medio unità PO (y) ^b	HLB	pH(sol. Acquosa 2.5%)	CMC (M) ^c
L35	1900	21.6		16.4	19	5.0-7.5	5.3x10 ⁻³
L43	1850	12.6		22.4	12	5.0-7.5	2.2x10 ⁻³
L44	2200	20.00		22.8	16	5.0-7.5	3.6x ⁻³
L61	2000	4.55		31	3	5.0-7.5	1.1x10 ⁻⁴
L62	2500	11.4		34.5	7	5.0-7.5	4.0x10 ⁻⁴
L64	2900	26.4		30	15	5.0-7.5	4.8x10 ⁻⁴
F68	8400	38.6		29.3	29	6.0-7.4	4.8x10 ⁻⁴
L81	2750	6.3		42.7	2	5.0-7.5	2.3x10 ⁻⁵
P84	4200	38.2		43.5	14	5.0-7.5	7.1x10 ⁻⁵
P85	4600	52.3		39.7	16	6.0-7.4	6.5x10 ⁻⁵
F87	7700	122.5		39.8	24	6.0-7.4	9.1x10 ⁻⁵
F88	11400	207.3		39.3	28	6.0-7.0	2.5x10 ⁻⁴
L92	3650	16.6		50.3	6	5.0-7.5	8.8x10 ⁻⁵
F98	13000	236.4		44.8	28	6.0-7.4	7.7x10 ⁻⁵
L101	3800	8.6		59.0	1	5.0-7.5	2.1x10 ⁻⁶
P103	4950	33.8		59.7	9	5.0-7.5	6.1x10 ⁻⁶
P104	5900	53.6		61.0	13	5.0-7.5	3.4x10 ⁻⁶
P105	6500	73.9		56.0	15	5.0-7.5	6.2x10 ⁻⁶
F108	14600	265.5		50.3	27	6.0-7.4	2.2x10 ⁻⁵
L121	4400	10.0		68.3	1	6.0-7.4	1.0x10 ⁻⁶
P123	5750	39.2		69.4	8	6.0-7.4	4.4x10 ⁻⁶
F127	12600	200.5		65.2	22	6.0-7.4	2.8x10 ⁻⁶

^a Peso molecolare medio fornito dal produttore (BASF, Wyandotte, MI)

^b Il numero medio delle unità PO e EO è stato calcolato utilizzando il peso molecolare medio [62]

^c Valori calcolati mediante il metodo del pirene [50]

3.1.1.1 Composizione del polimero: rapporto EO/PO e peso molecolare

Alexandridis *et al.* hanno dimostrato che il processo di micellizzazione è fortemente governato dal guadagno in termini di entropia e che l'energia libera di micellizzazione dipende principalmente dal blocco PPO [63]. Il guadagno entropico è legato al rilascio per effetto del calore di molecole d'acqua ordinate attorno al segmento idrofobico PPO, che costituiscono il guscio di idratazione. Maggiore è il contenuto in unità PEO (minore rapporto EO/PO) e più basso è il peso molecolare del polimero, maggiore risulta essere la temperatura critica di micellizzazione (CMT) [64]. Un aumento nel contenuto di PPO diminuisce sia il

valore di CMC che di CMT [65]. I valori di CMC e CMT diminuiscono all'aumentare del peso molecolare per copolimeri che abbiano rapporti EO/PO simili.

3.1.1.2 Temperatura

L'effetto della temperatura sul processo di micellizzazione di copolimeri PEO-PPO-PEO è ampiamente riportato in letteratura. Copolimeri meno idrofobici (rapporto EO/PO più elevato) o aventi un minore peso molecolare non si aggregano a temperatura ambiente, ma iniziano a formare micelle a temperature più elevate.

Un lieve aumento della temperatura porta ad una consistente diminuzione della CMC, ad un aumento nelle dimensioni delle micelle e ad un aumento della frazione di polimero aggregato in strutture micellari. Questi effetti possono essere studiati mediante analisi FTIR. Quando la temperatura della soluzione acquosa è prossima alla CMT, lo *stretching* asimmetrico dei legami C-H dei gruppi metilici si sposta a lunghezze d'onda più basse. Ciò indica che i gruppi metilici si trovano in un ambiente meno polare a causa del fatto che il calore indebolisce l'interazione dei gruppi metilici con l'acqua. All'aumentare della temperatura, la vibrazione simmetrica dei gruppi metilici è rappresentata da due bande che possono essere correlate allo stato idratato e non idratato del polimero. Pertanto la variazione delle proporzioni di polimero disidratato/ idratato in funzione della temperatura osservabile tramite l'analisi di uno spettro FTIR, è correlato ad una variazione dell'idrofobicità del polimero e ad una variazione della CMC [66].

3.1.1.3 Aggiunta di sali: influenza del tipo di sale e della forza ionica

Dal momento che molti farmaci presentano carattere ionico e i componenti delle formulazioni contengono generalmente sali ai fini di tamponare il pH e di bilanciare la forza ionica, essi possono influenzare il comportamento delle micelle di polossameri in un mezzo acquoso. L'aggiunta di elettroliti aventi cationi e anioni di grandezze e polarizzabilità differenti può condurre a: i) un effetto "salting out" stabilizzante; ii) un effetto "salting in" destabilizzante [67]. In generale, si osserva una diminuzione della CMC e della CMT all'aumentare della concentrazione di sali [68-72].

Studi condotti tramite sali contenente lo stesso catione hanno dimostrato che le proprietà del contro-ione sono altrettanto rilevanti. Per sali di potassio, l'effetto sul processo di micellizzazione segue la serie seguente: $KCl > KBr > KI$ [68, 73]. In un altro studio è stato dimostrato che mentre NaCl ha un effetto stabilizzante, cioè diminuisce la CMC sviluppando l'idrofobicità nella porzione PPO e diminuendo l'idrofilia della porzione PEO, NaSCN mostra il comportamento opposto [74].

Pandit e Kisaka hanno riportato che sali contenenti anioni multivalenti, ad una certa concentrazione impediscono alle soluzioni di Pluronic[®] F127 di gelificare e ciò sta ad indicare un effetto destabilizzante [75]. Alcuni autori hanno proposto una *critical micelle salt concentration* (CMSC) per indicare la concentrazione del sale a cui le micelle iniziano a formarsi.

3.1.1.4 Piccole molecole organiche

Ci si attende che farmaci solubilizzati modifichino il processo di aggregazione e la stabilità delle micelle. La maggior parte dei lavori di ricerca si è concentrata sulle proprietà solubilizzanti delle micelle polimeriche di polossameri e non sull'influenza delle molecole sugli aggregati.

Alexandridis *et al.* hanno dimostrato che la presenza di urea aumenta sia la CMC che la CMT [76]. Al contrario, il fenolo diminuisce la CMC a causa delle sue interazioni con le catene PEO [77].

Quando un altro tensioattivo, il sodio dodecil solfato (SDS) viene aggiunto a Pluronic[®] F127, le molecole di surfattante si associano agli unimeri impedendo il processo di micellizzazione [78, 79].

La presenza di naprossene ed indometacina non ha influenza sulla CMC, sebbene essi causino una diminuzione nella dimensione delle micelle e nel numero di micelle in soluzione [80], mentre la pilocarpina cloruro diminuisce la CMC dallo 0.5% allo 0.25% [81]. Gli alcoli a corta catena (ad esempio etanolo), impediscono la formazione di micelle in acqua [82], mentre alcoli a media catena e alcoli alifatici maggiormente idrofobici (ad esempio butanolo) favoriscono l'aggregazione [83, 84].

3.1.1.5 Concentrazione del polimero

La concentrazione del polimero è un altro aspetto da considerare nel processo di micellizzazione. In generale, più elevata è la concentrazione del polimero, minore è la temperatura alla quale avviene la micellizzazione (CMT) [67, 73].

3.1.1.6 Il pH

Le molecole dei polossameri non presentano porzioni pH sensibili all'interno della loro struttura. Per questo motivo, gli studi sull'influenza del pH sul processo di aggregazione sono molto limitati. Yang *et al.* hanno indagato il processo di micellizzazione di Pluronic® P123 in presenza di soluzioni a diverse concentrazioni di HCl [85] e hanno concluso che la CMT di tale Pluronic® aumenta all'aumentare della concentrazione dell'acido. Questo fenomeno può essere spiegato con l'aumento dell'interazione tra i gruppi alchilici e le molecole d'acqua protonate.

3.1.2 Solubilizzazione in micelle di polossameri di farmaci scarsamente solubili

Le proprietà solubilizzanti delle micelle polimeriche (Fig. 7) sono generalmente espresse in termini di coefficiente di ripartizione micella-acqua, definito come il rapporto tra la concentrazione del farmaco solubilizzato all'interno della micella e la concentrazione del farmaco molecolarmente disperso nel mezzo acquoso, espressa in molarità [86, 87].

La capacità di solubilizzazione può essere espressa sia in termini di frazione di massa del farmaco solubilizzato nel *core* micellare, sia come numero di moli solubilizzate rispetto al peso in grammi della porzione idrofobica, sia come rapporto molare tra le moli di farmaco nel *core* delle micella e le moli del polimero all'interno dell'aggregato (*molar solubilization ratio*, MSR).

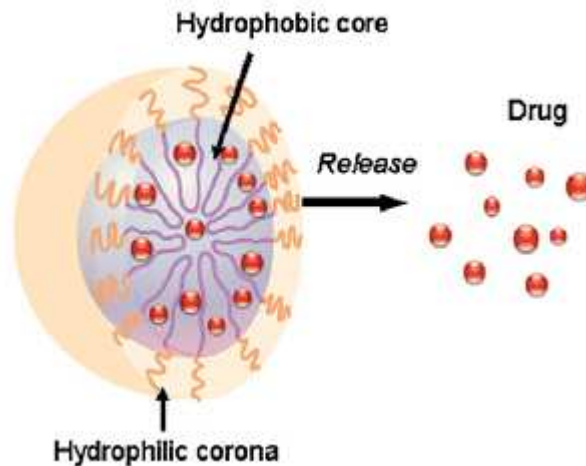


Figura 7. Rappresentazione schematica di una micella solubilizzante un farmaco [51].

La massima capacità solubilizzante dei materiali anfifilici coincide con la formazione di micelle [88]. Nonostante ciò, Paterson *et al.* hanno mostrato un aumento della solubilità del naftalene anche al di sotto della CMC. Quando la concentrazione aumenta al di sopra della CMC, si osserva un netto aumento della solubilità apparente della molecola che si inserisce nel *core* idrofobico micellare e ciò è stato dimostrato mediante un modello di solubilità che gli stessi autori hanno proposto:

Se $C_s < CMC$

$$\frac{S_{apparent}}{S} = 1 + K_{unimer} \cdot C_s$$

Se $C_s > CMC$

$$\frac{S_{apparent}}{S} = 1 + K_{unimer} \cdot CMC + K_{micelle} \cdot (C_s - CMC)$$

dove $S_{apparent}$ è la solubilità acquosa misurata nella soluzione contenente il surfattante, S è la solubilità in acqua espressa in moli/litro. C_s è la concentrazione del surfattante nella fase acquosa, $K_{unimero}$ e $K_{micelle}$ sono costanti di equilibrio che descrivono rispettivamente l'interazione soluto-unimeri ($< CMC$) e soluto-micelle ($> CMC$).

In generale, la solubilizzazione aumenta la dimensione del core micellare e diminuisce la CMC [86]. Il raggio aumenta sia a causa dell'incorporazione del soluto, sia a causa dell'aumento del numero di aggregazione. Derivati più idrofobici (minore rapporto EO/PO) mostrano una più elevata capacità di solubilizzazione e maggiori aumenti delle dimensioni micellari. Al contrario, la porzione esterna della micella (*shell*) subisce minori cambiamenti. L'effetto della concentrazione del polimero sulla solubilizzazione è esemplificato nella Figura 8, che mostra la solubilizzazione del naftalene in Polossamina 803 (P103, un polossamero a catena non lineare) a 25° C ed ad un pH di 10.3 [88]. Risulta evidente come al di sopra della CMC un graduale aumento della concentrazione del polimero conduca a notevoli incrementi nella solubilità del soluto, al contrario di ciò che avviene al di sotto della CMC. Si può quindi concludere che il processo di solubilizzazione è intimamente legato al processo di micellizzazione e che i parametri che governano entrambi i processi sono gli stessi: temperatura e idrofobicità del tensioattivo.

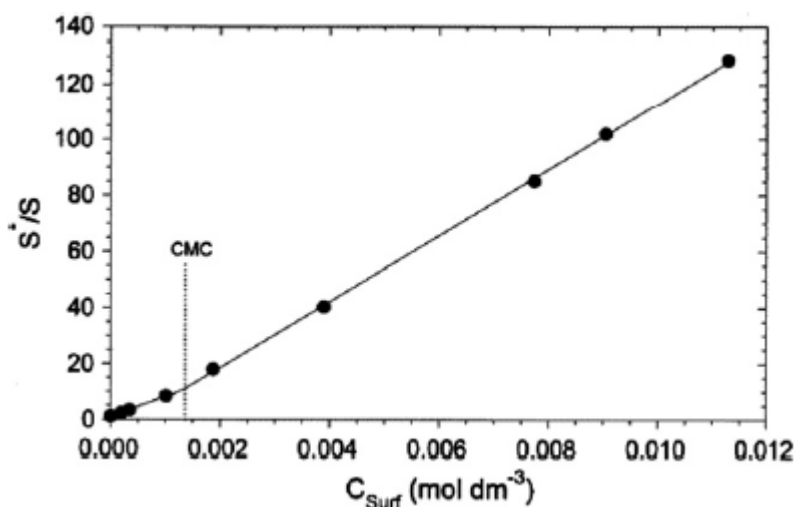


Figura 8. Enhancement ratio (S_w/S) in funzione della concentrazione di Polossamina P103 [88].

3.1.3 Stabilizzazione delle micelle

Uno dei problemi principali riguardanti l'uso di micelle polimeriche per la solubilizzazione dei farmaci è la diluizione che esse subiscono in vivo (spesso al di sotto della CMC), che provoca una diminuzione della porzione di farmaco incorporata nella micella. I valori di CMC

osservati per i polossameri sono generalmente nell'intervallo 5×10^{-3} molare fino all'1%. La velocità di dissociazione del farmaco dalla micella è correlata alla composizione, stato fisico e coesione del *core* micellare. E' stato dimostrato che la stabilità micellare aumenta all'aumentare della lunghezza del segmento idrofobico e dell'idrofobicità totale del tensioattivo. A causa della rilevanza di questo fenomeno, numerose strategie chimiche e fisiche sono state studiate per aumentare la stabilità di micelle polimeriche di tipo PEO-PPO. Anche se una circolazione prolungata delle micelle non porta sempre ad un aumento dell'indice terapeutico del farmaco, una interazione forte farmaco-*core* è responsabile di un rilascio graduale del farmaco con conseguente ottenimento dei livelli terapeutici.

Sono stati proposti 3 metodi alternativi per stabilizzare le micelle di polossameri [89]: i) *cross-linking* radicalico iniziato di un monomero reattivo (ad esempio stirene), ii) inclusione di una piccola concentrazione di olio vegetale nella soluzione del copolimero, iii) polimerizzazione di un idrogel sensibile alla temperatura nel *core* della micella e formazione di una struttura semipermeabile localizzata all'interno del *core*. Tali metodi hanno mostrato numerosi limiti: il primo ha mostrato compromettere la capacità di incorporazione del farmaco da parte delle micelle, a causa dell'elevata densità del *cross-linking*; il secondo provoca una diminuzione della degradazione micellare per diluizione in seguito ad una diminuzione della CMC. L'ultimo metodo ha mostrato i migliori vantaggi: la struttura formata all'interno del *core* stabilizza le micelle ad una concentrazione inferiore alla CMC e nel contempo la stabilizzazione non risulta essere permanente ma scompare in un periodo di tempo che va dai giorni a qualche settimana.

Una nuova strategia consiste nel *cross-linking* dello *shell* micellare. Gruppi idrossilici terminali subiscono modificazioni per migliorare la reattività e vengono fatti reagire con agenti accoppianti o in reazioni di polimerizzazione tramite radicali liberi. Possono essere osservati due effetti differenti: i) stabilizzazione delle micelle; ii) permeabilità dello *shell* modulabile, al fine di controllare la velocità di rilascio del farmaco [90]. Solo pochi studi riportano esempi di quest'ultima strategia.

In generale, si può riassumere che le proprietà delle micelle così modificate al fine di aumentarne la stabilità possono variare in termini di dimensioni, capacità di incorporazione del farmaco e profili di rilascio.

3.1.4 Significato biologico delle micelle e degli unimeri

Come precedentemente descritto, le micelle di Polossameri sono utilizzate come *carriers* per numerosi farmaci, di cui aumentano la solubilità, la stabilità metabolica ed il tempo di circolazione. Le micelle, tramite opportune modifiche apportate alla superficie esterna costituita dalle unità EO, possono essere utilizzate per il *targeting* specifico di molecole a determinati siti bersaglio [91].

Anche gli unimeri dei polossameri rivestono ruoli importanti nella somministrazione di farmaci. Per esempio, l'interazione degli unimeri con cellule tumorali multi-resistenti a farmaci ha come risultato la sensibilizzazione di queste cellule nei confronti di numerosi agenti chemioterapici [92, 93]. Inoltre, gli unimeri sono in grado di inibire i trasportatori per l'efflusso di farmaci sia a livello della barriera ematoencefalica che nell'intestino [94, 95].

3.1.5 Caratteristiche chimico fisiche di Pluronic® F127

Le soluzioni acquose di Pluronic® F127 mostrano la proprietà di termo reversibilità, che risulta essere di notevole interesse nell'ambito dell'ottimizzazione delle formulazioni farmaceutiche. Il fenomeno della termogelificazione reversibile è il risultato dell'interazione di differenti segmenti del copolimero. All'aumentare della temperatura, il processo di micellizzazione è seguito dal processo di gelificazione per concentrazioni sufficientemente elevate di copolimero; la gelificazione è dovuta all'impacchettamento ordinato delle micelle. Ad una concentrazione compresa tra il 20 ed il 40% di Pluronic® F127, si osserva tramite analisi SAXS (*Small Angle X-Ray Scattering*) un'organizzazione delle micelle in strutture cubiche e delle interazioni tra le micelle stesse che producono gel ad elevata viscosità e caratterizzati da una lenta dissoluzione. Queste proprietà facilitano l'incorporazione sia di molecole idrofile che idrofobe.

3.1.5.1 Preparazione delle formulazioni termo reversibili

Le soluzioni di Pluronic® F127 vengono generalmente preparate con il cosiddetto “*cold method*” [40], cioè il polimero è sciolto in un solvente acquoso a basse temperature. La bassa temperatura facilita la dissoluzione del polimero, ciò è dovuto all'aumento della solvatazione in seguito alla formazione di legami idrogeno.

Con questo metodo è possibile preparare facilmente soluzioni di Pluronic® F127 al 20-30% (p/p); tali soluzioni risultano essere liquide alla temperatura di 4-5 gradi centigradi e si trasformano in gel a temperatura ambiente. Il gel ritorna allo stato liquido quando la temperatura è riportata ai valori di 4-5 gradi.

Per ottenere una concentrazione del 35% (p/p) è necessario porre la soluzione del polimero in congelatore per qualche minuto al fine di ottenere la dissoluzione del polimero [91, 96, 97].

La sterilizzazione in autoclave (120° C, 15 min, 1 bar) appare compatibile, non altera significativamente le caratteristiche di viscosità delle soluzioni di Pluronic® F127 e permette di preparare soluzioni sterili da iniettare o utilizzare, ad esempio, per somministrazione oculare. Nessuno studio è stato fin'ora condotto al fine di verificare la possibile degradazione del polimero in seguito a questo metodo di sterilizzazione.

3.1.5.2 Comportamento temoreversibile di Pluronic® F127

Quando il polimero è posto in acqua fredda, uno strato di idratazione circonda le molecole, le cui porzioni idrofobiche sono separate da legami idrogeno. All'aumentare della temperatura, avviene la desolvatazione delle catene idrofobiche per effetto della rottura dei legami idrogeno formati tra il solvente e le catene stesse. Ciò ha come conseguenza la formazione di legami idrofobici tra i gruppi polipropilene-ossido, con formazione di un gel micellare allo stato liquido. All'aumentare della temperatura la fase micellare liquida assume una struttura cubica [98]. A temperature più elevate, si forma una fase costituita da cilindri esagonali impacchettati (Fig. 9).

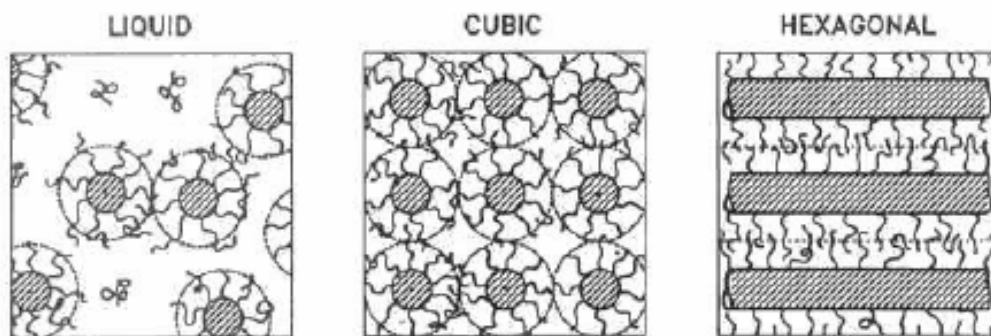


Figura 9. Figura schematica che illustra le fasi micellari formate dai Pluronic all'aumentare della temperatura.

Il processo di gelificazione di Pluronic[®] F127 è il risultato della disidratazione del polimero che porta ad un contatto tra le catene e al loro associazione per interazione idrofobica [99].

Il peso molecolare e la percentuale di porzione idrofobica del polimero sono fattori critici per il processo di gelificazione e la temperatura alla quale avviene la gelificazione termoreversibile per ogni polimero varia in funzione della sua concentrazione. Pluronic[®] F127 risulta essere particolarmente interessante nell'ambito dei *drug delivery systems* dal momento che soluzioni concentrate (>20% p/p), a bassa viscosità e trasparenti a basse temperature, diventano gel solidi alla temperatura corporea.

3.1.5.3 Resistenza del gel

La determinazione in vitro della resistenza del gel fornisce indicazioni preziose per preparare formulazioni di adeguata consistenza [100]. La determinazione della resistenza del gel viene effettuata ponendo il gel in un cilindro e sottoponendolo ad una pressione tramite un pistone. Il tempo impiegato dal sistema a percorrere una certa distanza all'interno della formulazione, è rappresentativo della sua resistenza [85, 101]. Essa aumenta con la temperatura e all'aumentare della concentrazione del polimero e può essere alterata in presenza di farmaci o additivi. Da un lato, il diclofenac, l'etanolo il glicole propilenico indeboliscono i gel di Pluronic[®] F127; dall'altro lato il cloruro di sodio, il sodio monoidrogeno fosfato e la glicerina esercitano l'effetto opposto [85, 102].

3.1.5.4 Proprietà reologiche

Le caratteristiche reologiche di gel di Pluronic[®] F127 rappresentano un aspetto chiave delle formulazioni e dovrebbero essere studiate in dettaglio. Queste valutazioni vengono condotte con i metodi di flusso o con i metodi oscillatori.

Tramite i metodi di flusso è stato dimostrato che al di sotto delle temperatura di transizione soluzione-gel, Pluronic[®] F127 mostra un comportamento di tipo newtoniano. La viscosità delle soluzioni aumenta drasticamente all'aumentare della temperatura; al di sopra della temperatura di transizione soluzione-gel, le caratteristiche reologiche diventano di tipo non-newtoniano [100, 103, 104]. La temperatura di transizione soluzione-gel corrisponde al punto di flesso della curva della viscosità apparente in funzione della temperatura [100].

Tramite gli studi oscillatori vengono determinate le proprietà viscoelastiche sottoponendo il campione ad una *shear stress* di tipo sinusoidale [96, 105-107] e vengono condotti studi di tipo oscillatorio per calcolare i parametri G' e G'' che rappresentano rispettivamente l'energia elastica immagazzinata e l'energia viscosa dissipata. In questo caso al temperatura di transizione soluzione-gel è rappresentata dalla temperatura alla quale $G' = G''$.

3.1.5.5 Proprietà adesive

La definizione delle proprietà (bio)adesive di un materiale è di fondamentale importanza quando si desidera prolungare il tempo di residenza di una formulazione, in particolare nell'ambito delle applicazioni topiche (preparazioni rettali, oftalmiche, cutanee). La forza di bioadesione in genere aumenta all'aumentare della resistenza del gel ed è influenzata dagli stessi parametri che regolano il processo di gelificazione: temperatura e concentrazione di Pluronic[®]. Come è stato precedentemente illustrato, la presenza di vari solventi o agenti ionici può alterare le caratteristiche di adesione delle formulazioni di polossamero. A causa della sua azione promuovente l'adesione, NaCl è stato incluso in alcune preparazioni di Pluronic[®] F127 per prolungare il tempo di residenza nel sito di somministrazione [102].

Sperimentalmente, vengono condotti studi in vitro per la determinazione della forza di distacco, in condizioni che mimano quelle fisiologiche oppure utilizzando sostanze inerti.

La determinazione delle caratteristiche di mucoadesione è di notevole interesse per quanto riguarda le formulazioni per somministrazione rettale, il cui distacco dalla mucosa rappresenta un problema assai frequente. Il mantenimento del farmaco nell'intestino retto rappresenta un'importante strategia per evitare il metabolismo di primo passaggio epatico. Le Ray *et al.* [108] hanno condotto test di mucoadesione utilizzando tubi costituiti da materiali flessibili inerti (polietilene) e mucosa intestinale di coniglio. Gli stessi autori hanno sviluppato una cella di adesione a flusso continuo e hanno incorporato un colorante (Ponceau S) all'interno del Pluronic[®] F127 per facilitare la visualizzazione delle proprietà di adesione.

Un sistema simile è stato descritto per suppositori di Pluronic[®] F127 contenenti diclofenac [102].

Per valutare le proprietà di bioadesione in vivo, i suppositori vengono somministrati nell'intestino retto di ratti. La distanza in vivo percorsa dalla formulazione all'interno dell'intestino (distanza di migrazione) viene valutata mediante l'impiego di coloranti (Blue

n°1 lake 0.1% p/p) ed è risultata essere un buon indicatore delle proprietà di mucoadesione [101]. Generalmente, all'aumentare della forza di mucoadesione si osserva una diminuzione della distanza percorsa dalla formulazione e quindi si osserva un aumento dell'area sottesa dalla curva di concentrazione plasmatica.

Per suppositori liquidi formulati con Pluronic[®] F127/Pluronic[®] F68 quali copolimeri termoreversibili e propanololo come composto terapeuticamente attivo [101], la biodisponibilità rettale è stata correlata con la forza di mucoadesione ($r=0.984$) e la distanza di migrazione ($r=0,951$).

Sono stati utilizzati anche altri tessuti fisiologici (la cornea di coniglio in caso di applicazioni oftalmiche) ma il numero di questi studi risulta essere più limitato [109].

3.1.6 Applicazioni farmaceutiche di Pluronic[®] F127

Le peculiari caratteristiche termo reversibili e le promettenti proprietà nel rilascio di farmaci rendono Pluronic[®] F127 un candidato molto interessante nella somministrazione di farmaci attraverso differenti vie.

3.1.6.1 Applicazioni topiche e transdermiche

La termoreversibilità soluzione-gel caratteristica dei Pluronic[®] consente di applicare una soluzione sulla superficie cutanea che, ad una opportuna concentrazione, forma un gel non occlusivo alla temperatura corporea. I gel di Pluronic[®] F127 assorbono la secrezione delle ghiandole sudoripare [96, 110] e mostrano una ottima tolleranza a livello locale [111], persino nel trattamento delle scottature [112].

- *Farmaci analgesici ed antiinfiammatori*

Molti autori hanno proposto i gel di Pluronic[®] F127 come sistemi per il rilascio di farmaci a livello topico [113-131], in quanto presentano notevoli vantaggi rispetto ai sistemi tradizionali in termini di facilità di applicazione e caratteristiche di rilascio del farmaco. Molti studi si sono focalizzati sullo sviluppo di formulazioni topiche/transdermiche contenenti farmaci analgesici o antiinfiammatori [113, 117, 119-121] applicate alla pelle a basse dosi per

alleviare il dolore e le infiammazioni localizzate spesso in presenza di promotori di assorbimento.

Miyazaki *et al.* [113] hanno studiato la somministrazione percutanea di indometacina in gel termo reversibili di Pluronic[®] F127. In studi di assorbimento percutaneo in vivo condotti sul ratto gli autori hanno mostrato che il gel acquoso alla concentrazione del 20% può essere utilizzato nella pratica per la somministrazione del farmaco. L'aggiunta di isopropil miristato o (+) limonene alla formulazione aumenta in modo significativo l'assorbimento percutaneo, in particolare quando il gel viene applicato in condizioni occlusive.

Wang *et al.* [114] hanno studiato l'assorbimento in vitro ed in vivo di capsaicina nonivamide da idrogels di Pluronic[®] F127, valutando la quantità del farmaco accumulata all'interno della pelle con il metodo dello Skin Stripping e mediante la successiva valutazione dell'indice di eritema tramite il metodo Mexameter. L'inclusione della capsaicina e della nonivamide all'interno del gel di Pluronic[®] ha come effetto un rilascio ritardato dei farmaci ed un effetto eritematogeno non dipendente dalla dose. Kattan *et al.* [115] hanno studiato l'effetto di sostanze che aumentano la lipofilia (terpeni) e l'effetto della concentrazione di etanolo utilizzando l'idrossipropil cellulosa e due formulazioni di Pluronic[®] F127 per l'assorbimento transdermico di ketoprofene. Tali studi hanno mostrato una correlazione tra la lipofilia del terpene e le proprietà di promozione dell'assorbimento. L'etanolo ha mostrato un effetto sinergico con l'azione promotrice dei terpeni.

Liaw *et al.* [119] hanno studiato l'assorbimento percutaneo di fentanil in vitro ed in vivo a partire da gel di Pluronic[®] F127, attraverso membrane di cellulosa (cell.Step[®] T1, cut-off molecolare 3500) oppure pelle di topo *nude* (esperimenti in vitro). I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in vivo utilizzando il modello animale coniglio per l'ottenimento dei dati farmacocinetici del farmaco rilasciato da patch di Pluronic[®] F127 al 46%. Le preparazioni a base di Pluronic[®] F127 contenenti fentanil si sono dimostrate particolarmente promettenti: il gel al 47% consente di ottenere un rilascio prolungato del farmaco; i profili di rilascio di fentanil a partire da patch di Pluronic[®] F127 mostrano l'ottenimento di un rilascio steady state di farmaco per 24 ore, che viene mantenuto per 72 ore con un'emivita maggiore di 10 ore.

Negli studi di Escobar Chavez *et al.* [120] è stato studiato in vivo l'effetto di Azone[®] e Transcutol[®] sull'aumento della penetrazione di naprossene sodico a partire da gel di Pluronic[®] F127; i due promotori dell'assorbimento mostrano un effetto sinergico nell'aumentare la

penetrazione transdermica di farmaco. E' stata valutata inoltre l'influenza delle due sostanze sulla viscosità delle formulazioni.

- *Farmaci antitumorali*

La somministrazione topica dei farmaci antitumorali 5-fluorouracile e adriamicina in formulazioni contenenti Pluronic[®] F127 è stata studiata da Miyazaki *et al.* [132], che hanno valutato l'effetto della concentrazione del polimero e della temperatura sulla velocità di rilascio del farmaco. L'aumento della concentrazione del polimero sembra diminuire la velocità di rilascio del farmaco, mentre l'aumento della temperatura da 30 a 44 gradi centigradi aumenta la velocità di rilascio.

Erukova *et al.* [121] hanno condotto studi interessanti per la valutazione dell'effetto di Pluronic[®] sulla permeabilità di acidi e basi deboli di differenti pesi molecolari. Gli autori hanno dimostrato che i Pluronic[®] facilitano la permeazione di molecole relativamente di grosse dimensioni attraverso doppi strati lipidici, mentre la permeazione di piccoli soluti rimane pressoché inalterata rispetto a quella ottenuta in assenza del polimero. L'effetto dei Pluronic[®] è correlabile con il contenuto in unità propilen ossido: il loro effetto è maggiore quanto maggiore è il numero di unità PPO rispetto a quelle PEO nel copolimero. E' stato proposto che i Pluronic[®] aumentino il processo di diffusione del soluto all'interno del doppio strato lipidico (secondo una modalità che dipende dalla struttura) piuttosto che influenzare la velocità di assorbimento/desorbimento del soluto sulla superficie della membrana.

- *Peptidi e proteine*

La somministrazione transdermica di peptidi e proteine rappresenta oggi una delle principali sfide in ambito di tecnologia farmaceutica. Alcuni studi [122] hanno dimostrato che gel di Pluronic[®] F127 si sono dimostrati un'ottima piattaforma per la promozione dell'assorbimento di peptidi in presenza di promotori chimici (acido linoleico, mentone) e fisici (ionofresi) .

- *Farmaci antidiuretici*

Nair *et al.* [123] hanno descritto l'attività farmacocinetica e farmacodinamica dell'argininavasopressina (AVP), un peptide ad attività antidiuretica somministrato attraverso

l'applicazione delle ionoforesi transdermica a partire da gel di Pluronic[®] F127. Tale copolimero è risultato particolarmente utile al fine di produrre gel stabili e non ha dimostrato influire sul rilascio di AVP. Inoltre, i profili di rilascio del farmaco hanno mostrato una cinetica di tipo Higuchi, il che sta ad indicare che il principale meccanismo di rilascio del farmaco dal gel è di tipo diffusivo.

- *Antibiotici e antisettici*

Nello studio di Zhang *et al.* [124] è stato valutato sia il rilascio di ceftiofur da gel di Pluronic[®] F127 sia i profili di dissoluzione del gel. E' stata dimostrata una buona correlazione tra il rilascio del farmaco e la percentuale in peso di Pluronic[®] dissolto; ciò sta ad indicare che la velocità di rilascio di farmaco è controllata dalla dissoluzione del gel.

Gilbert *et al.* [133] hanno studiato il rilascio di acido benzoico da gel di Pluronic[®] F127 contenenti differenti concentrazioni di polimero. Il rilascio del farmaco diminuisce all'aumentare della concentrazione del polimero, probabilmente a causa dell'aumento nel numero e nelle dimensioni delle micelle con conseguente diminuzione nella dimensione e nel numero di canali acquosi.

- *Cicatrizzazione ed ustioni*

Le caratteristiche peculiari di Pluronic[®] F127 sono state anche sfruttate nel trattamento di danni ossei nell' osteogenesi imperfetta [126] ed inoltre è stato dimostrato che i gel di Pluronic[®] F127 sono in grado di mimare in modo soddisfacente le funzioni fisiologiche dell'epidermide agendo non solo come una sorta di "pelle artificiale" [127], ma anche come veicolo per la somministrazione di piccole molecole proteiche come l'*epidermal growth factor* (EGF) [128, 134] al fine di accelerare la cicatrizzazione della pelle dopo ustioni.

3.1.6.2 Applicazioni buccali

- *Farmaci antiinfiammatori*

Gel di Pluronic[®] F127 per applicazione buccale sono stati studiati al fine di valutare il rilascio di triamcinolone acetone in presenza ed in assenza di promotori di assorbimento [129]. Il Pluronic[®] agisce come un *reservoir* da cui il farmaco viene rilasciato in seguito ad

applicazione topica, in quanto forma un gel biadesivo soffice a contatto con la mucosa buccale.

- *Farmaci ipoglicemizzanti*

Il rilascio di insulina a partire da gel di Pluronic[®] F127 contenenti acidi grassi insaturi ha dato come risultato un notevole e prolungato effetto ipoglicemizzante, dimostrando che i gel di Pluronic[®] al 20% contenenti l'acido oleico risultano essere formulazioni potenzialmente molto promettenti per il rilascio di insulina a livello buccale, offrendo un rilascio prolungato del farmaco a causa della funzione *reservoir* che la formulazione esplica [130].

3.1.6.3 Applicazioni rettali

- *Farmaci antiinfiammatori*

I gel di Pluronic[®] F127 sono stati studiati per la somministrazione rettale di indometacina e si sono rivelati particolarmente utili come preparazioni per uso rettale assicurando un'azione prolungata del farmaco con riduzione degli effetti collaterali [132].

- *Acidi grassi a corta catena*

Gli acidi grassi a corta catena in formulazioni semisolide sono somministrati a livello del colon al fine di diminuire l'escrezione di sostanze attive e promuoverne l'assorbimento; vengono utilizzati inoltre nel trattamento di coliti ulcerose distali. Nel lavoro di ricerca di Charrueau *et al.* [100] sono stati preparati gel di Pluronic[®] F127 a differenti concentrazioni all'interno di un intervallo del 17-20%. Per ciascuna formulazione sono stati valutati la viscosità, la temperatura di gelificazione e le proprietà mucoadesive in vitro. La soluzione di concentrazione pari al 18% è risultata formare un gel a 37° C, possedere proprietà mucoadesive e assicurare un rilascio controllato di acidi grassi a corta catena.

- *Farmaci antimalarici*

Fawaz *et al.* [135] hanno sviluppato e valutato la *performance* di formulazioni rettali per uso pediatrico contenenti chinina per il trattamento di attacchi malarici acuti. Le formulazioni sviluppate devono assicurare un rilascio prolungato di farmaco, ma il tempo di permanenza nel retto non deve essere eccessivo, per evitare l'espulsione della formulazione. L'utilizzo del

gel termoreversibile a base di Pluronic[®] F127 permette di ottenere tempi di residenza del farmaco significativamente superiori rispetto a quelli della soluzione, assicura il rilascio prolungato di farmaco (con cinetica di diffusione di tipo non-fickiano) e non mostra effetti irritanti o dannosi sulla mucosa rettale.

3.1.6.4 Applicazioni oftalmiche

- *Epidermal growth factor*

Un gel contenente Pluronic[®] F127 (16%) e Pluronic[®] 188 (14%) è stato utilizzato per la somministrazione oftalmica di EGF complessato con idrossipropil-beta-ciclodestrina [109]. Il gel contenente il complesso EGF-ciclodestrina allo 0.5% ha mostrato avere una favorevole temperatura di gelificazione (35.5° C), assicura il rilascio prolungato di farmaco rispetto alla soluzione e aumenta l'area sotto la curva di concentrazione in funzione del tempo nel fluido lacrimale di coniglio, in cui la concentrazione dell'EGF diminuisce secondo una cinetica di primo ordine.

- *Farmaci parasimpaticomimetici*

La pilocarpina formulata sottoforma di particelle colloidali con poliisobutilcianoacrilato è stata incorporata in gel di Pluronic[®] F127. La risposta miotica, misurata nell'occhio di coniglio albino, ha dimostrato essere di durata significativamente maggiore dopo somministrazione del farmaco in gel di Pluronic[®], rispetto alle nanoparticelle di farmaco formulato con poliisobutilcianoacrilato. Questo è essenzialmente dovuto all'aumento da parte di Pluronic[®] F127 del tempo di contatto del farmaco con i tessuti oculari, con conseguente aumento della biodisponibilità a livello oculare [136].

3.1.6.5 Applicazioni intranasali

Pluronic[®] F127 non è un veicolo adatto per le formulazioni nasali. Lente cinetiche di rilascio di farmaci al sito di assorbimento nasale possono costituire uno svantaggio a causa dell'esposizione prolungata alle peptidasi, come osservato per soluzioni di ACTH in Pluronic[®] F127. L'aggiunta di promotori come il sodio glicolato e la bacitracina a

formulazioni contenenti Pluronic[®] F127 al 20%, non hanno indotto alcun aumento significativo della biodisponibilità [137].

3.1.6.6 Applicazioni sottocutanee

Moghimi [44] ha dimostrato che la distribuzione linfatica di nanosfere rivestite di Pluronic[®] F127 iniettate per via interstiziale è controllata dalla configurazione superficiale dei segmenti EO del copolimero assorbito. In nanosfere parzialmente rivestite, le code EO si dispongono lateralmente sulla superficie della nanosfera, assumendo una configurazione “piatta” oppure “a fungo”. Queste strutture vengono rapidamente trasferite dal sito di somministrazione sottocutaneo al sistema linfatico, vengono catturate dai sistemi *scavenger* dei linfonodi e sono suscettibili di fagocitosi. Quando la concentrazione del polimero è di almeno 75 µg/ml o superiore, le catene EO sono impacchettate più efficientemente e trasferite più rapidamente al sistema linfatico, sfuggendo alla *clearance* linfonodale macrofagica, raggiungono il circolo sistemico e vi rimangono per tempi più lunghi. Questi esperimenti hanno offerto delle informazioni utili nell’ambito dell’ottimizzazione di nano sistemi per il targeting linfatico.

3.1.6.7 Applicazioni intramuscolari

- *Farmaci antitumorali ed analgesici*

Formulazioni iniettate localmente a base di Pluronic[®] F127 hanno dimostrato un rilascio lento di farmaco al sito di somministrazione. I gel termo reversibili di Pluronic[®] F127 riducono la degradazione del farmaco nel tessuto muscolare e contribuiscono a rallentare l’assorbimento nel torrente circolatorio. I profili farmacocinetici ottenuti in seguito a somministrazione di queste formulazioni mostrano picchi plasmatici più appiattiti e più prolungati nel tempo rispetto alle formulazioni classiche.

Pluronic[®] F127 aumenta la stabilità del farmaco incluso, in particolare per peptidi e proteine come insulina e deslorelina [138, 139].

Il farmaco paclitaxel incluso in un gel di Pluronic[®] F127 al 20% è stato iniettato a livello intratumorale nel modello animale topo affetto da melanoma. La crescita iniziale del tumore è stata ritardata del 67% ed il tempo di raddoppiamento del volume del tumore è stato aumentato del 72% rispetto ad un controllo del farmaco in soluzione salina [140].

Una formulazione contenente lidocaina al 2% iniettata nelle vicinanze del nervo sciatico è stata sviluppata con Pluronic[®] F127 al 25%; tale formulazione ha mostrato un aumento dell'effetto anestetico migliore rispetto a quello ottenuto con formulazioni contenenti derivati della cellulosa come agenti viscosizzanti.

Anche dal punto di vista della tollerabilità, il polimero ha mostrato caratteristiche soddisfacenti: dopo somministrazione è stata riscontrata solo una debole o assente irritazione del tessuto muscolare scheletrico. Nessun segno di reazione infiammatoria consistente è stata riscontrata nel tessuto muscolare circondante il nervo sciatico.

Nuove linee di ricerca si stanno orientando verso l'inserimento di questi copolimeri in formulazioni contenenti liposomi o microsfele. Paavola *et al.* [141] hanno sviluppato un gel di ibuprofene liposomiale per singola iniezione intramuscolare, a lunga durata d'azione, per il trattamento del dolore epidurale. Il gel liposomiale consente un controllo del rilascio del farmaco e assicura un profilo di permeazione favorevole per il mantenimento di livelli costanti di farmaco.

3.1.6.8 Applicazioni endovenose

- *Cicatizzazione di ustioni*

Paustin *et al.* [142] hanno mostrato un sorprendente aumento dello spessore cutaneo in topi ustionati trattati con Pluronic[®] F127 per via endovenosa. Gli animali sacrificati 48 ore più tardi hanno mostrato una significativa riduzione del grado di contrazione della ferita, che appare cicatrizzata negli animali trattati con la soluzione del copolimero.

3.1.7 Proprietà farmacologiche di Pluronic[®] F127

Oltre al suo utilizzo in ambito formulativo, Pluronic[®] F127 possiede proprietà farmacologiche riportate in letteratura. L'occlusione vasale temporanea ottenuta con gel di Pluronic[®] F127 può avere applicazioni terapeutiche [143]. Inoltre, alcuni studi hanno suggerito che microemulsioni olio in acqua basate su Pluronic[®] F127 sono in grado di estrarre farmaci di natura lipofila (ad esempio bupivacaina) dal plasma in caso di sovradosaggio [144]. Inoltre Pluronic[®] F127 è stato oggetto di numerosi studi farmacologici riguardanti il suo ruolo nel sistema immunitario, nella moltiplicazione cellulare, nei tumori e nel metabolismo lipidico.

3.1.7.1 Promozione della moltiplicazione cellulare

Pluronic[®] F127 è stato proposto come *carrier* di precursori del materiale osseo sia per via topica che per via sistemica [126]. Facilita la sintesi precoce del collagene e la microcircolazione.

La velocità di crescita e attecchimento di fibroblasti umani gengivali contenuti in soluzioni di Pluronic[®] F127 è stata valutata in vitro da Hokett *et al.* [145] utilizzando colture cellulari. I Pluronic[®], a concentrazioni molto basse hanno mostrato effetti benefici sulla cicatrizzazione precoce post operatoria, facilitando la crescita e l'adesione dei fibroblasti alla dentina.

3.1.7.2 Proprietà immuno-modulatorie

Pluronic[®] F127 esercita una modulazione significativa della funzione immunitaria e promuove l'azione di numerosi antigeni. Esso mostra un effetto sinergico con il chitosano sulla risposta immunitaria sistemica e mucosale ottenuta con la tossina tetanica dopo somministrazione intranasale. Il meccanismo resta per ora sconosciuto ma gli autori hanno ipotizzato che il gel del Polossamero aumenti la biodisponibilità dell'antigene tramite le sue caratteristiche di termoreversibilità e di promozione della stabilità.

Oltre a ciò, un'azione specifica di tipo immunomodulatorio è stata dimostrata in numerosi studi. Il significativo aumento della velocità sia della risposta immunitaria umorale che cellulare nella cicatrizzazione di ferite ed ustioni è stata riscontrata da diversi gruppi di ricerca.

Molti Polossameri, tra cui Pluronic[®] F127 aumentano l'espressione transgenica e l'espressione di plasmidi di DNA nel muscolo scheletrico di topo. Questa capacità di promuovere il trasferimento di geni è stata osservata utilizzando vari modelli sperimentali [56].

In aggiunta, i polossameri si adsorbono fortemente sulla superficie di diversi tipi di nanosfere idrofobiche quali ad esempio quelle di poli(stirene), acido poli(lattico-co-glicolico), poli(metacrilato) e poli(butil 2-ciano acrilato) [49]. Il pretrattamento di microsfeere sembra favorire la distribuzione di farmaci a determinate aree dell'organismo. Ad esempio, microsfeere colloidali di polistirene rivestite di Pluronic[®] F127 si depositano preferenzialmente nelle cellule sinusoidali endoteliali del midollo osseo dopo somministrazione endovenosa nel

coniglio. Si ritiene che questo effetto possa essere dovuto ad un effetto repulsivo generato dal segmento PEO che altera l'interazione delle proteine e l'adesione delle microsfele.

Nanoparticelle rivestite di Pluronic[®] F127 risultano costituire una strategia interessante per evitare il metabolismo di primo passaggio epatico. Sembra che il polimero agisca come un "travestimento" che impedisce il riconoscimento da parte dei macrofagi [146]. E' stato osservato uno scarso accumulo in vari organi, tra cui il fegato, si può concludere quindi che Pluronic[®] F127 agisca in maniera positiva sull'opsonizzazione, passaggio critico per quanto riguarda la biodisponibilità.

3.1.7.3 Promozione della citotossicità

I polossameri possono interagire con cellule tumorali multi resistenti a farmaci rendendole sensibili all'azione di farmaci. Il *target* farmacologico di questa citotossicità non è chiaro. L'azione antitumorale include meccanismi complessi come l'aumento della fluidità delle membrane cellulari, la deplezione di ATP, l'inibizione dell'efflusso dei farmaci e la riduzione nell'azione detossificante GSH/GST.

Studi preliminari condotti su animali hanno mostrato che l'azione antitumorale di daunorubicina e doxorubicina è aumentata di due o tre ordini di grandezza in presenza di Pluronic[®] F127. Studi clinici di fase I sono in corso con formulazioni contenenti combinazioni di polossameri (0.25% Pluronic[®] L61 (Poloxamer 181) e 2% Pluronic[®] F127) e doxorubicina. Questo sistema formulato in soluzione isotonica salina tamponata è costituito da micelle miste (22-27 nm) che contengono il farmaco.

3.1.8 Pluronic[®] F127: dati tossicologici

Recenti studi hanno messo in discussione lavori precedenti che affermavano un'assenza di tossicità da parte di Pluronic[®] F127 in qualunque via e modalità di somministrazione. In realtà, la somministrazione parenterale di Pluronic[®] F127 porta a una seria alterazione del metabolismo lipidico ed ha effetti sulla filtrazione renale. Pochi sono gli studi in cui è stata valutata la concentrazione di Pluronic[®] F127 nei fluidi biologici; in questi casi vengono formati complessi copolimero-tiocianato di cobalto per verificare l'accumulo nel plasma e in tessuti omogenati di ratto. Inoltre, è stata rilevata una captazione epatica preferenziale di

Pluronic[®] F127 rispetto alla captazione renale e ciò può spiegare le alterazioni riscontrate a livello del metabolismo lipidico [147, 148]. Un'emivita basata su dati di escrezione renale è stata stimata attorno alle 20.9 ore [149]. I dati sui profili farmacocinetici soprattutto nell'uomo rimangono non specificati.

3.1.8.1 Alterazione del metabolismo lipidico

La somministrazione intraperitoneale di Pluronic[®] F127 induce una significativa ipertrigliceridemia e ipercolesterolemia [150-152]. Il copolimero interferisce con l'attività catalitica di 3-OH-3 metilglutaril Coenzima A reduttasi, che rappresenta una delle tappe principali della biosintesi del colesterolo.

La dose di Pluronic[®] F127 necessaria per produrre l'effetto iperlipemizzante è normalmente di 0.5-1g/Kg.

Ulteriori studi devono essere condotti al fine di valutare le conseguenze di queste alterazioni metaboliche, che rimangono altamente controverse.

3.1.8.2 Alterazione della capacità di filtrazione renale

Numerosi studi [150, 153-155] hanno dimostrato che Pluronic[®] F127 iniettato per via intramuscolare è in grado di alterare la capacità di filtrazione renale; come il precedente, anche questo effetto è altamente controverso e costituisce argomento di discussione e di ricerca.

3.1.9 I polossameri ed il problema della multi resistenza a farmaci nei tumori

La chemioterapia costituisce ancora oggi il trattamento principale nell'ambito della cura dei tumori. Purtroppo, l'efficacia di tali trattamenti in molti tipi di tumore è seriamente limitata dal problema della resistenza ai farmaci [156, 157]. Come risultato, la risposta in seguito al trattamento antitumorale rimane molto scarsa per molti tumori maligni, inclusi le forme acute di leucemia, melanomi maligni, tumore al seno metastatico, tumore alla prostata e molti altri [156-158]. Il trattamento con farmaci antitumorali nella maggior parte dei casi non migliora la prognosi e ciò è principalmente dovuto al problema della resistenza acquisita [158, 159].

Una intensa attività di ricerca accademica e clinica ha lo scopo di comprendere e superare il problema della resistenza, per migliorare il risultato dei trattamenti chemioterapici, ma ha ottenuto fin'ora successi alquanto limitati.

Il principale problema nel trattamento della resistenza in ambito tumorale è rappresentato dal fatto che essa è la risultante del contributo di numerosi meccanismi che agiscono contemporaneamente.

Studi sperimentali hanno dimostrato che i polossameri sono in grado di sensibilizzare le cellule multi resistenti a farmaci (MDR), con conseguente aumento dell'attività citotossica di antracicline e di altri farmaci antitumorali di due o tre ordini di grandezza [92, 160]. Numerosi studi hanno dimostrato che i polossameri sono in grado di agire a diversi livelli nell'ambito dei meccanismi che la cellula esplica per difendersi dall'azione citotossica dei chemioterapici.

3.1.9.1 Meccanismi di resistenza agli agenti chemioterapici

I meccanismi messi in atto dalla cellula per resistere all'azione citotossica dei chemioterapici si distinguono in due categorie:

- 1) Meccanismi che riducono la concentrazione del farmaco prima della sua interazione con il *target* cellulare;
- 2) Meccanismi che diminuiscono l'effetto del farmaco alla cellula dopo la sua interazione con il *target*.

Al primo gruppo di meccanismi appartengono:

- Proteine per l'efflusso del farmaco: sono proteine che appartengono alla superfamiglia delle proteine ABC e sono in grado di eliminare tramite meccanismi di efflusso molti xenobiotici dalla cellula tumorale [161, 162]. Esempi sono costituiti dalla glicoproteina P (P-gp, Figura 10), dalla proteina associata alla multiresistenza a farmaci (MRP o MRP1), dal trasportatore anionico cMOAT a canale multi specifico (MRP2) e da molte altre proteine MRP ([163, 164].

La proteina P-gp possiede una elevata specificità per una varietà di molecole strutturalmente diverse: antracicline, epipodofillotossine, alcaloidi della vinca, paclitaxel ed altri composti [165].

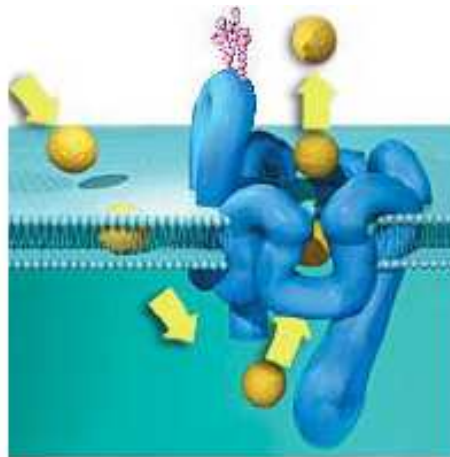


Figura 10. Rappresentazione schematica di come la P-gp espelle al di fuori della cellula farmaci e xenobiotici.

Le proteine MRP agiscono in concomitanza con il sistema di detossificazione del glutatione; pertanto l'azione delle MRP dipende dai livelli intracellulari di glutatione [166, 167].

- Sequestro del farmaco all'interno delle vescicole citoplasmatiche: numerosi studi hanno dimostrato che nelle cellule MDR esistono sistemi ATP dipendenti per il sequestro del farmaco all'interno delle vescicole citoplasmatiche e conseguente estrusione da parte della cellula. Questo fenomeno sembra associato a livelli di pH elevati all'interno delle cellule MDR e sembra interessare principalmente basi deboli (ad es. doxorubicina), che normalmente sono caricate positivamente a valori pH acidi [168, 169].
- Sistemi di detossificazione metabolica: tra i vari meccanismi di detossificazione cellulare, quello maggiormente studiato nell'ambito delle cellule MDR è il sistema GSH/GST. La coniugazione di molecole elettrofile con il glutatione ridotto produce specie che sono generalmente meno tossiche e più idrofile dei composti originali e che possono essere facilmente metabolizzate ed escrete. Nelle cellule resistenti ad agenti antineoplastici, sia il contenuto di GSH che l'attività di GST sono elevate, il che ha come risultato una protezione delle cellule da questi agenti chemioterapici [170].

Al secondo gruppo di meccanismi appartiene:

- Inibizione dell'apoptosi indotta dal farmaco: danni al DNA e apoptosi sono i principali meccanismi sfruttati dai farmaci chemioterapici. Il più noto meccanismo di resistenza legato a questa strategia è la riparazione al DNA da parte dell'O⁶-alchilguanina-DNA alchil transferasi [171, 172]. Accanto a questo, sono stati suggeriti altri meccanismi di chemoresistenza, come ad esempio l'overespressione di geni antiapoptotici (ad esempio Bcl-2) e la mutazione o la ridotta espressione di geni pro-apoptotici (p53) [173]. Nell'ambito di questi meccanismi, la P-gp sembra ricoprire un ruolo, in quanto studi hanno dimostrato che l'inibizione della P-gp da parte di agenti chemosensibilizzanti può ristabilire la normale cascata apoptotica nelle cellule con processi di trasmissione del segnale alterati [152].

3.1.9.2 Azione sensibilizzante dei Polossameri sulle cellule MDR

Studi condotti da Alakhov *et al.* hanno dimostrato che i polossameri sensibilizzano le linee cellulari tumorali resistenti, con conseguente aumento nella citotossicità del farmaco fino a 2-3 ordini di grandezza [92, 160]. In questi studi viene riportato l'effetto di Pluronic[®] P85 sull'azione citotossica della daunorubicina.

Gli effetti dei polossameri in tumori resistenti ai farmaci sono stati anche riportati in vivo [93, 174]; in questo caso il farmaco studiato è stato la doxorubicina e i diversi modelli tumorali esaminati hanno risposto in modo significativamente più elevato rispetto ai controlli rappresentati dal farmaco in assenza di polimero.

3.1.9.3 Influenza dei Polossameri sui meccanismi di resistenza delle cellule MDR

Il complesso meccanismo di azione dei polossameri sulle cellule MDR è stato dimostrato in particolare per Pluronic[®] P85. E' stato dimostrato che tale copolimero esplica diverse azioni (Fig. 11):

- 1) Si inserisce all'interno della membrana alterandone la micro viscosità ([95];
- 2) Induce una deplezione dei livelli di ATP nelle cellule tumorali;
- 3) Inibisce i trasportatori per l'efflusso di farmaci, come le P-gp [95, 175-178], MRP, BCRP, per effetto sulla viscosità di membrana e sulla deplezione di ATP, ma anche

inducendo variazioni conformazionali o modificando il sito di interazione specifico farmaco-trasportatore;

- 4) Si inserisce all'interno della membrana mitocondriale provocando una diminuzione della respirazione cellulare; inducono liberazione di citocromo C e aumento nei livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno del citoplasma [179];
- 5) Aumenta il segnale pro-apoptotico correlato ai mitocondri; per effetto del rilascio di citocromo C e ROS nel citoplasma diminuiscono il meccanismo di difesa antiapoptotico [180];
- 6) Inibisce il sistema di detossificazione glutatione/glutatione S-tranferasi [95, 181] tramite una deplezione di glutatione; ciò ha una conseguenza diretta sul segnale apoptotico, che viene attivato da bassi livelli di glutatione;
- 7) Abolisce il sequestro del farmaco all'interno di vescicole citoplasmatiche [160]. Questo effetto è stato osservato anche per Pluronic[®] L61. Si pensa che questo effetto sia la conseguenza della modifica del pH nel compartimento intracellulare, a causa dell'effetto ionoforico del copolimero e/o della deplezione energetica.
- 8) E' in grado di prevenire lo sviluppo di MDR [182];
- 9) Induce l'attivazione trascrizionale dell'espressione genica: Pluronic[®] P85 aumenta in modo significativo l'espressione del plasmide DNA nel muscolo scheletrico, nella milza, nei linfonodi e stimola la captazione del DNA plasmidico e l'espressione genica nelle cellule presentanti l'antigene nel modello animale topo [183].

Questi effetti sono risultati più evidenti ad una concentrazione di polimero al di sotto della CMC [94]; ciò ha portato a concludere che i polimeri in forma di unimeri sono responsabili delle risposte biologiche, probabilmente a causa della loro maggiore capacità di incorporarsi e traslocare all'interno delle membrana cellulare [95].

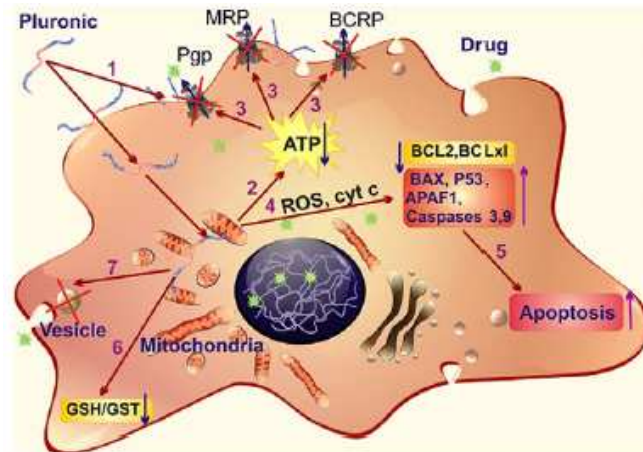


Figura 11. Effetti multipli di Pluronic® in cellule MDR: 1) incorporazione del polimero nelle membrane e diminuzione della viscosità delle membrane; 2) induzione della deplezione di ATP; 3) inibizione dei trasportatori per l'efflusso di farmaco; 4) rilascio di citocromo C dai mitocondri e aumento dei livelli di radicali liberi dell'ossigeno nel citoplasma; 5) aumento del segnale pro-apoptotico di difesa; 6) inibizione del meccanismo di detossificazione glutatione/glutazione S-transferasi; 7)abolizione del sequestro del farmaco all'interno di vescicole citoplasmatiche [51].

Le catene idrofobiche PPO dei polossameri si inseriscono all'interno delle zone idrofobiche della membrana cellulare, alterandone la struttura e diminuendone la microviscosità ("effetto fluidificante"). L'organizzazione dei polimeri in micelle ha come conseguenza il mascheramento delle porzioni PPO all'interno del core micellare e diminuiscono pertanto la loro capacità di interagire con le membrane cellulari.

3.1.9.4 Requisiti strutturali dei polossameri per l'ottenimento delle risposte biologiche

E' stato dimostrato che un delicato equilibrio tra la componente idrofilica (PEO) e quella lipofila (PPO) nella molecola dei polossameri è correlata con l'effetto di inibizione dei trasportatori ad efflusso nelle cellule MDR [181] (Fig.12).

I Pluronic® che si sono dimostrati più efficienti sono quelli con lunghezze intermedie dei blocchi PPO e relativamente idrofobici (HLB <20), quali il Pluronic® P85 o il Pluronic® L61. Copolimeri relativamente idrofilici, con estese porzioni PEO (HLB compreso tra 20 e 29), non sono in grado di inserirsi nel doppio strato lipidico e non vengono trasportati all'interno delle cellule. Di conseguenza, hanno un effetto molto limitato sia sull'attività ATP-asi delle

P-gp che sui livelli di ATP cellulari, il che spiega l'effetto limitato sulle pompe ad efflusso nelle cellule MDR. A tale gruppo appartengono i Pluronic[®] F68, F88, F108, F127. Block copolimeri altamente lipofili (HLB<19), con lunghe catene PPO, si ancorano alla membrana plasmatica e vi rimangono per un lungo periodo di tempo, oppure, se trasportati all'interno della cellula, si accumulano all'interno del compartimento endosomiale intracellulare. Quindi, sebbene siano potenzialmente potenti inibitori dell'ATP-asi delle pompe P-gp, essi non raggiungono il citoplasma, non causano deplezione dell'ATP e possiedono un piccolo effetto sul sistema di efflusso regolato dalle P-gp. Esempi di questi Pluronic[®] sono L35, L44, L121. Al contrario, i copolimeri che possiedono una lipofilia intermedia (P85, P81, L61), vengono trasportati attraverso la membrana, diffondono nel citoplasma e raggiungono i mitocondri e il nucleo cellulare. Inibiscono l'attività ATP-asi delle P-gp e diminuiscono i livelli intracellulari di ATP.

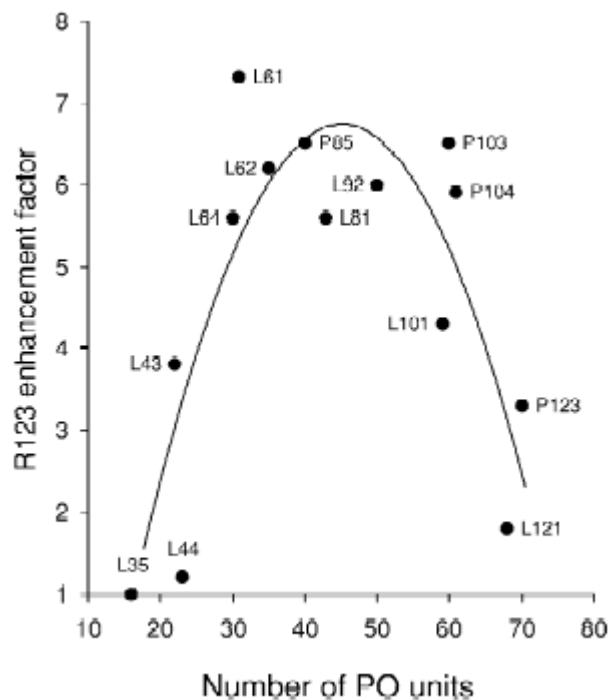


Figura 12. Influenza della composizione di block copolimeri Pluronic[®] in cellule MDR KBv. L'enhancement ratio della rodamina 123 (R123) è definito come il rapporto tra la rodamina 123 accumulata nelle cellule in presenza di Pluronic e la quantità di rodamina 123 accumulata a partire dalla soluzione controllo in tampone fosfato [94].

4. CELLULE CACO-2 COME MODELLO IN VITRO PER LO STUDIO DELL'ASSORBIMENTO INTESTINALE

L'epitelio intestinale contiene una popolazione eterogenea di cellule quali gli enterociti (cellule deputate all'assorbimento), cellule di Paneth, cellule M, cellule a ciuffo e cellule a coppa [184]. Gli enterociti sono senz'altro le cellule più abbondanti (80-90% del totale delle cellule epiteliali) e costituiscono il sistema di assorbimento dell'intestino tenue [185]. Nel 1974, Jorgen Fogh prese come modello la linea cellulare Caco-2 da un adenocarcinoma coloretale umano e in pochi anni esso divenne il modello cellulare di assorbimento in vitro accettato per lo *screening* della permeabilità di farmaci e della frazione di dose assorbita nell'uomo. Per composti somministrati per via orale, la permeabilità attraverso il monostrato di cellule Caco-2 mostra una buona correlazione con l'assorbimento in vivo nell'uomo [186]. Le cellule Caco-2 consentono di indagare i principali meccanismi di trasporto dei farmaci, quali il trasporto passivo transcellulare e paracellulare, l'assorbimento mediato da *carriers* e i meccanismi di efflusso. Questo modello di assorbimento in vitro è accessibile ed altamente riproducibile e viene utilizzato per lo *screening* di farmaci, sistemi di rilascio, eccipienti e per condurre valutazioni citotossicologiche [185], così come nell'ambito delle tossicità chimica e agroalimentare.

Per riprodurre meglio le condizioni esistenti all'interno dell'intestino in vivo, le cellule Caco-2 sono coltivate su supporti permeabili che consentono lo scambio di ioni e di nutrienti attraverso i due lati del monostrato cellulare, denominati lato apicale e basolaterale, al fine di assicurare un ambiente ricco di sostanze nutritive per il periodo di coltivazione (Fig. 13). Dal momento che queste condizioni consentono una buona differenziazione morfologica e funzionale, esse sono state proposte e ampiamente utilizzate come modello fisiologico del trasporto intestinale e degli studi di tossicità.

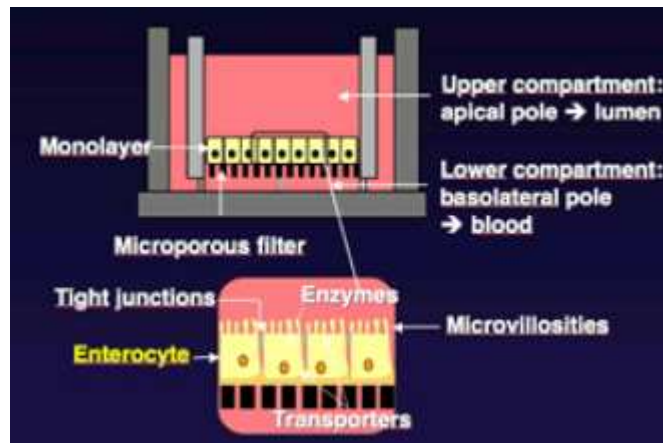


Figura 13. Monostrato cellulare Caco-2 coltivato su un filtro microporoso [187].

La valutazione dell'integrità epiteliale e della maturità del monostrato può essere ottenuta mediante la misura della resistenza elettrica transepiteliale (TEER), effettuata mediante un voltmetro equipaggiato con elettrodi posizionati nei compartimenti superiore ed inferiore. Un metodo alternativo per valutare l'integrità del monostrato è la misura della permeabilità a molecole marker di tipo idrofobico ed idrofilico, come il [³H]-mannitolo, [¹⁴C]-mannitolo, poli(etilen glicole), composti fluorescenti (fluoresceina, Lucifer yellow, inulina, destrano marcato con fluoresceina-isotiocianato (FITC) a vari pesi molecolari) e atenololo; queste molecole sono trasportate passivamente attraverso il monostrato per via transcellulare o paracellulare [185]. L'integrità del monostrato impedisce il passaggio delle molecole marker. La velocità di trasporto (dQ/dt) è calcolata rappresentando in grafico la quantità del farmaco testato che ha attraversato il monostrato in funzione del tempo di incubazione e quindi determinando la pendenza di tale profilo. Il coefficiente di permeabilità apparente (P_{app} , $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) è calcolato secondo l'equazione seguente (Eq.9):

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} * \frac{1}{C_0 * A} \quad \text{Equazione 9}$$

Dove dQ/dt è la velocità di trasporto (mg/s), C_0 è la concentrazione iniziale del farmaco nel compartimento donatore (mg/ml) e A è la superficie del filtro in cm^2 [186].

Sebbene il monostrato Caco-2 presenti tutti i vantaggi di predire l'assorbimento orale o la biodisponibilità orale e possieda la maggior parte delle caratteristiche morfologiche e biochimiche dell'epitelio intestinale, può essere rischioso utilizzare questo modello per predire la quantità di farmaco assorbito per via paracellulare o attraverso sistemi di trasporto mediati da *carriers*. Infatti, le cellule Caco-2 hanno mostrato una bassa espressione di molti trasportatori presenti in vivo nel tessuto intestinale [188]. Per quanto riguarda la via paracellulare, il modello Caco-2 mostra una più bassa permeabilità in confronto con l'intestino umano; ciò sembra essere dovuto ad un minor numero di *tight junctions* aperte nel modello in vitro e ad una minore superficie di assorbimento come conseguenza dell'assenza di villi assiali [189].

Altri fattori che riducono la permeabilità del modello cellulare Caco-2 rispetto all'epitelio intestinale in vivo includono l'assenza del controllo da parte del sistema nervoso centrale e l'assenza della circolazione sistemica, una minore velocità di *turnover* cellulare, l'assenza di muco e sali biliari e dei movimenti peristaltici [190].

Le cellule Caco-2 sono una popolazione cellulare eterogenea esposta a differenti tipi di selezione tra i vari laboratori. Ciò contribuisce ad un'ampia variabilità interlaboratorio nella valutazione della permeabilità mediante questi modelli, che possono essere dovuti a fattori biologici associati alle differenze nel tipo di studio condotto:

Tabella IV. Fattori che influenzano la variabilità interlaboratorio di farmaci attraverso le cellule Caco-2 (da Shah *et al.*, [185]).

<u>Fattori biologici</u>	<u>Tipo di studio</u>
• Fonte delle cellule	• Concentrazione del farmaco
• Vitalità cellulare	• Tipo di soluzione
• Condizioni di coltivazione	• Materiale del filtro
• Densità di cellule seminate	• Agitazione
• Giorni in coltura	• Composizione del tampone/volume/pH
• Fattori di attecchimento	• Uso di cosolventi/additivi
• Enzimi metabolizzanti	• Supporti permeabili
• Sistemi di trasporto	• Diametro dei pori del filtro

- Sistemi a efflusso
- Processi di tripsinizzazione
- Temperatura
- Raccolta dei campioni
- Metodi analitici

4.1 MECCANISMI DI TRASPORTO ATTRAVERSO GLI ENTEROCITI

L'epitelio dell'intestino tenue è un sistema altamente dinamico, costituito da popolazioni cellulari ben distinte (cellule proliferative e cellule di differenziazione, localizzate sulle cripte intestinali e cellule funzionali differenziate, localizzate a livello dei villi).

Gli enterociti differenziati, che rappresentano le principali cellule della barriera intestinale, sono altamente specializzate nell'assorbimento di vari tipi di sostanze (principali nutrienti, vitamine, acqua..), che sono essenziali per il loro sostentamento e per quello delle altre cellule dell'organismo.

I meccanismi dell'assorbimento possono essere divisi in due categorie principali a seconda del fatto che siano o meno energia-dipendenti (Fig.14).

I meccanismi non energia-dipendenti comprendono l'assorbimento per diffusione passiva, il trasporto paracellulare e la diffusione facilitata.

I meccanismi energia-dipendenti includono l'endocitosi, il passaggio indiretto attivo attraverso trasportatori sinporto o antiporto e i meccanismi di efflusso. Siccome la diffusione facilitata, il trasporto indiretto attivo e l'endocitosi recettore-mediata richiedono legami specifici ligando-recettore, si assume generalmente che questi meccanismi non interessino l'assorbimento di eccipienti polimerici, che non vengono riconosciuti in modo specifico.

4.1.1 Diffusione passiva

L'assorbimento transcellulare per diffusione passiva rappresenta la più efficiente via per l'assorbimento intestinale di farmaci, eccetto per i farmaci substrato delle pompe a efflusso. Christopher Lipinski ha formulato nel 1997 un insieme di regole ("le cinque regole di Lipinski") che descrivono le proprietà molecolari importanti per le caratteristiche farmacocinetiche di un farmaco, quali l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e

l'escrezione ("ADME") [191]. Queste regole sono basate sull'osservazione che la maggior parte dei farmaci è rappresentata da molecole lipofile di piccole dimensioni.

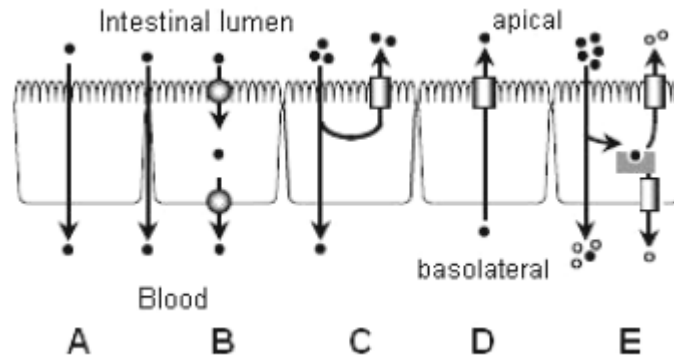


Figura 14. Figura schematica dell'epitelio intestinale come barriera selettiva per l'ingresso di sostanze nel circolo sistemico: **A:** diffusione passive trans- e paracellulare; **B:** assorbimento mediato da carriers nella porzione apicale e basolaterale della membrana; **C:** trasportatore attivo ad efflusso sulla membrana apicale, agente durante il processo di assorbimento; **D:** trasportatore ad efflusso attivo sulla membrana apicale, che offre un meccanismo aggiuntivo per l'eliminazione di sostanze dal circolo sanguigno; **E:** enzimi cellulari metabolizzanti localizzati all'interno degli enterociti, combinati con trasportatori ad efflusso attivo sulle membrane apicale e basolaterale adattata da Chan *et al.*, 2004.

Ovviamente, questo sistema non permette di prevedere se un composto sia o meno farmacologicamente attivo, ma tali regole rappresentano comunque un importante strumento per lo sviluppo di un farmaco, in quanto consentono l'ottimizzazione della struttura di un composto farmacologicamente attivo al fine di aumentarne l'attività e la selettività [192].

Le 5 regole di Lipinski affermano che in generale un farmaco assorbito a livello intestinale (cioè somministrabile per via orale) ha:

- Non più di 5 gruppi donatori di legami idrogeno (OH e NH);
- Non più di 10 gruppi accettori di legami idrogeno (N e O);
- Un peso molecolare inferiore ai 500 g/mol;
- Un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (log P) inferiore a 5.

Queste regole hanno subito numerose estensioni e modifiche, tra cui quella del 1999 da parte di Ghose *et al.* [193]:

- Il coefficiente di ripartizione log P deve trovarsi all'interno di un intervallo compreso tra -0.4 e 5.6;
- La rifrattività molare (volume occupato da un atomo o da un gruppo di atomi, grandezza dipendente dalla temperatura, dall'indice di rifrazione, dalla pressione) deve variare all'interno di un intervallo compreso tra 40 e 130;
- Il peso molecolare deve essere compreso tra 160 e 480;
- Il numero totale di atomi deve essere compreso tra 20 e 70.

Per quanto riguarda i farmaci contenuti in strutture polimeriche, la transitosi per diffusione passiva rappresenta la via principale nell'assorbimento intestinale, specialmente per composti altamente lipofili. Infatti, il farmaco contenuto nella struttura polimerica si trova in equilibrio con la fase esterna, che nel caso di fluidi gastrointestinali riguarda il contenuto del lume intestinale. La frazione di farmaco solubilizzata che si trova al di fuori della micella è in grado di diffondere passivamente attraverso gli enterociti grazie al gradiente di concentrazione chimica attraverso la membrana intestinale.

4.1.2 Via paracellulare

La via paracellulare riguarda il trasporto di farmaci (generalmente di natura idrofila) attraverso gli spazi intercellulari. Questo percorso è regolato dalle *tight junctions* (o *zonula occludens*). Esse costituiscono la principale barriera limitante la velocità di assorbimento nel trasporto paracellulare per la permeazione di ioni e molecole di grosse dimensioni [194]. Le *tight junctions* rivestono un ruolo di elevata importanza nella regolazione delle connessioni tra i citoscheletri delle cellule e nella trasduzione del segnale in una o più direzioni attraverso le membrane cellulari. Differenti tipi di proteine di segnale e meccanismi di trasduzione sono associati con queste giunzioni. Esse ricevono e convertono i segnali dall'interno della cellula, al fine di modulare l'espressione genica ed il comportamento cellulare [195]. Inoltre, le *tight junctions* impediscono la diffusione laterale di glicolipidi e proteine tra i domini apicale e basolaterale della membrana plasmatica.

Le *tight junctions* formano una struttura multipla compatta, costituita da complessi di multiproteine che sono unite agli anelli di actomiosina apicali sottostanti (Fig. 15).

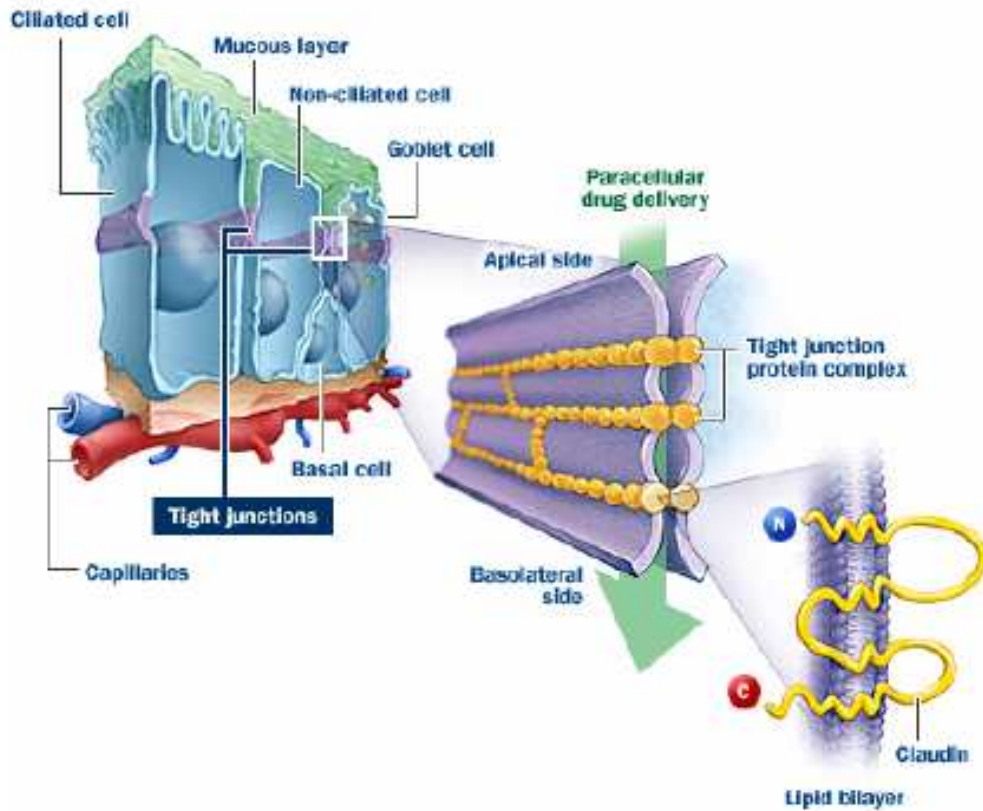


Figura 15. Visione complessiva della localizzazione delle *tight junctions* e del loro arrangiamento strutturale all'interno degli enterociti (da Nastech [196]).

Tra le proteine delle *tight junctions* identificate fin'ora vi sono: occludina e claudina, proteine della placca citoplasmatica, ZO-1, ZO-2, ZO-3, la cingolina, il 7H6.

Nel modello cellulare intestinale in vitro di tipo Caco-2, la resistenza elettrica transepiteliale (TEER), è una misura classica del flusso di carica attraverso la membrana, riflette la permeabilità del cammino paracellulare e il fatto che queste giunzioni siano più o meno serrate.

La dimensione dello spazio paracellulare è compresa tra i 10 e i 30-40 Å e ciò suggerisce che soluti con un raggio molecolare al di sopra dei 15 Å (3.5kD) sono esclusi da questa via [196].

Le *tight junctions* sono strutture comunque dinamiche, che possono essere aperte dalla condensazione dei microfilamenti nella zona dell'anello perigiunzionale di actomiosina, che

dilatano le *tight junctions* e aumentano l'assorbimento di nutrienti per trascinamento da parte del solvente, a causa di un flusso osmotico transgiunzionale che si viene a creare. Il poro della *tight junction* aperta ha una dimensione di 5 nm e permette il passaggio di piccole molecole quali inulina e polietilen glicole (4000-5000 Da) [197].

Gli unimeri di Pluronic[®] P85 potrebbero seguire il percorso paracellulare in quanto il loro peso molecolare è intorno a 4600 Da, mentre gli unimeri di Pluronic[®] F127 in teoria non dovrebbero seguire questo percorso, essendo il loro peso molecolare pari a circa 12600 Da.

4.1.3 Endocitosi

L'endocitosi è il processo di trasporto mediato da vescicole utilizzato dalle cellule per internalizzare macromolecole extracellulari, lipidi della membrana plasmatica e proteine. Durante l'endocitosi, la cellula internalizza porzioni di fluido extracellulare, incluso il materiale sospeso o dissolto in esso. Una porzione della membrana plasmatica è invaginata e forma vescicole chiamate endosomi. Vi sono differenti percorsi di endocitosi che utilizzano differenti meccanismi per internalizzare porzioni della membrana plasmatica; tuttavia, il meccanismo dell'endocitosi sfruttato dagli enterociti è limitato alla pinocitosi, in quanto gli enterociti non sono in grado di effettuare la fagocitosi, che è tipica di cellule specializzate quali ad esempio i macrofagi, i fibroblasti, i monociti e i neutrofilo [154, 194, 198].

Esistono quattro differenti meccanismi di pinocitosi: micropinocitosi, endocitosi mediata da clatrina, endocitosi mediata da caveole e endocitosi indipendente da clatrina e caveole (macropinocitosi), che sostanzialmente non avviene a livello degli enterociti in quanto consiste nell'invaginazione di grosse porzioni della membrana al fine di formare vescicole di grosse dimensioni (500-2000 nm) formate a livello di cellule che esplicano la fagocitosi [199-201].

La fagocitosi mediata da clatrina rappresenta il principale meccanismo di endocitosi. Esso dipende dalla concentrazione di recettori transmembrana ad elevata affinità e i loro ligandi contenuti in cavità rivestite di clatrina sulla membrana plasmatica. Queste cavità sono formate dall'assemblamento di proteine di rivestimento, principalmente clatrina, sulla superficie citosolica della membrana plasmatica.

Le proteine di assemblamento a loro volta interagiscono con proteine di adattamento, le quali specificano il sito di assemblamento della clatrina e selezionano il materiale da trasportare,

mediante l'interazione con segnali di internalizzazione localizzati sul lato citosolico della membrana.

Il tempo di esistenza delle cavità è molto breve: entro qualche minuto dalla loro formazione esse formano invaginazioni che evolvono in vescicole di endocitosi che vengono incapsulate dal rivestimento di clatrina e trasportano all'interno della cellula complessi recettore-ligando. Le macromolecole entrano nella cellula legate alla membrana che le circonda tramite il loro recettore (pinocitosi mediata dal recettore), o tramite interazioni non specifiche (pinocitosi di adsorbimento); esse possono anche entrare all'interno della vescicola liberamente disperse in soluzione (pinocitosi in fase fluida) [202]. Le vescicole rivestite di clatrina sono anch'esse transienti: entro pochi secondi dalla loro formazione, esse perdono il loro rivestimento e si fondono con gli endosomi [203].

Le caveole sono invaginazioni della membrana plasmatica che definiscono micro domini ricchi in colesterolo e sfingolipidi, in cui sono concentrati diverse molecole del segnale e trasportatori di membrana [204]. La forma e l'organizzazione strutturale delle caveole è determinata dalla caveolina, una proteina dimerica che lega il colesterolo, che si inserisce nella membrana plasmatica e si autoassocia a formare rivestimenti di caveolina sulla superficie delle invaginazioni. Le caveole sono strutture statiche, la cui internalizzazione può essere iniziata dal legame a recettori presenti al loro interno. Comunque, anche dopo l'attivazione, le caveole sono internalizzate lentamente ($t_{1/2} > 20$ min) e formano piccole vescicole (50-60 nm di diametro) che trasportano piccoli volumi di fasi fluide. Di conseguenza, questo processo non contribuisce significativamente all'uptake di fase fluida [199].

Come le caveole, esistono altri micro domini di (glico/sfingo lipidi altamente ordinati e colesterolo nella membrana plasmatica e sono generalmente indicati con il termine "zattere lipidiche" o *lipid rafts*): si tratta di piccole strutture, dal diametro di circa 40-50 nm, che diffondono liberamente sulla superficie cellulare [205]. Esse possono essere catturate da tutti i tipi di vescicole endofitiche. Per esempio, sia la tossina Shiga che le tossine del colera non aggregate, che si legano a glicolipidi associati ai *rafts* sono internalizzate da vescicole rivestite di clatrina [206]. Oltre a ciò, i *rafts* possono invaginarsi ed essere trasferiti a livello citoplasmatico secondo meccanismi indipendenti da processi di endocitosi regolati da clatrina e caveole, secondo meccanismo non del tutto chiariti [200].

Come già menzionato, nelle cellule eucariotiche esistono tre differenti modalità di endocitosi: endocitosi recettore mediata, endocitosi di adsorbimento non specifico e endocitosi a fase fluida. La prima implica che avvenga un riconoscimento specifico ligando-recettore al fine di internalizzare il complesso formato. Il processo saturabile dipendente da clatrina è implicato nell'internalizzazione di ormoni (insulina, ormone della crescita), proteine (transferrina, LDL), virus (adenovirus) e tossine (tossina difterica, tossina *Pseudomonas*) [207]. Questo sistema è altamente efficiente e ben regolato.

L'endocitosi di adsorbimento non specifico avviene in seguito a legami tra soluti o particelle a livello di siti non specifici sulla membrana plasmatica, tramite interazioni idrofobiche, interazioni carboidrato-proteina o interazioni ioniche [199].

L'endocitosi a fase fluida è un processo di internalizzazione non specifico che necessita di un legame alla membrana plasmatica. Di conseguenza, i fluidi extracellulari circondanti le cellule sono internalizzati con una bassa efficienza, ma con un profilo lineare all'interno di un ampio intervallo di concentrazione.

Dopo la captazione per endocitosi di proteine adsorbite o immerse nella fase fluida attraverso vescicole rivestite di clatrina e caveolina o non rivestite, tali vescicole si fondono per formare endosomi precoci (Fig. 16).

All'interno degli enterociti, vi sono differenti tipi di endosomi precoci apicali e basolaterali che differiscono per funzioni e composizioni. Gli endosomi precoci apicali e basolaterali non sono in grado di fondersi gli uni con gli altri, ma entrambi si fondono con endosomi tardivi [194]. Nell'endosoma precoce, alcune proteasi sono trasferite nel lume, il quale risulta avere un pH acido compreso tra 6.0 e 6.2; in questo microambiente alcuni ligandi sono rilasciati dai loro recettori. Proteine di membrana e lipidi possono essere liberati dagli endosomi precoci per ritornare verso la superficie cellulare, per essere degradate o per essere trasportate sul lato opposto della membrana (transitosi) [203].

Dopo la loro captazione, la maggior parte delle macromolecole è distrutta da enzimi presenti nei lisosomi o nelle vescicole endofitiche stesse. Alcune di esse sono in grado di sfuggire alla degradazione e sono rilasciate nello spazio interstiziale, dal quale vengono trasferite nel circolo sistemico dopo eventuale passaggio nei vasi linfatici [208].

Per quanto riguarda la degradazione di micelle di Pluronic[®] all'interno delle vescicole endolisosomiali, è stato dimostrato che esse possiedono una elevata stabilità in ambiente acido ma sono enzimaticamente degradate nel giro di pochi giorni. Nonostante ciò, si deve tenere in

considerazione anche l'eventuale uscita delle micelle dal compartimento endosomiale, a causa del loro carattere anfifilico.

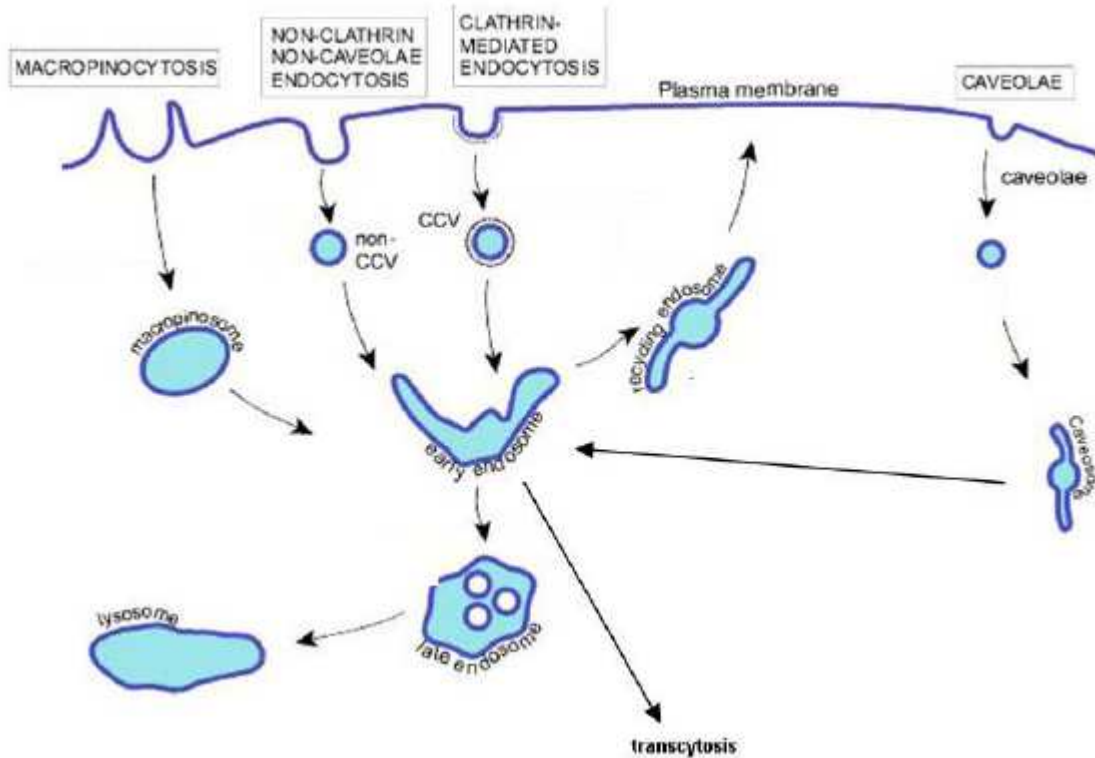


Figura 16. Riassunto delle principali vie di endocitosi utilizzate dalle macromolecole. Vescole rivestite di clatrina (CCVs) si trasformano in endosomi precoci. Essi possono ritornare verso la superficie cellulare o progredire verso la struttura endosoma-lisosoma. Altri possibili meccanismi sono quelli dei coats non rivestiti (non-CCV), la macropinocitosi di caveole (dipendente da caveolina). La transcytosis avviene a partire da endosomi precoci (adattata da Siczarski *et al.* [207]).

4.1.4 Meccanismi di efflusso

I geni del trasportatore ATP-binding cassette (ABC) appartengono ad una superfamiglia di geni che codificano per le proteine trasportatrici ABC [209].

Queste sono proteine transmembrana implicate nel trasporto di una varietà di substrati attraverso le membrane intra- ed extracellulari: prodotto metabolici, lipidi e steroli, farmaci. Le proteine sono classificate come trasportatori ABC in base alla sequenza e all'organizzazione dei loro domini ABC, anche noti come domini leganti i nucleotidi (NBFs). La famiglia ABC include la proteina associata all'MDR (MRP o MRP1), il trasportatore a

canale multi specifico per ioni organici (cMOAT, cMRP o MRP2) e trasportatori leganti l'ATP (ABC1 e ABC2) nella proteina di resistenza del tumore al seno (BCRO) ([210].

I trasportatori ABC sono implicati nella resistenza tumorale, nella fibrosi cistica, nella multi resistenza batterica e in molte altre patologie a carattere ereditario.

Il coinvolgimento dei trasportatori ABC nel problema della multi resistenza ai farmaci nel tumore è stato descritto nel paragrafo 2.6.9.3 dell'introduzione.

Oltre ai trasportatori ABC, una famiglia di *carriers* di soluti (SLC) è stata recentemente studiata nell'ambito dell'interferenza del segnale di assorbimento intestinale. In uno studio di Artrusson *et al.* [211], è stato valutata l'espressione intestinale di 9 tipi di trasportatori delle famiglie ABC (P-gp, BCRP, MRP2, MRP3) e SLC (PEPT1, MCT1, OATPB, OCTN2, OCTN1) lungo il tratto gastrointestinale (Fig. 17).

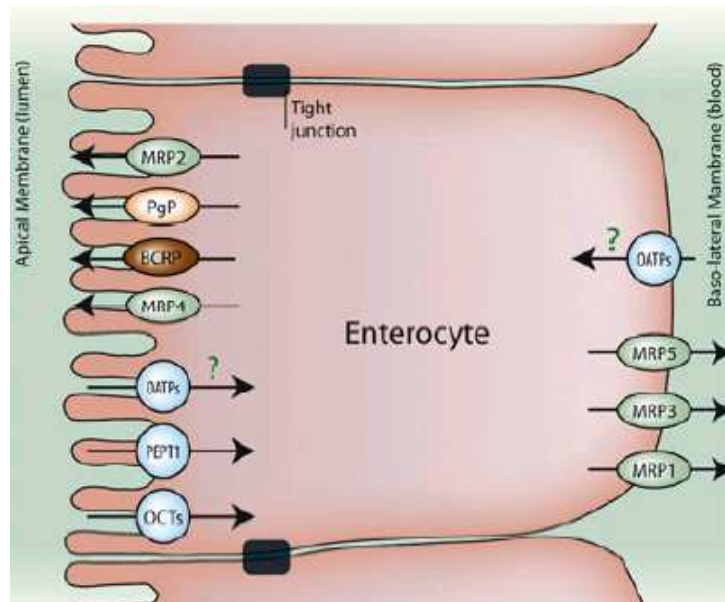


Figura 17. Localizzazione di vari ABC e SLC trasportatori ad efflusso nella membrana plasmatica di enterociti (da Solvo Biotechnology).

Otto dei nove trasportatori studiati hanno dimostrato differenze nella loro espressione a livello regionale. OATB è risultato essere il solo trasportatore che non mostra una espressione variabile a seconda delle ragioni del tratto intestinale umano. La P-gp ha dimostrato essere la proteina che mostra le maggiori differenze (fino a 5 volte) nell'espressione lungo l'intestino.

L'espressione dei trasportatori nei modelli cellulari Caco-2 ha dimostrato essere la più simile a quella dell'intestino tenue umano, sebbene il modello in vitro presenti una over-espressione di OATPB, BRC e MRP2 fino a 5 volte maggiore rispetto all'intestino umano.

I trasportatori ABC utilizzano l'energia di idrolisi dell'ATP per trasportare vari substrati attraverso le membrane cellulari: batteri, zuccheri, vitamine, ioni metallici. Nelle cellule degli eucarioti, i trasportatori ABC trasportano essenzialmente verso l'esterno della membrana plasmatica o all'interno di organelli legati alla membrana, come il reticolo endoplasmatico e i mitocondri. Le molecole trasportate includono:

- Lipidi e steroli (fosfatidilcolina, colesterolo, [212]);
- Ioni e piccole molecole (K^+ , sulfonilurea, [213]);
- Farmaci (indinavir [214], doxorubicina [215]);
- Polipeptidi di grandi dimensioni (trasportatori di antigeni [216]).

Non risulta chiaro esattamente come queste proteine possano traslocare una così ampia varietà di sostanze; tuttavia tramite l'utilizzo di modelli è stato stabilito che la P-gp lega farmaci in maniera indiscriminata da fasi lipidiche sulla base della loro idrofobicità. Quindi, farmaci substrato della P-gp sono spesso molecole di grosse dimensioni (peso molecolare >400 Da), di natura idrofobica o anfifilica, con un anello planare e catene laterali contenenti nitro gruppi. Essi sono in genere carichi positivamente a pH fisiologico, ma il fatto che la colchicina sia substrato della P-gp pur non avendo queste caratteristiche suggerisce che i substrati possono occupare siti di legame differenti [210].

Dal momento che i substrati delle P-gp sono molecole idrofobiche, l'accesso al sito di legame sulla proteina avviene a partire dal doppio strato lipidico, piuttosto che a partire dalla fase acquosa. Si pensa che questo sito di legame idrofobico per l'efflusso di farmaci si trovi in una regione inibita da alcuni tensioattivi di natura polimerica per mezzo di interazioni specifiche o mediante un ingombro sterico.

CAPITOLO II

Scopo della ricerca

CAPITOLO II

Scopo della ricerca

La maggior parte delle nuove molecole candidate allo sviluppo farmaceutico è tendenzialmente lipofila, caratteristica che si ripercuote su una bassa biodisponibilità legata alla bassa solubilità e/o alla bassa velocità di dissoluzione. Numerosi approcci possono essere considerati per migliorare la solubilità acquosa di un farmaco ed in particolare l'utilizzo di micelle polimeriche ha sollevato di recente un crescente interesse da parte dei formulatori.

I polossameri sono copolimeri anfifilici caratterizzati da una struttura triblock lineare: la porzione centrale di ciascun monomero è rappresentata da unità di propilen-ossido a carattere prevalentemente lipofilo, mentre le due porzioni laterali sono rappresentate da unità di etilen-ossido, a carattere idrofilo. Questi polimeri in soluzione acquosa e ad opportune concentrazioni sono in grado di formare micelle, costituite da un *core* lipofilo in grado di ospitare il farmaco e da uno *shell* prevalentemente idrofilo.

Lo scopo di questa ricerca è stato in primo luogo quello di includere farmaci modello appartenenti alle classi II e IV del sistema BCS all'interno delle micelle formate da due tipi di polossameri aventi differenti caratteristiche di lipofilia: Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 e di valutare gli effetti sulla solubilità delle molecole in solventi acquosi. Come farmaci modello sono stati scelti il dapsona (classe II), la clorotiazide (classe IV) e la digossina (classe II).

Le conseguenze della variazione di solubilità subita dal farmaco sul suo assorbimento è stata valutata *in vitro* mediante studi di trasporto attraverso il modello di membrana intestinale rappresentato dalle cellule Caco-2. Oltre ad essere un tensioattivo formante micelle, Pluronic[®] P85 si è dimostrato, in numerosi studi riportati in letteratura, in grado di inibire la pompa a efflusso P-gp localizzata sul lato apicale della membrana intestinale e coinvolta nel fenomeno della multiresistenza a farmaci oltre che responsabile della scarsa biodisponibilità di molti farmaci. L'effetto del blocco della pompa a efflusso da parte di Pluronic[®] P85 è stato valutato studiando il trasporto di una molecola substrato di tale pompa, la digossina, attraverso il monostrato cellulare Caco-2.

I farmaci modello utilizzati per questo studio sono molecole prevalentemente lipofile e/o dotate di scarsa permeabilità attraverso le membrane: l'effetto della variazione di solubilità derivante dalla loro inclusione in strutture micellari è stato valutato anche sull'assorbimento attraverso la membrana cutanea. In particolare, lo studio dell'assorbimento transdermico di dapsone (farmaco utilizzato per il trattamento di affezioni della pelle sia per via topica che per via orale) in presenza di polossameri può rivelarsi particolarmente interessante per lo sviluppo di una formulazione topica del farmaco che sfrutti le proprietà di termogelificazione reversibile posseduta in particolare da Pluronic® F127.

I gel di Pluronic® F127 hanno trovato varie applicazioni soprattutto nell'ambito della somministrazione mucosale di farmaci, a causa delle caratteristiche favorevoli dei gel in termini di resistenza e di proprietà reologiche e soprattutto per la proprietà di reversibilità gel-liquido dipendente dalla temperatura. In questa ricerca sono state valutate *in vitro* le proprietà di bioadesione di Pluronic® F127 e Pluronic® F68 alla vescica urinaria. Questo studio preliminare può fornire le basi per lo sviluppo di una formulazione mucoadesiva che potrebbe pertanto ampliare il campo di applicazione di questi polimeri.

CAPITOLO III

Parte sperimentale

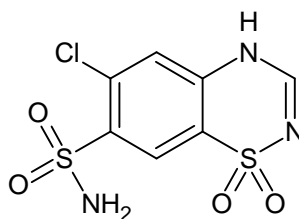
CAPITOLO III

Parte sperimentale

1. MATERIALI

- Acetonitrile per HPLC (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Milano, I)
- Acido Fosforico 85% (Sigma Aldrich, D)
- Carbopol 934 (Chiesi Farmaceutici s.p.a-Master Pharma s.r.l., Parma, I)
- Chitosano (Chito Clear[®], Primex, Siglufjordur, IS)
- Clorotiazide (Sigma Aldrich, Steinheim, D)
- Dapsone (Sigma Aldrich, Steinheim, D)
- Digossina (Fluka Bio Chemika, Sigma Aldrich, D)
- Dimetilsolfossido sterile (Sigma Aldrich, D)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (InVitrogen, B)
- Etilcellulosa(Lisapharma, Erba, I)
- Siero fetale bovino (InVitrogen, B)
- Glutammina (InVitrogen, B)
- Hanks' Balanced Salt Solution (InVitrogen, B)
- Metanolo per HPLC (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Milano, I)
- Aminoacidi non essenziali (InVitrogen, B)
- Phosphate Buffer Solution sterile (InVitrogen, B)
- Penicillina/Streptomicina 100U/ml (InVitrogen, B)
- Pluronic[®] F127 (BASF, Wyandotte, MI, USA)
- Pluronic[®] F68 (BASF, Wyandotte, MI, USA)
- Pluronic[®] P85 (BASF, Wyandotte, MI, USA)
- Potassio diidrogeno fosfato (KH₂PO₄, Fluka Chemika, Sigma Aldrich, Steinheim, D).
- Sodio Cloruro (NaCl, A.C.E.F., Fiorenzuola d'Arda, Pc, I)
- Sodio fosfato bi-basico dodecaidrato (Na₂HPO₄·12 H₂O, Carlo Erba, Milano, I)
- Tripsina (InVitrogen, B)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, D)

CLOROTIAZIDE (Sigma Aldrich, Steinheim, D)



$C_7H_6ClN_3O_4S_2$

6-chloro-1,1-dioxo-4H-benzo[e][1,2,4]thiadiazine-7-sulfonamide

Peso molecolare: 295.7 (g/mol)

Log P (previsto): 0.41

Log P (sperimentale): -0.5

Solubilità in acqua (prevista): 0.398 mg/ml

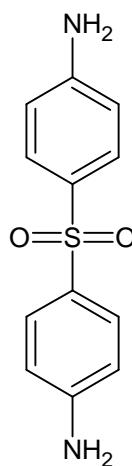
Solubilità in acqua (sperimentale): 266 μ g/ml

pKa: 6.85

Classe BCS: IV

Indicazione terapeutica: diuretico tiazidico inibitore del riassorbimento di Na^+/Cl^- dal tubulo distale. E' indicato nella terapia adiuvante dell'edema associato a insufficienza cardiaca, nel trattamento dell'ipertensione sia come tale che in associazione con altri antiipertensivi.

DAPSONE (Sigma Aldrich, D)



$C_{12}H_{12}N_2O_2S$

4-(4-aminophenyl)sulfonylaniline

Peso molecolare: 248.3 g/mol

Log P (previsto): 1.19

Log P (sperimentale): 0.4

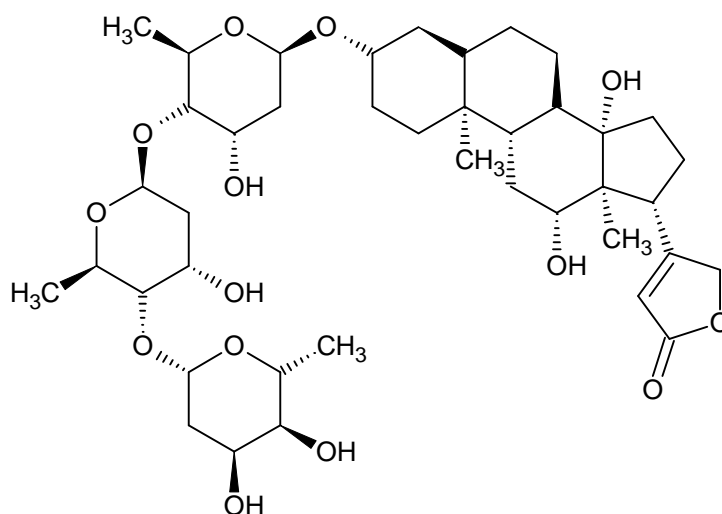
Solubilità in acqua (prevista): 0.284 mg/ml

Solubilità in acqua (sperimentale): 380 μ g/ml

pKa: 2.41

Classe BCS: II

Indicazione terapeutica: antibiotico antibatterico con proprietà antiinfiammatorie immunosoppressive, utilizzato come leprostatico e nel trattamento di dermatiti da herpes. Recentemente approvato negli USA per il trattamento topico dell'*acne vulgaris* (gel 5%).

DIGOSSINA (Fluka Bio Chemika, Sigma Aldrich, D)

$C_{41}H_{64}O_{14}$

4-[(3S,5R,8R,9S,10S,12R,13S,14S)-3-[(2R,4S,5S,6R)-5-[(2S,4S,5S,6R)-5-[(2S,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-12,14-dihydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16,17-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5H-furan-2-one.

Peso molecolare: 780.9 g/mol

Log P (previsto): 1.04

Log P (sperimentale): 2.2

Solubilità in acqua (prevista): 0.127 mg/ml

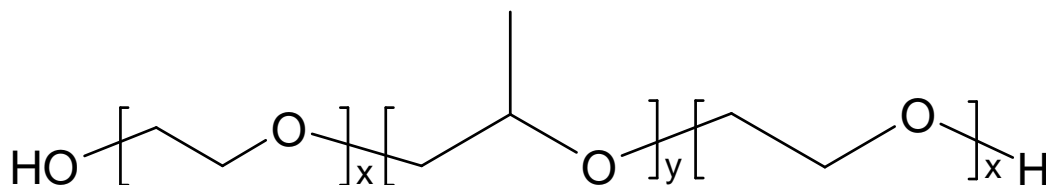
Solubilità in acqua (sperimentale): insolubile

Classe BCS: II

Indicazione terapeutica: glicoside digitalico utilizzato nel trattamento dell'insufficienza cardiaca congestizia e delle aritmie sopraventricolari dovute a meccanismi di rientro e nel trattamento della fibrillazione atriale cronica.

E' un inibitore della pompa Na^+/K^+ ATP-asi.

PLURONIC® BLOCK COPOLIMERI (BASF, Wyandotte, MI, USA)



Copolimero	PM ^a	Numero medio di unità EO (x) ^b	Numero medio di unità PO (y) ^b	HLB ^a	Cloud point sol. acq. 1% (°C) ^a	CMC (M) ^c
F127	12600	200.45	65.17	22	>100	2.8 x 10 ⁻⁶
F68	8400	152.73	28.97	29	>100	4.8 x 10 ⁻⁴
P85	4600	52.27	39.66	16	85	6.5 x 10 ⁻⁵

^a Fornito dal produttore

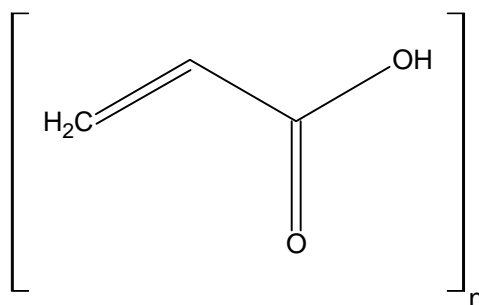
^b Calcolato in base al peso molecolare medio

^c [56]

Aspetto: scaglie bianche.

Impiego: tensioattivi, antischiumogeni, solubilizzanti.

CARBOPOL® 934 (Chiesi Farmaceutici s.p.a-Master Pharma s.r.l., Parma, Italia)



Polimero dell'acido acrilico *cross-linked* con allil sucrosio e polimerizzato in benzene.

Peso molecolare del monomero: 72.1 g/mol

Peso molecolare del polimero: circa 3000 kD.

Log P: 0.2

Aspetto: polvere bianca fine

Peso specifico: 1.41 kg/l a 20° C.

pH: (soluzione acquosa 0.1%): 6.0-7.5.

Proprietà chimico-fisiche: polimero idrofilo non solubile in acqua, che rigonfia dopo dispersione in acqua e forma una mucillagine colloidale. La natura tridimensionale è responsabile di numerose proprietà quali l'inserzia fisica, non riscontrata nei polimeri simili a catena lineare.

Temperatura di transizione vetrosa: 105° C.

Applicazioni farmaceutiche:

Utilizzato nel rilascio controllato in compresse; utilizzato per le proprietà di bioadesione in applicazioni buccali, oftalmiche, intestinali, nasali, vaginali, rettali. Dopo essere stato neutralizzato con una base può addensare acqua e solventi organici: è utilizzato quindi come eccipiente addensante a basse concentrazioni, come viscosizzante e per migliorare le proprietà di flusso di preparazioni topiche, lozioni, creme, gels, sospensioni orali;

Eccipienti stabilizzante le sospensioni di ingredienti insolubili in preparazioni orali e topiche;

Agente emulsionante in emulsioni olio-in-acqua, attivo anche ad elevate temperature.

ETILCELLULOSA (Lisapharma, Erba, Italia)

Etiletere cellulosa.

Formula chimica: il polimero contiene unità di anidroglucosio sostituiti con la seguente formula generale: $C_6H_7O_2(OR_1)(OR_2)$ in cui:

R_1 : -H

R_2 : $-CH_2CH_3$

Contenuto non inferiore al 44% e non superiore al 50% di gruppi etossilici ($-OC_2H_5$) sulla sostanza secca (equivalente a non più di 2.6 gruppi etossili per unità di anidro glucosio).

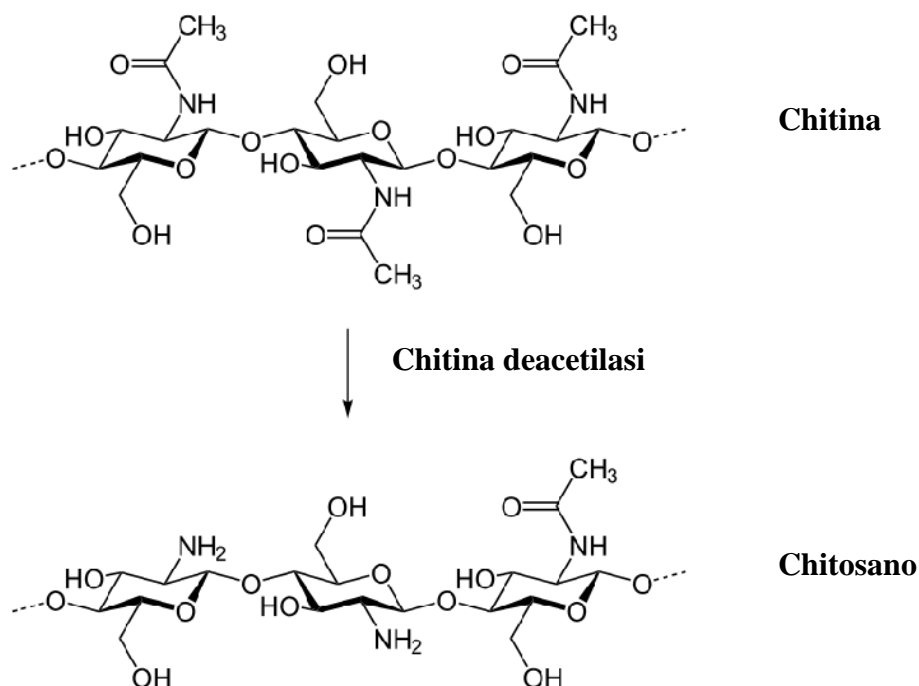
Origine: l'etilcellulosa è ottenuta dalla cellulosa, il principale polisaccaride e costituente del legno e di tutte le strutture vegetali. Il prodotto commerciale è ottenuto dal legno e poi etilato parzialmente per via chimica.

Descrizione: polvere poco igroscopica, di colore da bianco a biancastro, inodore ed insapore.

Solubilità: Praticamente insolubile in acqua, in glicerolo e in propano-1,2- diolo ma solubile in proporzioni variabili in taluni solventi organici a seconda del contenuto etossilico. L'etilcellulosa contenente meno del 46-48% di gruppi etossilici è facilmente solubile in tetraidrofurano, in acetato di metile, in cloroformio ed in miscele di idrocarburi aromatici ed etanolo. L'etilcellulosa contenente 46-48% o più di gruppi etossilici è liberamente solubile in etanolo, in metanolo, in toluene, in cloroformio e in acetato di etile.

Funzione e caratteristiche: principalmente utilizzato come agente addensante, ma anche come stucco da legno, fibra alimentare, agente anti-aggregante ed emulsionante (non autorizzato in Europa per questa applicazione).

Applicazioni farmaceutiche: utilizzato come rivestimento di forme solide di dosaggio a rilascio controllato, come colloide di protezione e come addensante/legante nelle matrici idrofobe. Questa sostanza è inoltre destinata all'uso quale stabilizzatore di emulsione nei sistemi misti acqua/olio e come strato barriera per controllare la diffusione degli ingredienti.

CHITOSANO (Chito Clear[®], Primex, Siglufjordur, Islanda)

La chitina è presente in natura come componente dello scheletro di insetti e crostacei, e come componente delle pareti cellulari di batteri e funghi. Chimicamente è un polisaccaride naturale, costituito da un omopolimero di N-acetilglucosammina, con un peso molecolare che può arrivare a 10 milioni; è insolubile in acqua a causa della struttura cellulare rigida e delle forze intramolecolari dei legami a idrogeno.

Il chitosano è un polimero della D-glucosammina, che si può ottenere anche per deacetilazione alcalina della chitina stessa. Il processo industriale attualmente utilizzato è quello di partire dalla chitina purificata ottenuta da crostacei. Il chitosano è facilmente e velocemente solubilizzato da una soluzione acida per effetto della salificazione dei gruppi aminofunzionali.

Grado di deacetilazione: 92%

Viscosità: 715 cPs

pKa e solubilità: gli amino gruppi del chitosano hanno un pKa di circa 6.5. A pH fisiologico il polimero è carico positivamente e solubile in soluzioni neutre e acide con una densità di carica dipendente dal pH e dal grado di de acetilazione.

Proprietà e usi farmaceutici: polimero biadesivo in grado di legarsi a superfici cariche negativamente quali le membrane mucosali.

Il chitosano aumenta il trasporto di farmaci polari attraverso le membrane epiteliali, è biocompatibile e biodegradabile; il polimero come tale ed i suoi derivati (trimetilchitosano) sono utilizzati per il gene delivery.

Applicazioni biomediche: agente emostatico dotato di proprietà antibatteriche naturali.

Applicazioni industriali: in agricoltura, utilizzato come fertilizzante e come protettore dalle infezioni fungine.

Utilizzato nei processi di filtrazione e purificazione delle acque.

2. METODI

2.1 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI POLOSSAMERI

Le soluzioni di Polossameri sono state preparate con il metodo “a freddo” (*cold method*, [40]). I polimeri sono stati solubilizzati in solventi acquosi alla temperatura di 4° C, in bagno di ghiaccio, sotto agitazione magnetica. La dissoluzione dei polimeri è stata completata conservando le soluzioni in frigorifero per almeno una notte.

Le concentrazioni delle soluzioni, i solventi utilizzati per preparare le soluzioni e gli esperimenti in cui tali soluzioni sono state utilizzate, sono indicati in Tabella V.

Tabella V. Concentrazione delle soluzioni di Pluronic® utilizzate nella presente ricerca, solventi ed loro utilizzo.

PLURONIC®	CONCENTRAZIONE % (p/p)	SOLVENTE	ESPERIMENTO
F 127	5	H ₂ O	DLS in assenza di farmaci
	10	H ₂ O	DLS in assenza ed in presenza di farmaci, permeazione transdermica
	15	H ₂ O	DLS in assenza di farmaci
	5	Soluzione fisiologica	DLS in assenza di farmaci
	10	Soluzione fisiologica	DLS in assenza di farmaci
	15	Soluzione fisiologica	DLS in assenza di farmaci
	5	HBSS ¹	DLS in assenza di farmaci
	10	HBSS	DLS in assenza ed in presenza di farmaci, trasporto attraverso le cellule Caco-2
	15	HBSS	DLS in assenza di farmaci
P 85	5	H ₂ O	DLS in assenza di farmaci
	10	H ₂ O	DLS in assenza ed in presenza di farmaci, permeazione transdermica
	5	Soluzione fisiologica	DLS in assenza di farmaci
	10	Soluzione fisiologica	DLS in assenza di farmaci
	5	HBSS	DLS in assenza di farmaci
	10	HBSS	DLS in assenza ed in presenza di farmaci, trasporto attraverso le cellule Caco-2
	15	HBSS	DLS in assenza di farmaci
	20	HBSS	DLS in assenza di farmaci

¹ HBSS: la soluzione HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) è un tampone comunemente usato per le colture cellulari, in alternativa al PBS.

2.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI SATURE DI FARMACI IN SOLUZIONI DI POLOSSAMERI

Le soluzioni sature dei farmaci dapsona, clorotiazide e digossina sono state preparate pesando quantità di farmaci in eccesso rispetto alla solubilità nella rispettiva soluzione di pollossamero e lasciando la sospensione in agitazione magnetica per almeno 24 ore.

Per la preparazione delle soluzioni donatrici da utilizzarsi negli esperimenti di trasporto attraverso le cellule Caco-2, le sospensioni sono state filtrate mediante filtri costituiti da una membrana porosa di nylon (diametro dei pori: 0.45 μm , diametro filtro: 25 mm, Whatman, Maidstone, UK).

Per la preparazione delle soluzioni sature utilizzate per la valutazione della solubilità dei farmaci e per le analisi DLS, le sospensioni sono state centrifugate a 11000 rpm per 15 minuti. I surnatanti sono stati prelevati ed equilibrati a 37°C per 24 ore ed in seguito diluiti prima dell'analisi della concentrazione, effettuata mediante cromatografia HPLC. Le diluizioni delle soluzioni sature di ciascun farmaco ed i solventi utilizzati per la diluizione sono mostrati in Tabella VI.

Tabella VI. Diluizioni effettuate e solventi utilizzati per la diluizione delle soluzioni sature dei farmaci dapsona, clorotiazide e digossina.

MOLECOLA	DILUIZIONE	SOLVENTE
DAPSONE	1:100	25% Metanolo-75% tampone fosfato 0.034 M pH 5.9
CLOROTIAZIDE	1:100	17% acetonitrile-83% soluzione acquosa di acido fosforico 0.5%
DIGOSSINA	1:10	Metanolo 40%

2.3 ANALISI DELLE DIMENSIONI DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI IN PRESENZA ED IN ASSENZA DI FARMACI MEDIANTE TECNICA DLS (Dynamic Light Scattering).

Le soluzioni micellari di polossameri sottoposte ad analisi dimensionale¹ mediante tecnica DLS sono state preparate nel modo seguente. In una cuvetta del volume di 4 ml sono stati posti 50 µl di soluzione di polossamero e 3.5 ml di acqua ultrapura (Milli-Q[®], Millipore, Billerica, MA, USA) filtrata con filtri sterilizzanti del diametro di 0.2 micron (Acrodisc[®] Syringe Filter, Tuffryn Membrane, PALL Corporation, New York, USA). L'analisi DLS è stata effettuata mediante la tecnica *Phase Analysis Light Scattering* (PALS) utilizzando uno ZetaSizer[®] Nano ZS (Malvern Instruments, UK). La lunghezza d'onda del raggio luminoso incidente è pari a 633 nm. Per l'interpretazione della funzione di autocorrelazione è stato applicato il metodo dei cumulanti. La distribuzione dimensionale ottenuta è rappresentata da un grafico dell'intensità relativa della luce deviata (“*scattered*”) dalle particelle in varie classi dimensionali ed è nota come distribuzione dimensionale in intensità.

Le soluzioni di polossameri contenenti farmaci in concentrazione pari alla loro solubilità (soluzioni sature, vedi paragrafo 2.3), sono state diluite nello stesso modo e sottoposte all'analisi DLS nelle stesse condizioni descritte per le soluzioni di polimeri non contenenti farmaci.

Due grafici tipici di distribuzione dimensionale ottenuti in intensità sono mostrati nelle Figure 18 e 19.

¹ Il diametro misurato con la tecnica *Dynamic Light Scattering* è il diametro idrodinamico e si riferisce alle proprietà di diffusione di una molecola all'interno di un fluido. Il diametro ottenuto con questa tecnica è quello di una sfera che ha lo stesso coefficiente di diffusione traslazionale della particella. Esso non dipende solamente dalle dimensioni del core della particella, ma anche dalle sue caratteristiche di superficie, così come dalla concentrazione e dal tipo di ioni presenti nel mezzo. Ciò significa che la dimensione ottenuta con questa tecnica può essere più elevata di quella misurata ad esempio mediante microscopia elettronica, in cui la particella è rimossa dal suo ambiente nativo.



Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: Dapsone F127 10% eau 2

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: 102408.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 2	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,59	Viscosity (cP): 0,6864
Material Absorbtion: 0,01	Measurement Date and Time: vendredi 24 octobre 2008 ...

System

Temperature (°C): 37,0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 369,6	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 9

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 25,89	Peak 1: 26,88	100,0	6,056
Pdl: 0,105	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,957	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good

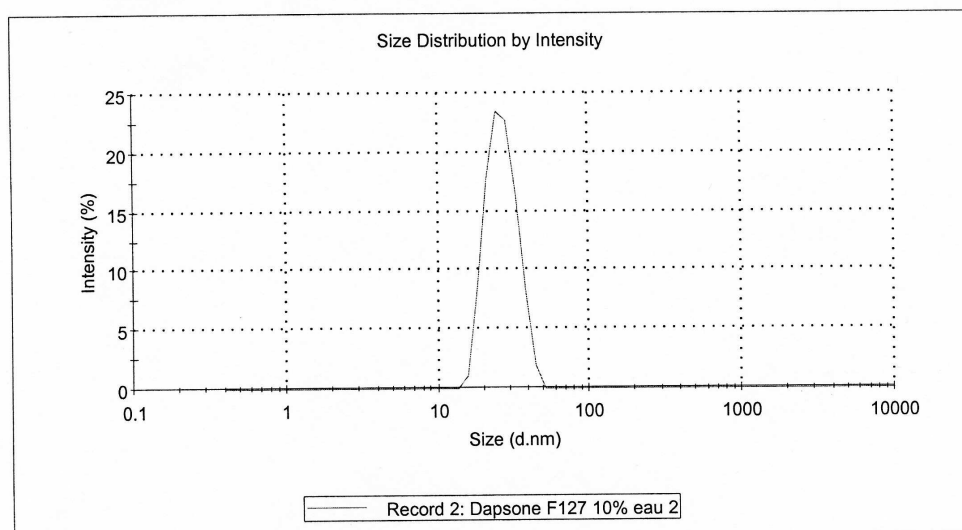


Figura 18. Grafico di distribuzione dimensionale di una popolazione monodispersa effettuata su una soluzione micellare di Pluronic® F127 al 10% (p/p) in acqua contenente il farmaco dapsone. Risposta ottenuta in intensità.



Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: Dapsone P85 HBSS 2

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: 103008.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 11

Dispersant RI: 1,330

Material RI: 1,59

Viscosity (cP): 0,6864

Material Absorbtion: 0,01

Measurement Date and Time: jeudi 30 octobre 2008 17:5...

System

Temperature (°C): 37,0

Duration Used (s): 60

Count Rate (kcps): 881,7

Measurement Position (mm): 4,65

Cell Description: Disposable sizing cuvette

Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 21,74	Peak 1: 28,19	88,9	7,613
Pdl: 0,299	Peak 2: 6,371	11,1	1,061
Intercept: 0,816	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good

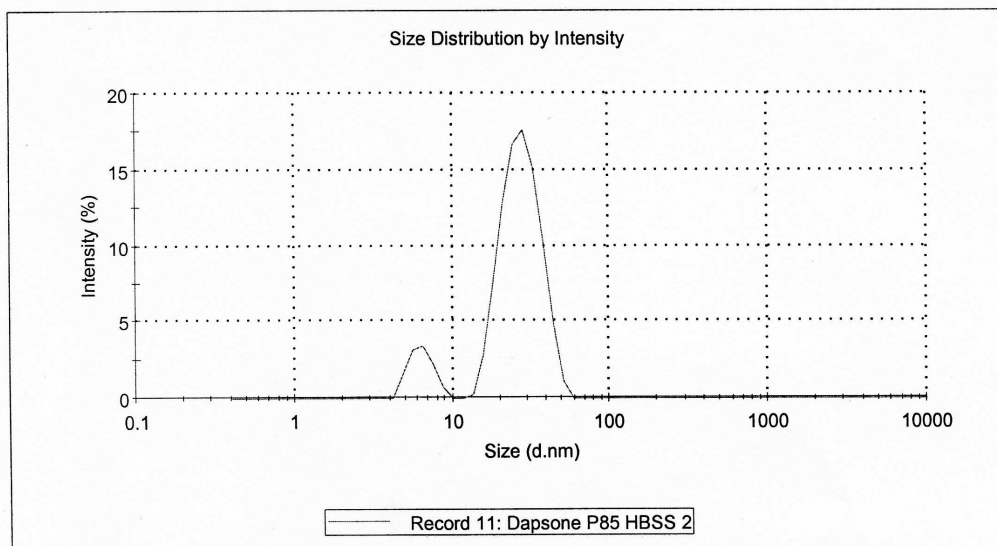


Figura 19. Grafico di distribuzione dimensionale di una popolazione effettuata su una soluzione micellare di Pluronic® P85 al 10% (p/p) in HBSS contenente il farmaco dapsone. Risposta ottenuta in intensità.

2.4 SOLUBILIZZAZIONE DI FARMACI DI CLASSE II E DI CLASSE IV IN MICELLE DI POLOSSAMERI

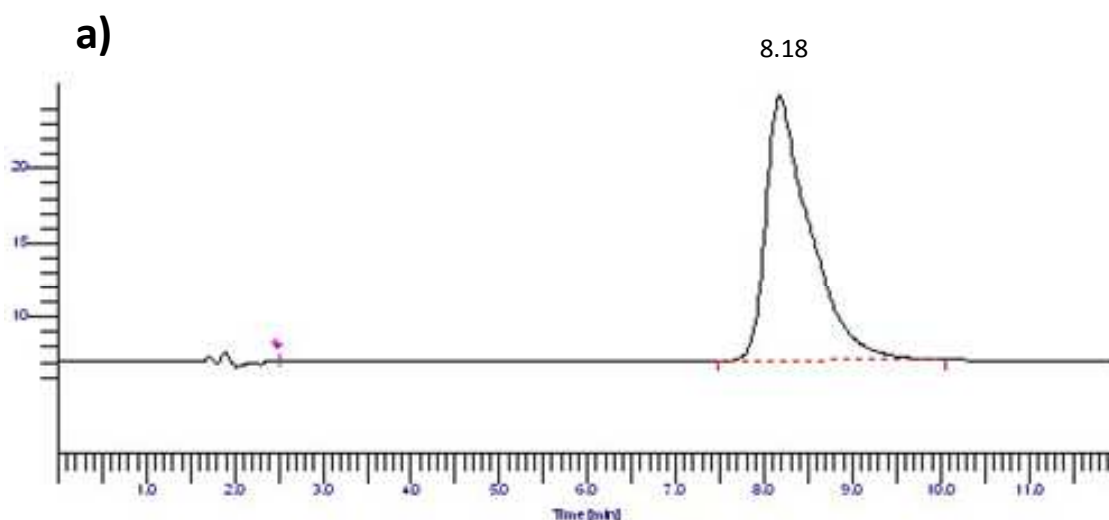
La solubilità dei farmaci dapsona, clorotiazide e digossina è stata valutata mediante preparazione delle soluzioni sature dei farmaci in diversi solventi di natura acquosa, come indicato nel paragrafo 2.2.

2.4.1 Analisi cromatografica

L'analisi della concentrazione delle soluzioni di dapsona e digossina è stata effettuata mediante HPLC utilizzando una pompa isocratica (Series 200 pump, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) equipaggiata con rivelatore UV-Visibile (UV/VIS Spectrophotometric detector LC 290, Perkin Elmer), interfaccia (Perkin Elmer, 900 Series Interface) e software (Perkin Elmer, Turbochrom Workstation). I campioni sono stati iniettati per mezzo di un autocampionatore Prostar 410 Varian (Varian, USA). Per l'analisi della clorotiazide è stata utilizzata una pompa isocratica (model 305, Gilson, Middletown, WI, USA) collegata ad un rivelatore UV-Vis (SPD-20°, Shimadzu, Kyoto, J), interfaccia (Perkin Elmer, 900 Series Interface) e software (Perkin Elmer, Turbochrom Workstation). I campioni sono stati iniettati per mezzo di un autocampionatore (model 231, Gilson).

I metodi di analisi HPLC di ciascuna molecola sono riassunti in tTbella VIII.

I cromatogrammi delle soluzioni standard dei tre farmaci sono riportati in Figura 20.



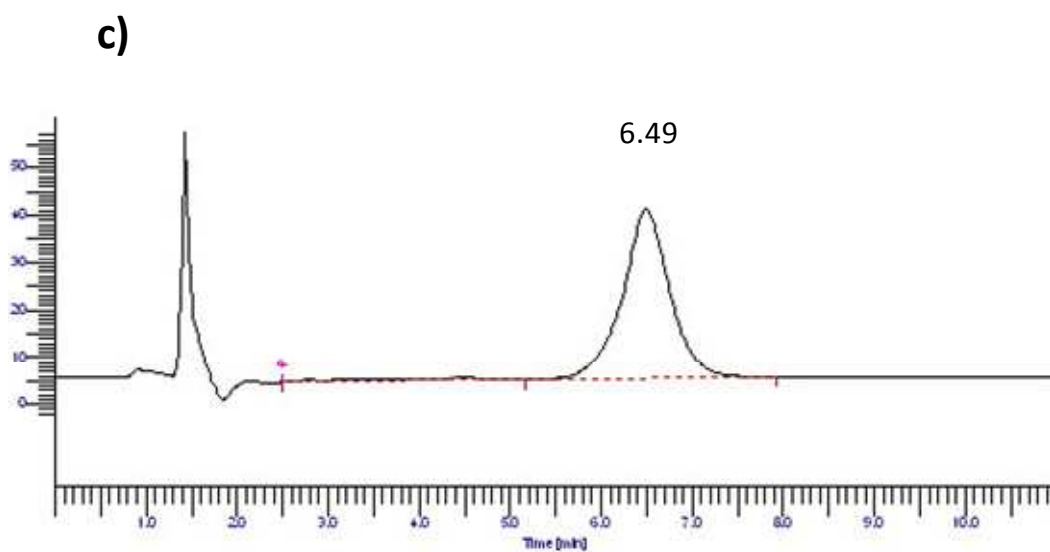
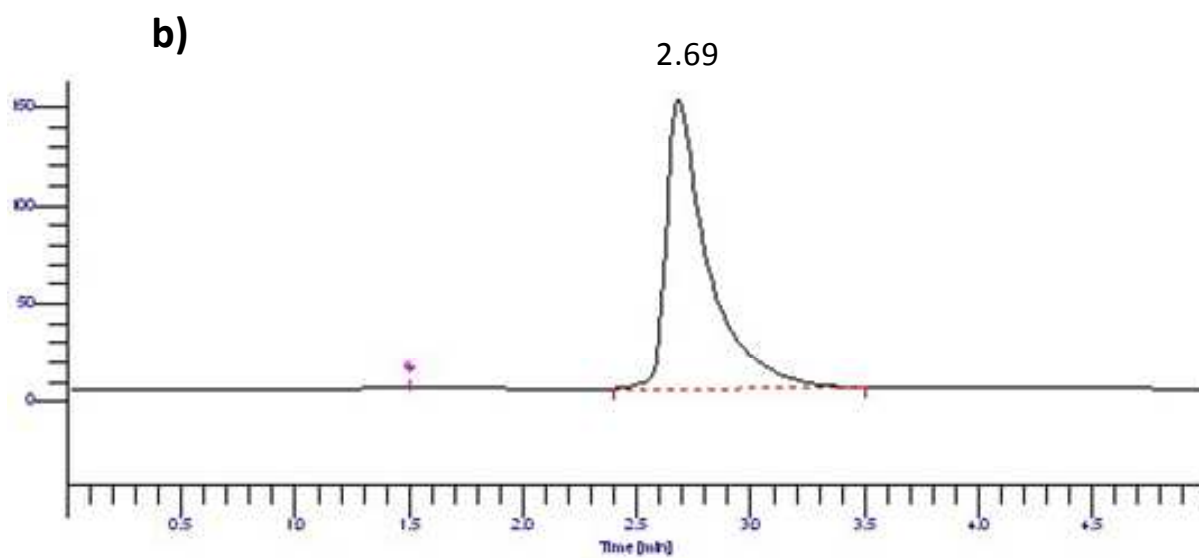


Figura 20. Cromatogrammi ottenuti dall'analisi HPLC di soluzioni standard dei farmaci dapsona (a), clorotiazide (b) e digossina (c).

Tabella VII. Metodi di analisi HPLC delle soluzioni dei farmaci dapsone, clorotiazide e digossina.

ANALISI HPLC	DAPSONE	CLOROTIAZIDE	DIGOSSINA
COMPOSIZIONE DELLA FASE MOBILE	22.5% metanolo 77.5% tampone fosfato 0.034 M pH 5.9	17% acetonitrile 83% acido fosforico 0.5% in acqua	28% aceto nitrile 72% acqua
LUNGHEZZA D'ONDA (nm)	295	229	218
CONCENTRAZIONE DELLA SOLUZIONE STANDARD (µg/ml)	3.02	28.6	17.5
SOLVENTE DELLA SOLUZIONE STANDARD	Fase mobile	Fase mobile	Metanolo 40%
VOLUME DI INIEZIONE (µL)	50	30	100
COLONNA	Capcell Pak C18 5µm, 4.6 mm (I.D.) x 150 mm, Shiseido Fine Chemicals	XTerra™ RP18 3.5 µm, 4.6 mm (I.D.)x100 mm, Waters	µBondapak™ C18; 3.9 x 150 mm, Waters
FLUSSO DI ANALISI (ml/min)	1	0.6	1.1
TEMPERATURA DI ANALISI (°C)	Temperatura ambiente	50	50
TEMPO DI RITENZIONE (minuti)	8.2	2.7	6.5
LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (µg/ml)	0.005	0.013	1.5

2.5 ESPERIMENTI DI TRASPORTO DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2

2.5.1 Coltura cellulare

Le cellule Caco-2 sono state ottenute dall' American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) e sono state utilizzate tra il passaggio 39 ed il passaggio 40. Le colture cellulari erano esenti da micoplasmi (kit di detezione dei micoplasmi; Roche, GmbH, Mannheim, D). Le cellule sono state mantenute in coltura in flaconi di plastica di 162 cm² (Corning Incorporated, NY, USA) dotati di tappi porosi (0.2 µm) che consentono gli scambi gassosi in un'atmosfera di 5% CO₂ e 90% di umidità relativa a 37° C. Le cellule sono state subcoltivate fino al raggiungimento del 90% di confluenza mediante utilizzo di tripsina 0.25% e 0.2% EDTA (5-15 minuti) a 37°C e trasferite in nuovi flaconi. Il mezzo di coltura era costituito da Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) a cui sono stati aggiunti aminoacidi non essenziali (NEAA) all'1%, L-glutamina 2mM e siero fetale bovino (FBS) al 10%. Tutti questi componenti sono stati ottenuti da InVitrogen (Merelbeke, B).

2.5.2 Misura della resistenza elettrica transepiteliale

La misura della resistenza elettrica transepiteliale (TEER) è stata effettuata al fine di valutare l'integrità del monostrato cellulare.

La resistenza transepiteliale è stata misurata a 37°C utilizzando un voltohm metro Evom (World Precision Instruments, Berlino, D). Solamente i monostrati cellulari aventi valori di TEER \geq di 300 Ω -cm² sono stati utilizzati per gli esperimenti.

2.5.3 Esperimenti di trasporto

I monostrati di cellule Caco-2 sono stati coltivati su inserti semipermeabili di policarbonato Transwell (superficie degli inserti è di 1.12 cm², il diametro è pari a 12 mm, la dimensione dei pori è di 0.4 µm, Transwell[®], Corning Costar, Cambridge, UK) per un periodo di 21 giorni, con una densità cellulare di 1.5×10^5 cellule/cm². In Figura 21 è mostrata una rappresentazione schematica del supporto di coltura Transwell[®].

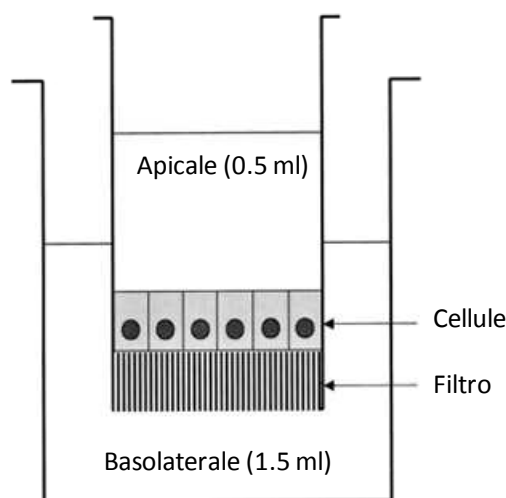


Figura 21. Rappresentazione schematica di un supporto di coltura a due compartimenti di tipo Transwell[®]. Le cellule di adenocarcinoma umano (Caco-2) formano dopo 21 giorni di coltura un monostrato continuo su di un filtro microporoso, che separa la camera in due compartimenti: apicale (superiore, volume del terreno di coltura = 0.5 ml) e basolaterale (inferiore, volume del terreno di coltura = 1.5 ml).

Il terreno di coltura (addizionato di penicillina/streptomicina 100U/ml) è stato sostituito ogni 2 giorni per 21 giorni. Per gli esperimenti di trasporto, i monostrati cellulari sono stati lavati con Hank's balanced salt solution (HBSS²) (0.5 ml nel compartimento apicale e 1.5 ml nel compartimento basolaterale) due volte in un tempo di 30 minuti a 37° C. Per i trasporti in direzione apicale-basolaterale (AB), il tampone è stato rimosso dal monostrato e sostituito nel compartimento apicale con 0.5 ml di soluzione saturata del farmaco preparata come descritto nel paragrafo 2.2 in Pluronic[®] F127 10% solubilizzato in HBSS o in Pluronic[®] P85 10%

² La soluzione HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) è un tampone comunemente usato per le colture cellulari, in alternativa al PBS. E' composto da: CaCl₂ (1.26 mM), MgCl₂ (0.493 mM), MgSO₄ (0.407 mM), KCl (5.33 mM), KH₂PO₄ (0.4441 mM), NaHCO₃ (4.17 mM), NaCl (137.93 mM), Na₂HPO₄ (0.338 mM), D-Glucosio (5.56 mM). E' commercialmente presente con o senza calcio e magnesio, rosso fenolo e bicarbonato.

solubilizzato in HBSS. La soluzione controllo era costituita dalla soluzione satura del farmaco in HBSS. I monostrati sono stati incubati a 37°C per 120 minuti. A 0 e 120 minuti è stata misurata la resistenza transepiteliale. La quantità di farmaco trasportata attraverso il monostrato è stata misurata prelevando 1.5 ml di tampone HBSS dal compartimento basolaterale dopo 30, 60, 90 e 120 minuti (cinetiche di trasporto di dapsons e clorotiazide) e dopo 120 minuti nel caso del trasporto del farmaco digossina.

Per il trasporto in direzione basolaterale-apicale (BA), la soluzione HBSS di lavaggio è stata rimossa dal compartimento basolaterale e sostituita con 1.5 ml di soluzione satura del farmaco. I monostrati cellulari sono stati incubati a 37° C per un tempo di due ore ed i prelievi di 0.5 ml di soluzione tampone dal compartimento apicale sono stati effettuati con le stesse modalità descritte per gli esperimenti in direzione AB.

I campioni sono stati diluiti come indicato in Tabella IX prima dell'analisi HPLC effettuata come descritto nel paragrafo 2.4.1.

Tabella VIII. Diluizioni dei campioni dei farmaci prelevati nei compartimenti apicale e basolaterale. I solventi delle diluizioni sono indicati in Tabella VI.

MOLECOLA	DIREZIONE DEL TRASPORTO	CAMPIONE	DILUIZIONE
DAPSONE	AB	Apicale	1:100
		Basolaterale	1:2
	BA	Apicale	1:2
		Basolaterale	1:100
CLOROTIAZIDE	AB	Apicale	1:50
		Basolaterale	1:2
	BA	Apicale	1:2
		Basolaterale	1:50
DIGOSSINA	AB	Apicale	1:5
		Basolaterale	1:2
	BA	Apicale	1:2
		Basolaterale	1:5

Il flusso ($J = dQ/dt$) è stato calcolato ponendo in grafico la quantità cumulativa di farmaco recuperata nel compartimento basolaterale (esperimenti AB) o apicale (esperimenti BA) in funzione del tempo e determinando la pendenza della retta che approssima tale relazione. Per gli esperimenti in direzione apicale-basolaterale il flusso è detto flusso di assorbimento (J_{AB}), mentre il flusso ottenuto dagli esperimenti di trasporto in direzione basolaterale-apicale è detto flusso di secrezione (J_{BA}).

Il coefficiente di permeabilità apparente (P_{app} , $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) è stato calcolato secondo l'Equazione 10

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{C_0 \cdot A} = \frac{J}{C_0 \cdot A} \quad \text{Equazione 10}$$

dove dQ/dt è il flusso (J , mg/sec), C_0 è la concentrazione del farmaco nel compartimento donatore (mg/ml) e A è la superficie della membrana dei filtri in cm^2 [186].

Il coefficiente di permeabilità apparente (cm/s) relativo al processo di assorbimento (trasporto AB, Eq. 11) e al processo di secrezione (trasporto BA, Eq. 12) è stato calcolato utilizzando i flussi dei rispettivi trasporti :

$$P_{appAB} = \frac{J_{AB}}{C_0 \cdot A} \quad \text{Equazione 11}$$

$$P_{appBA} = \frac{J_{BA}}{C_0 \cdot A} \quad \text{Equazione 12}$$

L'*efflux ratio* o *BA/AB ratio* (Eq. 13) è definito come il rapporto tra la permeabilità apparente (cm/sec) nella direzione di trasporto basolaterale verso apicale e la permeabilità apparente nella direzione apicale verso basolaterale; il rapporto inverso (*AB/BA ratio*) viene calcolato secondo l'Equazione 14. Tali parametri vengono utilizzati per quantificare la differenza nel trasporto di molecole in una direzione rispetto all'altra (trasporto asimmetrico).

$$\frac{BA}{AB} \text{ ratio} = \text{EffluxRatio} = \frac{P_{appBA}}{P_{appAB}} \quad \text{Equazione 13}$$

$$\frac{AB}{BA} \text{ ratio} = \frac{P_{appAB}}{P_{appBA}} \quad \text{Equazione 14}$$

Le differenze tra i valori di P_{app} sono state considerate statisticamente significative per valori di $p < 0.05$, l'analisi statistica è stata effettuata utilizzando ANOVA (software Kaleidagraph® v.3.6) seguita da un'analisi multipla su coppie di medie effettuata con il test Bonferroni.

2.5.4 Test della lattato deidrogenasi (LDH)

La morte cellulare è generalmente valutata sulla base di danni alla membrana plasmatica. Molti metodi standard sono basati sulla cattura o sul rilascio di coloranti endogeni cellulari, isotopi radioattivi o coloranti fluorescenti esogeni da cellule bersaglio marcate. Altri saggi si basano sul rilascio di enzimi citoplasmatici da parte di cellule danneggiate, dove la quantità dell'attività enzimatica valutata sul surnatante cellulare viene correlata con la quantità di cellule che hanno subito danni (lisi) alla membrana plasmatica. Saggi di rilasci enzimatici sono stati descritti per la fosfatasi acida e alcalina, la transaminasi glutammato-ossalacetato, la transaminasi piruvato-glutammato e l'arginosuccinato liasi. Tuttavia l'applicazione di questi test è risultata limitata dalla bassa quantità di enzimi presenti in molti tipi di cellule e dalle elaborate cinetiche di quantificazione necessarie per valutare la maggior parte delle attività enzimatiche.

Al contrario la lattato deidrogenasi (LDH) è un enzima citoplasmatico stabile presente in tutte le cellule. Quando la membrana plasmatica è danneggiata, l'LDH è rapidamente rilasciato nel surnatante cellulare. I comuni kit di valutazione della citotossicità sulla base dell'enzima LDH consistono in semplici e rapidi saggi colorimetrici per la misura dell'attività LDH.

Il terreno di coltura privo di cellule viene raccolto ed incubato con la miscela di reazione contenuta nel kit. L'attività dell'LDH è determinata da un test colorimetrico: nel primo passaggio NAD^+ viene ridotto a $NADH/H^+$ nella conversione del lattato a piruvato catalizzata dall'LDH. Nel secondo passaggio, un catalizzatore incluso nel kit (diaforasi) trasferisce H/H^+ dal $NADH/H^+$ al sale di tetrazolio, che è ridotto a formazano (Fig. 22).

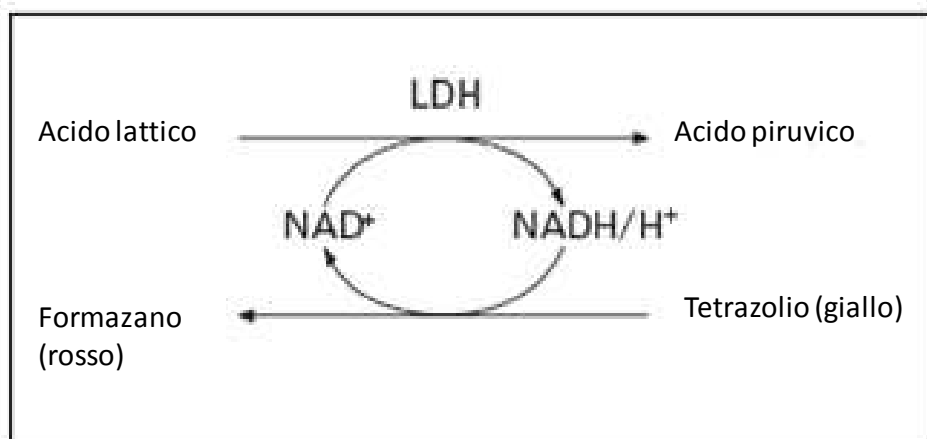


Figura 22. Reazione enzimatica in due passaggi per la quantificazione della lisi e morte cellulari in un test di citotossicità LDH.

Un aumento nel numero di cellule che presentano danni alla membrana plasmatica o nel numero di cellule morte porta ad un aumento dell'attività dell'enzima LDH nel terreno di coltura, che è direttamente correlabile con la quantità di formazano prodotto ad un determinato periodo di tempo. Di conseguenza, la quantità di colorante prodotto è proporzionale al numero di cellule che hanno subito lisi. Il formazano prodotto è solubile in acqua e mostra un massimo di assorbimento attorno ai 500 nm, mentre il sale di tetrazolio mostra scarsa assorbanza a questa lunghezza d'onda.

2.5.4.1 Procedura sperimentale

Per la valutazione della tossicità delle soluzioni utilizzate per gli esperimenti di trasporto descritti nella presente ricerca è stato utilizzato un Citotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Applied Science, Roche, Basilea, CH). Il catalizzatore liofilizzato è stato ricostituito in 1 ml di acqua bidistillata per dieci minuti sotto agitazione.

Come controllo positivo è stata utilizzata una soluzione di Triton X-100 (Sigma Aldrich, D) all'1%; 500 µl di tale soluzione sono stati posti a contatto con le cellule. La quantità di LDH liberata in seguito a lisi della membrana cellulare provocata dalla soluzione di tensioattivo rappresenta il 100% del valore di citotossicità.

I terreni di coltura dei compartimenti apicali delle cellule dopo esperimento di trasporto sono stati prelevati e centrifugati a 250 g per 5 minuti. I surnatanti sono stati prelevati e diluiti 1:5 in PBS; 100 µl delle soluzioni sono stati posti all'interno di pozzetti di una placca 96 pozzi (Cellstar[®], Greiner Bio-One, Frickenhausen, D).

I controlli positivi sono stati diluiti 1:5 in PBS; 200 µl di tale soluzione sono stati posti all'interno di un pozzetto e diluiti progressivamente 1:2, al fine di costruire la retta di calibrazione.

Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di reattivo per la rivelazione colorimetrica, costituito da 250 µl di sospensione di catalizzatore miscelato a 11.25 ml di colorante.

La placca è stata incubata a temperatura ambiente al riparo dalla luce per 30 minuti.

L'assorbanza è stata misurata a 492 nm mediante un lettore di micro piastre Multiskan EX (modello 355, Thermo Electron, Waltham, MA, USA).

2.6 EFFETTO DEI POLOSSAMERI SULLA PERMEAZIONE TRANSDERMICA DI DAPSONE, CLOROTIAZIDE E DIGOSSINA

2.6.1 Approvvigionamento e preparazione dei tessuti

Per gli esperimenti di permeazione transdermica è stata utilizzata l'epidermide isolata da pelle di maiale, prelevata dalla parte esterna dell'orecchio dell'animale poco dopo il sacrificio. La pelle, dopo essere stata lavata in acqua e separata dalla cartilagine mediante l'utilizzo di un bisturi, è stata tagliata in pezzi di adatte dimensioni e immersa in acqua distillata a 60° C per due minuti, al fine di separare l'epidermide. L'epidermide è stata immersa in soluzione fisiologica e congelata a -18 °C in freezer. Al momento dell'utilizzo, il tessuto è stato scongelato mediante immersione per alcuni minuti in pochi ml di soluzione fisiologica a temperatura ambiente.

Apparecchiatura: gli esperimenti di permeazione in vitro sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticale di tipo Franz (DISA, Milano, I) con area disponibile per la permeazione di 0.6 cm² (Fig. 23).

Tale sistema è costituito da un compartimento donatore di volume pari a circa 1 ml e un compartimento ricevente di volume pari a circa 4 ml. La soluzione ricevente è stata mantenuta in costante agitazione al fine di garantirne l'omogeneità ed evitare l'accumulo di farmaco in

prossimità della pelle (*boundary layer effect*). Le celle sono state immerse in un bagno termostato a 37 °C per tutta la durata dell'esperimento.

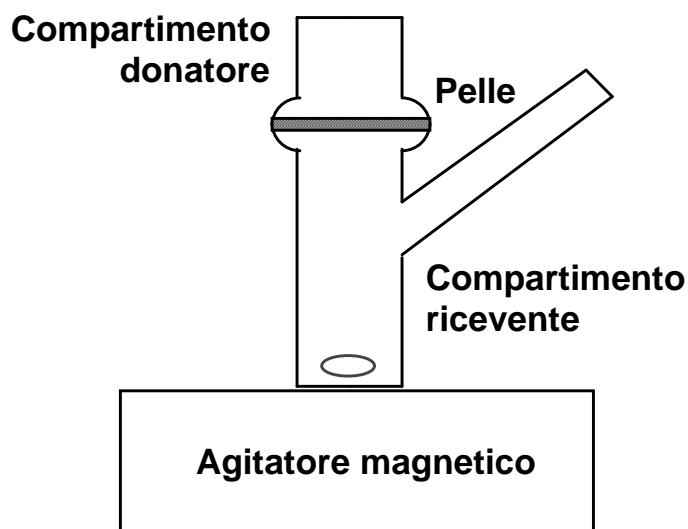


Figura 23. Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per gli esperimenti di permeazione (cella di Franz).

Condizioni sperimentali: l'epidermide è stata montata orizzontalmente tra il compartimento donatore e quello ricevente, con lo strato corneo rivolto verso l'alto.

La soluzione ricevente era costituita da soluzione fisiologica, opportunamente degasata prima dell'inizio dell'esperimento.

Il compartimento donatore è stato riempito con 0.3 ml delle soluzioni sature di ciascun farmaco, preparate (come descritto nel paragrafo 2.2) in Pluronic® P85 10% solubilizzato in acqua. La soluzione controllo era costituita dalla soluzione satura del farmaco in acqua.

Ad intervalli di tempo prestabiliti (1 ora) sono stati prelevati 300 µl di soluzione ricevente e sostituiti con uguale volume di soluzione fisiologica fresca. Gli esperimenti sono stati condotti per tempi di 24 ore (dapsona) e 22 ore (clorotiazide, digossina). I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante HPLC (paragrafo 2.4.1).

2.7 VALUTAZIONE *EX-VIVO* DELLE BIOADESIONE DI POLOSSAMERI ALLA VESCICA URINARIA SUINA

2.7.1 *Approvvigionamento e preparazione dei tessuti*

Le vesciche di suini femmina di circa sei mesi sono state ottenute da un macello locale e trasportate (entro qualche ora dal sacrificio dell'animale) in soluzione PBS contenente 8.8 g NaCl, 5.98 g Na₂HPO₄, 0.19 g KH₂PO₄ in un litro di acqua distillata a pH 7.4 alla temperatura di 4°C. Gli organi sono stati successivamente aperti e tagliati in pezzi approssimativamente quadrati delle dimensioni di circa 2 cm × 2 cm. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati entro 4 ore dal sacrificio dell'animale.

2.7.2 *Preparazione e caratterizzazione delle compresse di polimeri*

Le compresse di differenti polimeri (Pluronic[®] F127, Pluronic[®] F68, chitosano, Carbopol 934 ed etilcellulosa) sono state ottenute comprimendo circa 300 mg di polimero puro in una pressa idraulica manuale (Specac, Kent, UK). Per i polossameri è stata necessaria una lieve macinazione in mortaio di agata ed una successiva disidratazione su una piastra porosa prima della compressione. Per tutti i polimeri (ad eccezione di Pluronic[®] F127) le pressioni ed i tempi di applicazione sono stati di: 5 tonnellate (2 volte per 15 secondi), seguite da 6 tonnellate per 120 secondi. Per Pluronic[®] F127 sono state applicate per gli stessi tempi le pressioni di 2 e 3 tonnellate.

Le compresse sono state caratterizzate dal punto di vista fisico: la loro superficie è risultata essere pari a 1.23 cm²; i valori di peso, spessore e resistenza alla rottura sono mostrati in Tabella VII.

Comprese di alluminio (utilizzate come controllo negativo) sono state preparate ricoprendo dischi di alluminio (aventi la stessa area delle compresse polimeriche) con carta di alluminio.

2.7.3 *Descrizione dello strumento dinamometro*

La forza di distacco tra le compresse polimeriche e la mucosa vescicale suina è stata misurata mediante un dinamometro elettronico (AG MC1, Acquati, Arese, Italy), dotato di una cella di

carico di 5 kg. I segnali di forza e spostamento sono stati rilevati da trasduttori collegati tramite interfaccia ad un computer Macintosh Powerbook G3 (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA), equipaggiato con il software Scope[®] v3.5 (MacLab, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA).

Tabella IX. Caratterizzazine di compresse di differenti polimeri puri. Gli errori espressi come deviazioni standard

Polimero	Peso (mg)	Spessore (mm)	Resistenza alla rottura (N)
Pluronic [®] F127	315 ± 4	2.14 ± 0.04	22.1 ± 5.8
Pluronic [®] F68	298 ± 2	1.99 ± 0.02	18.4 ± 3.4
Chitosano	297 ± 5	1.69 ± 0.03	> 147
Carbopol [®] 934	300 ± 1	1.65 ± 0.01	> 147
Etilcellulosa	296 ± 3	2.09 ± 0.03	> 147

2.7.4 Procedura sperimentale

La compressa di polimero è stata incollata alla parte superiore mobile del dinamometro mediante utilizzo di una colla cianocarilica (Super Attack, Henkel, Loctite Adesivi S.r.l., Milano, Italy). Un pezzo di tessuto vescicale delle dimensioni di circa 2 cm × 2 cm è stato immerso in PBS e fissato con una colla cianocarilica e spilli ad un supporto di polistirolo, con il lato mucosale rivolto verso l'alto. Il supporto è stato incollato alla parte inferiore fissa del dinamometro. La compressa è stata abbassata ad una velocità costante fino al contatto con il tessuto. Una pressione costante di 3.70 ± 0.8 kPa è stata mantenuta per un determinato periodo di tempo, trascorso il quale il supporto superiore dello strumento è stato mosso verso l'alto ad una velocità costante (300 mm/min o 120 mm/min) ed è stata determinata la forza di distacco necessaria per separare le due superfici. I parametri sperimentali sono basati su quelli riportati da vari autori [217, 218]; la pressione di contatto è stata mantenuta ad un valore basso per fare sì che il processo di mucoadesione fosse determinato dall'intrinseca capacità dei polimeri testati di legarsi alla mucosa [219].

La forza di distacco (Newton) è stata registrata in funzione del tempo (secondi); dalle risultanti curve forza-tempo, è stato calcolato lo spostamento (a seconda della velocità di distacco applicata di 120 mm/min o 300 mm/min) e successivamente sono stati determinati la

forza di distacco e il lavoro di adesione. La forza di distacco (F_{\max}) rappresenta il picco della curva forza-spostamento mentre il lavoro di adesione (W_oA) è calcolato in base all'area sottesa da tale curva e rappresenta l'energia necessaria ($mJ = N \times mm$) necessaria per rompere il legame tra il tessuto ed il polimero [220].

Il metodo di valutazione della mucoadesione mediante la misura della forza di distacco consente anche di calcolare altri parametri di deformazione [221, 222], che possono fornire informazioni utili al fine dell'interpretazione dei dati e che sono utilizzati in uno studio di Chickering e Mathiovitz [221] per prevedere le potenziali proprietà mucoadesive di vari polimeri. In particolare, abbiamo calcolato la *deformation to failure*, (DF, Parametro A, Figura 24), che può essere definita come la distanza tra il punto iniziale e finale della curva forza-spostamento. Questo parametro è correlato con la plasticità dell'adesione.

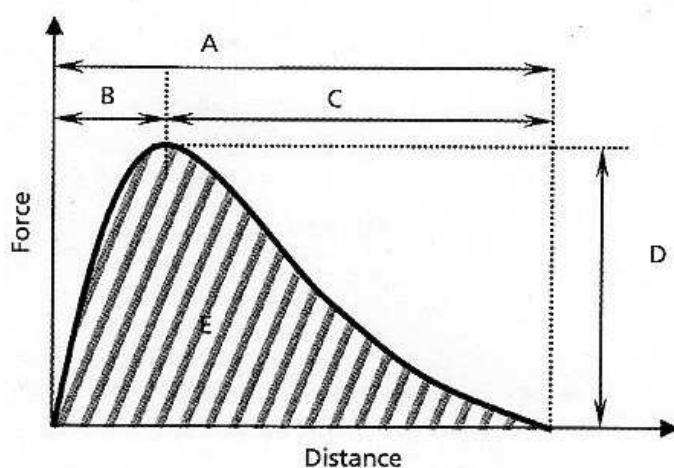


Figura 24. Curva forza-spostamento, da cui si possono ricavare la *deformation to failure* (A), la *deformation to peak* (B), la *deformation peak to failure* (C), la forza di distacco (D) e il lavoro di adesione (E).

2.7.5 Analisi statistica

I risultati sono stati ottenuti dalla media di almeno tre misure indipendenti.

Le differenze sono state considerate statisticamente significative per valori di $p < 0.05$, l'analisi statistica è stata effettuata utilizzando ANOVA (software Kaleidagraph[®] v.3.6) seguita da un'analisi multipla su coppie di medie effettuata con il test Bonferroni.

CAPITOLO IV

Risultati e discussione

CAPITOLO IV

Risultati e discussione

1. ANALISI DELLE DIMENSIONI DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI MEDIANTE TECNICA DLS (Dynamic Light Scattering)

Le analisi delle dimensioni delle micelle formate da Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 sono state condotte sulle soluzioni dei polimeri preparate in diversi solventi, sia in presenza che in assenza di un farmaco. E' noto infatti che la presenza di un sale o di soluto organico influenza i valori di CMC, come illustrato nei paragrafi 3.1.1.3 e 3.1.1.4 dell'introduzione.

1.1 ANALISI DLS IN ASSENZA DI FARMACO

Le soluzioni micellari di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 sottoposte all'analisi dimensionale sono state preparate in acqua, in soluzione fisiologica (0.9% NaCl) e in HBSS alle concentrazioni del 5% (p/p) e 10% (p/p).

I risultati delle analisi dimensionali sono mostrati nella Tabella X. Il diametro idrodinamico delle micelle dei due polimeri varia all'interno di un intervallo che va dai 16 ai 30 nm circa. Tali dimensioni sono compatibili con i valori di dimensione media di una micella polimerica riportati in letteratura. La concentrazione di Pluronic[®] F127 sembra influenzare le dimensioni delle micelle formate dal polimero: un aumento della concentrazione del polossamero dal 5% al 15% (p/p) sembra provocare una lieve diminuzione del diametro delle micelle. Questo effetto è meno evidente quando il polimero è disciolto in acqua ed appare più marcato nel caso sia solubilizzato in soluzione fisiologica o in HBSS.

Anche nel caso delle micelle formate da Pluronic[®] P85 l'aumento della concentrazione del polimero produce una diminuzione delle dimensioni delle micelle; tale effetto è più evidente rispetto a quello prodotto dall'aumento di concentrazione di Pluronic[®] F127.

Tabella X. Dimensioni delle micelle di Pluronic® F127 e Pluronic® F68 a diverse concentrazioni e in diversi solventi.

Pluronic®	% (p/p)	solvente	Z ave (nm) ^a	Pdl ^b
F127	5	H2O	28.82	0.15
F127	10	H2O	26.99	0.12
F127	15	H2O	28.32	0.20
F127	5	Fisiologica	28.69	0.19
F127	10	Fisiologica	26.99	0.11
F127	15	Fisiologica	25.65	0.14
F127	5	HBSS	28.10	0.16
F127	10	HBSS	30.43	0.19
F127	15	HBSS	24.43	0.08
P85	5	H2O	25.69	0.28
P85	10	H2O	19.04	0.26
P85	5	Fisiologica	23.56	0.28
P85	10	Fisiologica	16.61	0.19
P85	5	HBSS	26.71	0.30
P85	10	HBSS	17.14	0.20
P85	15	HBSS	19.13	0.20
P85	20	HBSS	16.25	0.20

^a Diametro idrodinamico medio

^b Indice di polidispersità

Per stessi valori di concentrazione di Pluronic® F127, il tipo di solvente in cui il polimero è solubilizzato non sembra influenzare in modo significativo la dimensione delle micelle, tranne quando il polimero al 10% (p/p) è solubilizzato in HBSS. In questo caso si ottengono micelle caratterizzate da un diametro significativamente superiore (circa 30 nm) rispetto a quelle ottenute quando il polimero al 5% o al 10% è solubilizzato in acqua o in soluzione fisiologica. In Tabella X sono indicati in rosso dei valori di indice di polidispersità (PdI) superiori a 0.2. L'indice di polidispersità rappresenta lo scostamento dal valore medio delle dimensioni degli oggetti presenti nella soluzione ed è un indicatore del grado di dispersione del campione stesso, ossia dell'esistenza di altre popolazioni dimensionali oltre a quella corrispondente alla

media. Per campioni monodispersi (contenenti cioè oggetti appartenenti ad una stessa famiglia dimensionale), il valore di polidispersità accettabile corrisponde a 0.2. Per campioni pluridispersi (contenenti cioè più di una popolazione dimensionale) il valore dell'indice di polidispersità è maggiore.

I valori di PDI superiori a 0.2 evidenziati in Tabella X si riferiscono ad analisi che hanno fornito come risposta l'esistenza nelle soluzioni di Pluronic[®] P85 di due popolazioni dimensionali: una popolazione attorno ai 20 nm (dimensioni mostrate in tabella) ed una popolazione attorno ai 5 nm (dimensioni non mostrate in tabella). La presenza di oggetti di dimensioni inferiori ai 20 nm può essere interpretata con l'esistenza nelle soluzioni di Pluronic[®] P85 (al 5% e al 10% in acqua, al 5% in soluzione fisiologica e al 5% in HBSS) di micelle parzialmente formate. Nelle soluzioni di Pluronic[®] F127 si osserva la presenza di una sola popolazione dimensionale, indice del fatto che le micelle sono completamente formate. La CMC di Pluronic[®] P85 in acqua (6.5×10^{-5} M, ossia 3% p/v) è effettivamente 10 volte superiore rispetto a quella di Pluronic[®] F127 (2.8×10^{-6} , che corrisponde allo 0.35 % p/v).

La presenza di NaCl in concentrazione pari allo 0.9% (in soluzione fisiologica) e in concentrazione pari allo 0.86 % (in HBSS), nonché la presenza di altri sali inorganici nella soluzione HBSS, diminuiscono la CMC di Pluronic[®] P85: nelle soluzioni di concentrazione pari al 10%, 15% e 20% si evidenzia la presenza di una sola popolazione dimensionale (micelle completamente formate).

Tali risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura sull'effetto di sali inorganici sul valore di CMC dei polossameri (come illustrato nel paragrafo 2.6.1.3): molti di essi, tra cui NaCl hanno un effetto stabilizzante *salting out* sulle micelle, cioè sviluppano l'idrofobicità della porzione PPO diminuendo l'idrofilia della porzione PEO e ciò si traduce in una diminuzione del valore di CMC.

1.2 ANALISI DLS IN PRESENZA DI FARMACO

Le analisi delle dimensioni delle micelle di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 in presenza di farmaci sono state effettuate sulle soluzioni in acqua e in HBSS al 10% p/p (soluzioni utilizzate rispettivamente negli esperimenti di permeazione attraverso l'epidermide e di trasporto attraverso le cellule Caco-2, capitolo IV).

I risultati sono mostrati in Tabella XI.

Tabella XI. Dimensioni delle micelle di Pluronic® F127 e Pluronic® F68 alle concentrazioni del 5% e 10% p/p solubilizzati in diversi solventi.

Pluronic®	% (p/p)	solvente	Dapsone	Clorotiazide	Digossina	Z _{ave} (nm)	Pdl
F127	10	H2O	+	-	-	27.76	0.15
F127	10	HBSS	+	-	-	26.26	0.13
P85	10	H2O	+	-	-	20.92	0.26
P85	10	HBSS	+	-	-	25.70	0.28
F127	10	H2O	-	+	-	23.70	0.17
F127	10	HBSS	-	+	-	26.50	0.06
P85	10	H2O	-	+	-	18.25	0.25
P85	10	HBSS	-	+	-	19.47	0.24
F127	10	H2O	-	-	+	25.75	0.10
F127	10	HBSS	-	-	+	26.74	0.09
P85	10	H2O	-	-	+	23.22	0.29
P85	10	HBSS	-	-	+	25.12	0.33

La presenza di farmaco non influenza significativamente la dimensione delle micelle di Pluronic® F127 e Pluronic® P85, che si mantengono all'interno di un intervallo di 19-27 nm. Anche in presenza di farmaci, il tipo di solvente in cui Pluronic® F127 è solubilizzato non varia in modo significativo la dimensione delle micelle.

Al contrario, il processo di formazione delle micelle di Pluronic® P85 è influenzato dalla presenza di farmaco. Come si può infatti notare dai valori degli indici di polidispersità evidenziati in rosso (maggiori di 0.2 per soluzioni contenenti più di una popolazione dimensionale), la presenza dei farmaci nelle soluzioni di Pluronic® P85 al 10% p/p, preparate sia in acqua che in HBSS, aumenta la CMC. In tali soluzioni si ritrovano due popolazioni dimensionali: una di dimensioni attorno ai 20 nm (indicata in Tabella XI) e l'altra di

dimensioni attorno ai 5 nm (non indicata), probabilmente costituita da micelle parzialmente aggregate.

Mentre nelle soluzioni al 10% in HBSS di Pluronic[®] P85 in assenza di farmaci (Tab. X) i sali contenuti all'interno del tampone esercitano un effetto *salting out* stabilizzante le micelle e abbassano la CMC del polimero rispetto alla soluzione al 10% preparata in acqua, in presenza di un farmaco tale effetto viene meno o non è sufficiente a compensare l'effetto destabilizzante le micelle esercitato dal farmaco stesso.

Due esempi di grafici di distribuzione dimensionale ottenuti in intensità per soluzioni di polossameri contenenti il farmaco dapsona sono stati mostrati nel Capitolo 3, paragrafo 2.3 (Figura 17, distribuzione monodispersa e Figura 18, distribuzione polidispersa).

2. SOLUBILIZZAZIONE DI FARMACI DI CLASSE II E DI CLASSE IV IN MICELLE DI POLOSSAMERI

I farmaci modello scelti per la valutazione delle capacità da parte delle micelle di polossameri di aumentare la solubilità in solventi acquosi, appartengono alla classe II (dapstone) e alla classe IV (clorotiazide, digossina) del sistema BCS.

Questi farmaci presentano differenze nell'ambito di solubilità, caratteristiche di lipofilia e peso molecolare (paragrafo 1, capitolo III). La clorotiazide è il farmaco più idrofilo e maggiormente solubile in acqua rispetto agli altri due farmaci modello, mentre la digossina è la molecola più lipofila e caratterizzata dal peso molecolare più elevato.

La capacità da parte delle micelle di Pluronic[®] F127 e di Pluronic[®] P85 di aumentare la solubilità di dapstone, clorotiazide e digossina è stata valutata mediante misura della concentrazione di soluzioni sature dei farmaci a 37°C. Tali soluzioni sono state preparate in acqua, soluzione fisiologica, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) in assenza di polossameri oppure in presenza di polossameri alla concentrazione del 5% e 10 % (p/p).

I risultati sono mostrati nei grafici a barre riportati in Figura 25. Tali grafici sono stati costruiti nel modo seguente: le barre di tonalità azzurra si riferiscono al solvente acqua, quelle di tonalità rosa al solvente soluzione fisiologica e quelle di tonalità verde al solvente HBSS. Per ognuno dei tre gruppi, le barre si riferiscono alla solubilità nel rispettivo solvente in assenza o in presenza di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 alle concentrazioni del 5% e 10% (p/p). In Tabella XII sono riportati gli stessi risultati in valore numerico.

Come si può osservare dal grafico riportato in Figura 25-a, la presenza di un polossamero è in grado di aumentare la solubilità del farmaco dapstone in ognuno dei tre solventi, in misura direttamente proporzionale alla concentrazione del polimero stesso. In particolare Pluronic[®] P85, solubilizzato in acqua, in soluzione fisiologica o in HBSS ha dimostrato produrre un aumento di solubilità significativamente maggiore rispetto a Pluronic[®] F127; la concentrazione di Pluronic[®] P85 al 10% (p/p) produce un aumento di solubilità di dapstone fino a 10 volte rispetto alla solubilità ottenuta nei solventi in assenza del polimero.

In figura 25-b è rappresentato l'effetto dei polossameri sulla solubilità di clorotiazide. Anche in questo caso la presenza di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 produce un significativo aumento della solubilità del farmaco rispetto a quella ottenuta nei tre solventi in assenza dei polimeri.

Tabella XII. Solubilità ($\mu\text{g/ml}$) a 37°C di dapsone, clorotiazide e digossina nei solventi acqua, soluzione fisiologica e HBSS in presenza di polossameri alla concentrazione del 5% e del 10% (p/p). Errori espressi come deviazioni standard.

SOLVENTE	% Pluronic [®] (p/p)		SOLUBILITÀ ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD		
	F127	P85	DAPSONE	CLOROTIAZIDE	DIGOSSINA
H ₂ O	-	-	304.49 \pm 9.41	428.54 \pm 54.15	38.75 \pm 2.79
	5	-	430.68 \pm 61.42	1032.57 \pm 67.46	42.12 \pm 0.09
	10	-	856.74 \pm 18.03	1530.40 \pm 56.26	57.55 \pm 2.34
	-	5	394.03 \pm 52.38	1205.00 \pm 199.81	50.2 \pm 2.04
	-	10	1976.19 \pm 176.03	2347.73 \pm 95.48	77.87 \pm 2.11
Fisiologica	-	-	358.96 \pm 48.23	543.14 \pm 145.11	24.93 \pm 2.61
	5	-	460.38 \pm 39.39	969.20 \pm 119.96	36.65 \pm 3.12
	10	-	1147.79 \pm 265.46	1046.17 \pm 8.15	49.75 \pm 3.01
	-	5	1255.85 \pm 91.3	2005.55 \pm 95.48	44.15 \pm 1.18
	-	10	3145.31 \pm 194.96	2059.25 \pm 15.33	59.38 \pm 0.94
HBSS	-	-	300.69 \pm 6.11	1330.01 \pm 8.15	28.17 \pm 2.83
	5	-	477.87 \pm 9.93	2199.48 \pm 296.15	40.94 \pm 0.56
	10	-	974.60 \pm 332.25	2398.00 \pm 3.85	52.54 \pm 2.35
	-	5	1185.60 \pm 215.27	2089.71 \pm 93.26	38.36 \pm 2.18
	-	10	2598.24 \pm 239.38	2795.31 \pm 113.19	63.64 \pm 4.66

L'effetto di aumento della concentrazione anche in questo caso sembra essere direttamente proporzionale rispetto alla concentrazione del polimero. L'aumento di solubilità di clorotiazide determinato da Pluronic[®] P85 al 10% (p/p) in soluzione fisiologica ed in HBSS risulta essere paragonabile a quello ottenuto in presenza di Pluronic[®] F127 al 10% (p/p) negli stessi solventi. Al contrario, Pluronic[®] P85 al 10% (p/p) se solubilizzato in acqua è in grado di aumentare in modo significativamente maggiore la solubilità del farmaco rispetto a Pluronic[®] F127 utilizzato alla stessa concentrazione. La presenza dei polossameri è in grado di aumentare la solubilità di clorotiazide fino a circa 5 volte; l'effetto dell'inclusione del farmaco

nelle micelle dei polimeri è meno evidente rispetto a quello ottenuto per il farmaco dapsona e ciò può essere spiegato dal fatto che la solubilità del farmaco clorotiazide in assenza dei polimeri è più elevata.

La solubilità del farmaco digossina (Figura 25-c) nei tre solventi acqua, soluzione fisiologica e HBSS risulta essere inferiore ai 40 µg/ml. Anche per questo farmaco la presenza dei polossameri produce un aumento significativo della solubilità, effetto proporzionale alla concentrazione del polimero utilizzata. Il più significativo incremento della solubilità è ottenuto in presenza di Pluronic[®] P85 alla concentrazione del 10% p/p, che produce un aumento della solubilità fino a circa due volte.

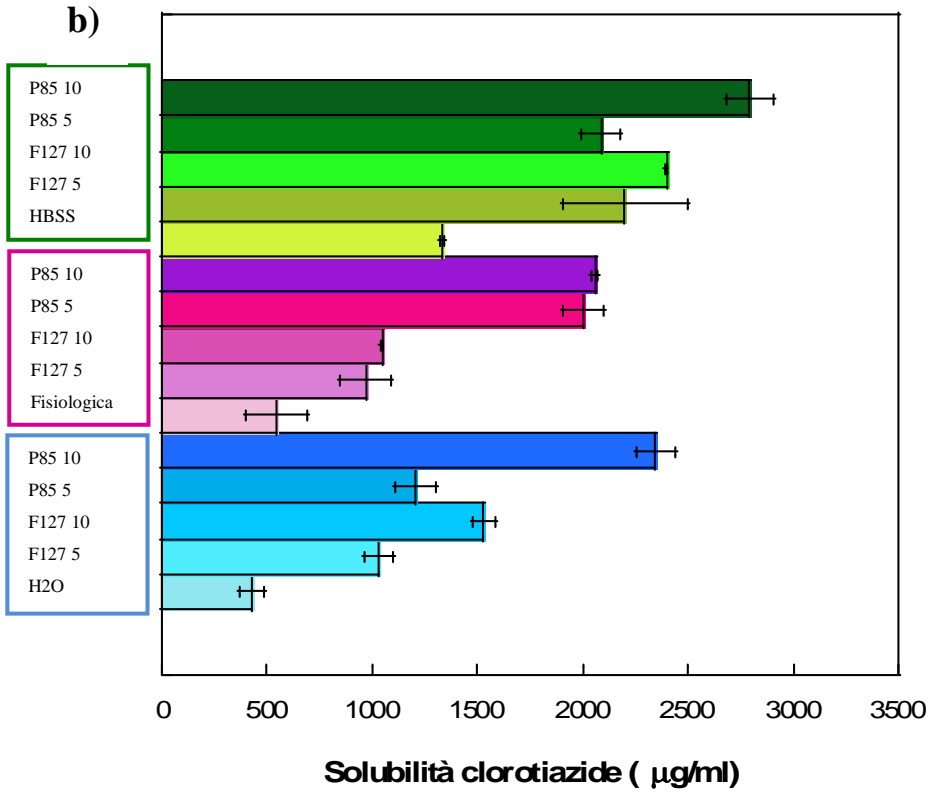
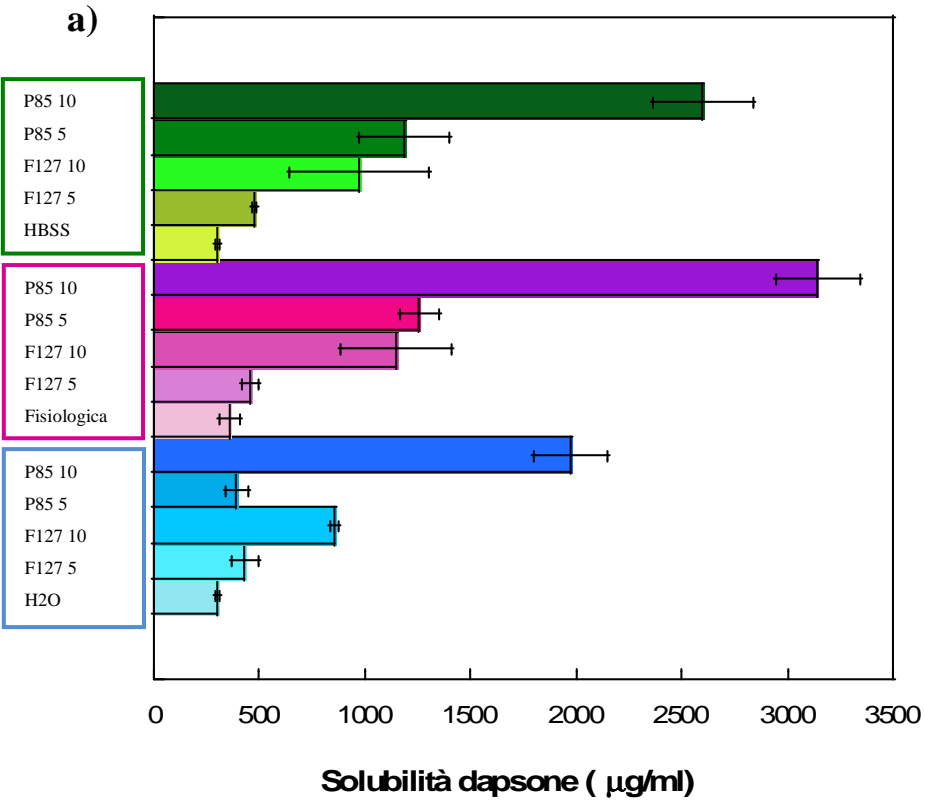
Per spiegare le differenze dal punto di vista quantitativo degli incrementi di solubilità dei tre farmaci causati dai polimeri, sono stati calcolati, con opportune approssimazioni, il volume del *core* micellare ed il volume dei farmaci, per verificare se la differenza di peso molecolare (e quindi del volume) del farmaco digossina rispetto alle altre due molecole possa giustificare le differenze nell'incremento della solubilità apportato dai polossameri.

Il raggio idrodinamico di una molecola (raggio di Stokes) rappresenta il raggio di una sfera compatta che diffonde alla stessa velocità della molecola. Esiste una relazione che lega peso molecolare e raggio idrodinamico di una molecola (Eq. 15):

$$M = \frac{4 \pi \cdot r^3}{3 V} \quad \text{Equazione 15}$$

dove M è il peso molecolare (D), è il raggio idrodinamico (cm), V è il volume specifico (cm³/g).

Utilizzando l'Equazione 15, si può ricavare il raggio idrodinamico delle molecole di cui è stata valutata la solubilità: esso risulta essere pari a 0.46 nm per il dapsona, 0.48 nm per la clorotiazide e 0.67 nm per la digossina (Tab. XIII).



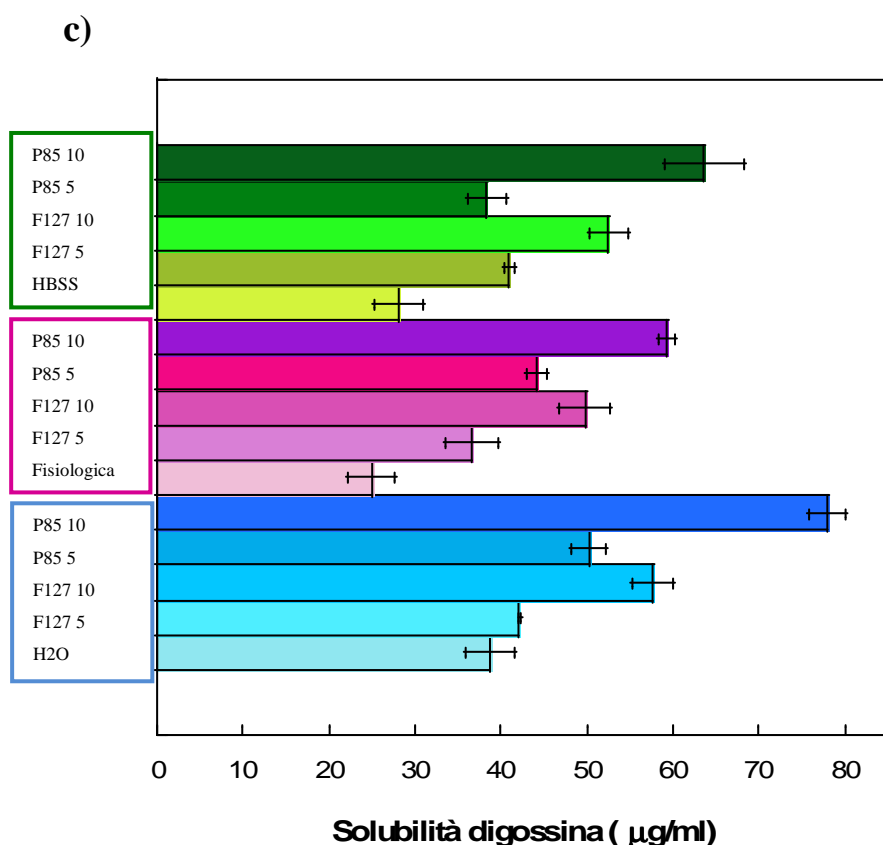


Figura 25. Solubilità di dapsona (a), clorotiazide (b) e digossina (c) in acqua, soluzione fisiologica e HBSS in assenza ed in presenza di polossameri al 5% alle concentrazioni del 5% e 10% (p/p). Errori espressi come deviazioni standard.

Il raggio idrodinamico del *core* e dello *shell* di micelle formate da Pluronic® P85 al 10% (p/p) sono stati determinati mediante studi di *small angle neutron scattering* [223]; assumendo che la micella abbia la forma di una sfera compatta, tramite questa analisi è risultato che il *core* ha un raggio idrodinamico pari a circa 4 nm e che lo *shell* si estende per una lunghezza pari a 8-10 nm. Per Pluronic® F127 al 10% (p/p) studi di *Cryo Tem* hanno fornito misure del raggio del *core* micellare di circa 5.4 nm [224]. Assumendo che le micelle presentino la geometria di una sfera, è stato calcolato il volume del *core* micellare di Pluronic® F127 e Pluronic® P85 alla concentrazione del 10%, secondo l'Equazione 16:

$$V_{sfera} = \frac{4}{3}\pi \cdot r^3$$

Equazione 16

I risultati del calcolo dei volumi per le molecole dei tre farmaci e per il *core* micellare di Pluronic® F127 e Pluronic® P85 sono mostrati in Tabella XIII.

Sono stati quindi calcolati i rapporti tra i volumi delle molecole ed i volumi del *core* lipofilo delle micelle, in cui le molecole ipoteticamente si collocano. Un rapporto volumetrico prossimo a 1 presuppone che una molecola si inserisca con difficoltà all'interno del *core* lipofilo della micella. Più il rapporto risulta essere piccolo (<1), più facilmente si può supporre che una molecola sia ospitata nel *core* micellare e quindi solubilizzata dal polimero. I risultati di questa elaborazione sono mostrati in Tabella XIV.

La molecola del dapsona presenta i rapporti volumetrici più bassi, sia rispetto al volume del *core* di Pluronic® F127 che rispetto a quello di Pluronic® P85. Inoltre, il *core* di Pluronic® F127 sembra consentire un miglior alloggiamento dei tre farmaci al suo interno, in quanto i rapporti volumetrici dei tre farmaci rispetto al volume del *core* lipofilo di questo polimero risultano essere inferiori rispetto a quelli calcolati per Pluronic® P85.

In base al calcolo dei rapporti volumetrici tra i volumi delle molecole e quelle delle porzioni lipofile delle micelle dei due polossameri, si può affermare che tutti e tre i farmaci possiedono dimensioni idrodinamiche tali da consentire teoricamente la loro collocazione all'interno del *core* delle micelle.

Tabella XIII. Raggio idrodinamico e volume delle molecole di dapsona, clorotiazide e digossina; raggio idrodinamico e volume del *core* delle micelle di Pluronic® F127 e P85 al 10% (p/p).

MOLECOLA	RAGGIO ^a (nm)	VOLUME ^c (nm ³)
Dapsone	0.46	0.41
Clorotiazide	0.48	0.46
Digossina	0.67	1.26
PLURONIC®	RAGGIO _{CORE} ^b (nm)	V _{CORE} ^c (nm ³)
F127	5.4	659.25
P85	4	267.94

^a Calcolato secondo equazione 10.

^b Ottenuto da studi SANS [223].

^c Calcolato secondo Equazione 11.

Tabella XIV. Rapporto tra i volumi delle molecole di dapsona, clorotiazide e digossina ed il volume del core micellare di Pluronic® F127 e Pluronic® P85.

MOLECOLA	RAPPORTO VOLUMETRICO FARMACO-PLURONIC® F127	RAPPORTO VOLUMETRICO FARMACO-PLURONIC® P85
Dapsone	$6.2 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$
Clorotiazide	$7.0 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
Digossina	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$4.7 \cdot 10^{-3}$

La capacità da parte di un polimero di solubilizzare un farmaco può essere espressa sia come numero di moli di farmaco solubilizzate rispetto al peso in grammi della porzione idrofobica, sia come *molar solubilization ratio* (MSR).

Per il calcolo della primo rapporto, il peso in grammi della porzione idrofobica di Pluronic® F127 e Pluronic® P85 10% (p/p) è stato calcolato moltiplicando il numero di moli di polimero presenti in 100 ml di soluzione per il peso molecolare delle unità PO presenti nel polimero. I risultati ottenuti per ciascuna molecola solubilizzata nelle soluzioni dei polossameri in diversi solventi sono mostrati in Tabella XV.

Tabella XV. Rapporti tra le moli solubilizzate di ciascun farmaco e i grammi di porzione idrofobica di Pluronic® P85 e Pluronic® F127 al 10% (p/p).

MOLECOLA	Moli solubilizzate/grammi porzione idrofobica P85			Moli solubilizzate/grammi porzione idrofobica F127		
	H ₂ O	Fisiologica	HBSS	H ₂ O	Fisiologica	HBSS
DAPSONE	1.59×10^{-4}	2.5×10^{-3}	2.1×10^{-4}	1.2×10^{-4}	1.5×10^{-4}	1.3×10^{-4}
CLOROTIAZIDE	1.6×10^{-4}	1.4×10^{-4}	1.9×10^{-4}	1.7×10^{-4}	1.2×10^{-4}	2.7×10^{-4}
DIGOSSINA	1.9×10^{-6}	1.5×10^{-6}	1.6×10^{-6}	2.4×10^{-6}	2.1×10^{-6}	5.0×10^{-7}

I risultati del calcolo dei rapporti tra le moli di farmaco solubilizzate e i grammi di polimero mostrano risultati in parte discordanti con i risultati di solubilità ottenuti sperimentalmente, che hanno portato a concludere che l'utilizzo di Pluronic[®] P85 alla concentrazione del 10% p/p consenta di ottenere i più significativi aumenti di solubilità per tutti e tre i farmaci. I valori dei rapporti mostrati in Tabella XV dovrebbero pertanto risultare maggiori per questo polossamero nei confronti di tutti e tre i farmaci ma, come si può notare dai risultati, ciò non è sempre verificato (si confrontino ad esempio i valori dei rapporti ottenuti per Pluronic[®] P85 e Pluronic[®] F127 in HBSS rispetto al farmaco clorotiazide).

E' da notare inoltre che, mentre i valori dei rapporti calcolati per i farmaci dapsone e clorotiazide risultano essere confrontabili, quelli relativi al farmaco digossina sono significativamente inferiori, a conferma del minore incremento della solubilità causato dai polimeri nei confronti di questo farmaco.

E' stata effettuata un'altra elaborazione dei dati di solubilità, che consiste nel calcolo del *Molar Solubilization Ratio* (MSR) che rappresenta il rapporto tra le moli di farmaco nel *core* delle micella e le moli del polimero all'interno dell'aggregato (Tab. XVI), calcolato come descritto di seguito.

L'*aggregation number* per ciascun polimero rappresenta un'approssimazione del numero di monomeri del polimero stesso che costituiscono le micelle; viene calcolato mediante studi SANS (*Small Angle Neutron Scattering*). Per Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 al 10% in soluzione acquosa esso risulta pari rispettivamente a 108 e 40 [223, 224]. Moltiplicando l'*aggregation number* per il numero medio di unità PO presenti in ciascun polimero, si può ottenere una stima del numero medio di unità PO che costituiscono la micella. Noto il peso molecolare di un monomero di polossamero, si può quindi conoscere il peso molecolare complessivo del polimero che costituisce la micella. Il numero di moli viene poi calcolato considerando i grammi di polossamero contenuti in 100 ml di soluzione al 10% (p/p). Tale valore può essere utilizzato per calcolare l'MSR.

I valori di MSR calcolati per il farmaco digossina rispetto ad entrambi i polimeri ed a tutti e tre i solventi risultano essere significativamente inferiori rispetto a quelli calcolati per dapsone e clorotiazide, che risultano essere tra loro confrontabili. Questo risultato conferma il fatto che il farmaco digossina sia meno efficientemente incluso all'interno del *core* micellare; la ragione di ciò è probabilmente da ricercarsi nella geometria della molecola e nell'ingombro sterico esercitato dagli stereocentri. Questi parametri non rientrano nel calcolo del diametro

idrodinamico e, di conseguenza, nel calcolo dei rapporti volumetrici (risultati confrontabili per tutti e tre i farmaci, come indicato in tabella XVI) ma che sicuramente influenzano significativamente il processo di solubilizzazione.

Tabella XVI. Molar solubilization ratio (MSR) di Pluronic® P85 e Pluronic® F127 al 10% (p/p) calcolati rispetto ai tre farmaci dapsona, clorotiazide e digossina in diversi solventi.

MOLECOLA	MSR P85 10% (p/p)			MSR F127 10% (p/p)		
	H ₂ O	Fisiologica	HBSS	H ₂ O	Fisiologica	HBSS
DAPSONE	0.36	0.58	0.48	0.44	0.58	0.50
CLOROTIAZIDE	0.36	0.32	0.43	0.65	0.45	1.03
DIGOSSINA	4.5 x 10 ⁻³	3.4 x 10 ⁻³	3.7 x 10 ⁻³	9.2 x 10 ⁻³	8.0 x 10 ⁻³	1.9 x 10 ⁻³

3. ESPERIMENTI DI TRASPORTO DELLE MICELLE DI POLOSSAMERI ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2

Come indicato dall'equazione di Noyes-Withney, la velocità di dissoluzione varia in funzione delle dimensioni particellari del farmaco, della sua bagnabilità e della solubilità alla saturazione; ciò sta a significare che per molecole la cui biodisponibilità orale è limitata dalla scarsa solubilità o dalla velocità di dissoluzione (farmaci appartenenti alle classi II e IV del sistema BCS), qualsiasi fattore che ne aumenti la solubilità, aumenterà anche la biodisponibilità.

Numerose strategie possono essere applicate per aumentare la solubilità in acqua di farmaci; uno degli obiettivi di questa ricerca è la valutazione dell'aumento di solubilità in solventi acquosi dei farmaci modello dapsona (classe II) e clorotiazide (classe IV) mediante l'inclusione in micelle polimeriche di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85. Esperimenti di trasporto attraverso il monostrato cellulare Caco-2, modello strutturale e funzionale della membrana dell'intestino tenue, sono stati condotti al fine di valutare come l'aumento di solubilità determinato dall'inclusione dei farmaci all'interno dei sistemi micellari influenzi il loro trasporto attraverso l'epitelio intestinale.

Inoltre la capacità di inibire la P-gp riportata per Pluronic[®] P85 è stata valutata utilizzando un farmaco substrato di tale trasportatore, la digossina, il cui trasporto in direzione apicale-basolaterale è stato confrontato con il trasporto in direzione basolaterale-apicale, in presenza ed in assenza del polossamero.

3.1 MISURA DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSEPITELIALE

La resistenza elettrica transepiteliale (TEER) è un indice dell'integrità del monostrato cellulare, in particolare dell'integrità e funzionalità delle *tight junctions* [225, 226]. La TEER aumenta durante la crescita cellulare fino al raggiungimento di un *plateau* quando le cellule formano un monostrato confluyente. Attraverso questa misura viene valutata la permeabilità agli ioni negli spazi paracellulari [227, 228]. La misura viene effettuata sia prima dell'inizio dell'esperimento di trasporto per valutare il raggiungimento della confluenza e del giusto grado di differenziazione da parte delle cellule del monostrato, con formazione delle *tight*

junctions, sia durante o al termine di un esperimento di trasporto, come valutazione della citotossicità manifestata dalla soluzione donatrice posta a contatto con le cellule. La misura della TEER come indice di citotossicità deve però essere presa in considerazione con le opportune precauzioni. Questa misura fornisce prevalentemente una valutazione della resistenza attraverso le *tight junctions*, ma non di quella attraverso le membrane cellulari. Quindi la misura della TEER non riflette l'integrità della membrana cellulare, ma solamente l'integrità del monostrato. Bassi valori di TEER indicano una tossicità che si potrebbe definire "precoce": essa si manifesta con un allargamento delle *tight junctions* ed un conseguente aumento del trasporto paracellulare di molecole e ioni, ma non è necessariamente indice di morte cellulare, che deve essere confermata da altri test, quali il test MTT, LDH o il saggio dell'esclusione del blu di tripano [229].

In Tabella XVII sono riportati i valori di TEER misurati prima e dopo ciascun esperimento di trasporto (della durata di 2 ore) effettuato attraverso i monostrati cellulari Caco-2. I valori sono il risultato di una media dei valori di almeno 4 monostrati cellulari per ciascuna soluzione donatrice testata. Gli errori sono espressi come deviazioni standard.

I valori di TEER indicati in letteratura per monostrati cellulari correttamente differenziati sono compresi tra i 200 ed i 600 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. In questa ricerca, sono stati esclusi dagli esperimenti di trasporto i monostrati aventi valori di TEER inferiori ai 300 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Come si può notare dalla tabella, i valori di TEER misurati dopo l'esperimento di trasporto sono sempre più bassi rispetto al valore iniziale, ad indicazione di una possibile citotossicità delle soluzioni applicate. I valori di resistenza elettrica subiscono dopo 2 ore di esperimento una diminuzione non quantificabile in modo univoco per i vari monostrati cellulari, ma che è mediamente superiore ai 250 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Tale variazione è, per dapsona e clorotiazide, mediamente maggiore quando viene studiato il trasporto BA rispetto ad AB. È da notare inoltre che l'abbassamento di TEER è più evidente nel caso della digossina rispetto a dapsona e clorotiazide, ed in particolare, i valori di resistenza elettrica misurati attraverso monostrati posti a contatto con la soluzione satura del farmaco in HBSS risultano essere prossimi allo zero al termine dell'esperimento di trasporto. Questo risultato può essere spiegato tenendo conto che i valori di TEER di partenza dei monostrati utilizzati per gli esperimenti di trasporto di digossina erano significativamente più bassi (300-350 $\Omega\cdot\text{cm}^2$) rispetto ai valori misurati attraverso i monostrati cellulari utilizzati per gli esperimenti di trasporto degli altri due farmaci (> 500 $\Omega\cdot\text{cm}^2$). Una altra ipotesi che può essere formulata è una maggiore tossicità della digossina

rispetto agli altri due farmaci, anche se in letteratura la digossina viene riportata in letteratura come non tossica per le cellule Caco-2 [230]. E' comunque da sottolineare che lo studio di tossicità citato si riferisce a concentrazioni di digossina di 30 nM (corrispondente a 0.023 µg/ml), mentre nel presente lavoro la sua concentrazione era ben superiore (8 µg/ml).

Tabella XVII. Valori di resistenza elettrica transepiteliale (TEER) misurati prima e dopo ciascun esperimento di trasporto condotto attraverso i monostrati cellulari Caco-2. I valori indicati sono il risultato di una media matematica dei valori di resistenza misurati attraverso quattro monostrati cellulari. Gli errori sono espressi come deviazioni standard.

ESPERIMENTO		DIREZIONE DEL TRASPORTO	TEER PRIMA ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) \pm SD	TEER DOPO ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) \pm SD	DIMINUZIONE %
SOLUZIONE DONATRICE SATURA					
Molecola	Solvente				
Dapsone	HBSS	AB	719 \pm 23	658 \pm 19	8.5
		BA	500 \pm 81	273 \pm 99	45.4
	F127 10%	AB	871 \pm 61	805 \pm 67	7.6
		BA	532 \pm 16	303 \pm 15	43.0
	P85 10%	AB	777 \pm 16	581 \pm 20	25.2
		BA	532 \pm 12	285 \pm 79	46.4
Clorotiazide	HBSS	AB	846 \pm 31	563 \pm 22	33.4
		BA	580 \pm 27	274 \pm 20	52.7
	F127 10%	AB	836 \pm 44	570 \pm 13	31.8
		BA	580 \pm 27	308 \pm 33	46.9
	P85 10%	AB	871 \pm 10	598 \pm 18	31.3
		BA	553 \pm 24	193 \pm 39	65.1
Digossina	HBSS	AB	302 \pm 81	003 \pm 00	99.0
		BA	303 \pm 11	007 \pm 02	97.7
	F127 10%	AB	327 \pm 89	28 \pm 10	91.4
		BA	318 \pm 100	116 \pm 35	63.5
	P85 10%	AB	357 \pm 62	195 \pm 23	45.4
		BA	360 \pm 108	200 \pm 91	44.4

Nel formulare considerazioni sui valori di TEER misurati attraverso le cellule Caco-2 prima e dopo gli esperimenti di trasporto, occorre infine menzionare il fatto che nessuna delle soluzioni donatrici preparata e posta a contatto con le cellule risultava essere sterile. Si tratta di una scelta pratica dettata dal fatto che in generale per esperimenti di trasporto condotti per tempi brevi (fino a 3 ore), l'eventuale citotossicità dovuta alla non sterilità delle soluzioni poste a contatto con le cellule non causa danni cellulari tali da influenzare i meccanismi di trasporto.

3.2 TEST DI CITOTOSSICITÀ DELLA LATTATO DEIDROGENASI

Il test della lattato deidrogenasi (test LDH) è stato condotto prelevando le soluzioni HBSS dal compartimento apicale al termine degli esperimenti di trasporto in direzione apicale-basolaterale e condotti a partire dalle soluzioni sature dei tre farmaci dapsona, clorotiazide e digossina preparate in HBSS in presenza ed in assenza di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85.

Il valore di citotossicità di ciascuna soluzione è un risultato percentuale relativo alla citotossicità del controllo positivo, rappresentato da una soluzione di tensioattivo (Triton-X all'1%) che provoca lisi della parete cellulare.

I risultati dei test LDH condotti sui monostrati cellulari Caco-2 utilizzati per gli esperimenti di trasporto sono mostrati in Tabella XVIII.

Le percentuali di enzima LDH rilasciate da parte dei monostrati cellulari risultano essere molto basse, inferiori al 3% rispetto al controllo positivo.

Si può concludere che le soluzioni donatrici utilizzate non inducono una riduzione significativa della vitalità cellulare e risultano essere accettabili dal punto di vista della citotossicità, per tutti e tre i farmaci studiati.

3.3 TRASPORTO DI DAPSONE ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2

Il dapsona è un farmaco utilizzato principalmente nel trattamento di infezioni da *Mycobacterium Leprae*, in associazione con i farmaci rifampicina e clofazimina. Oltre all'utilizzo nel trattamento della lebbra, il dapsona può essere utilizzato, per via orale, nel trattamento del pemfigoide, un'affezione della pelle e delle mucose di origine autoimmune e nel trattamento di dermatiti erpetiformi e dermatosi.

Tabella XVIII. Percentuali di LDH liberate nel compartimento apicale dai monostrati cellulari Caco-2 dopo gli esperimenti di trasporto in direzione apicale-basolaterale condotti a partire dalle soluzioni sature dei farmaci dapsona, clorotiazide e digossina. La percentuale è calcolata sulla base della quantità di enzima liberata dal controllo positivo, ossia dal monostrato cellulare trattato con una soluzione di tensioattivo (triton-X) all'1%.

SOLUZIONE DONATRICE SATURA		% LDH LIBERATA
Molecola	Solvente	
Dapsone	HBSS	0.84
	F127 10%	1.24
	P85 10%	1.69
Clorotiazide	HBSS	0.56
	F127 10%	1.65
	P85 10%	3.06
Digossina	HBSS	0.79
	F127 10%	1.17
	P85 10%	1.27

Il gel contenente dapsona al 5% (Aczone®) è stato approvato nel 2005 dalla FDA per il trattamento topico dell'*acne vulgaris*. Dati i severi effetti collaterali del farmaco (emolisi, metaemoglobinemia, neuropatia), è stata studiata questa formulazione topica per minimizzare l'assorbimento e quindi gli effetti sistemici. Al momento tale preparazione non è stata approvata in Europa per il trattamento antiacne.

Il farmaco somministrato per via orale ha una biodisponibilità del 70-80%, il legame alle proteine plasmatiche è del 70-90% e l'emivita è di 20-30 ore. Il farmaco viene metabolizzato per via epatica (via CYP2E1) ed eliminato per escrezione renale.

In questa ricerca il dapsona è stato scelto in come molecola modello appartenente alla classe II del sistema BCS. La sua inclusione all'interno delle micelle di polossameri ha lo scopo di aumentare la solubilità del farmaco e valutare *in vitro* le conseguenze sull'assorbimento attraverso un modello di membrana intestinale rappresentato dal monostrato cellulare Caco-2.

Il grafico mostrato in Figura 26 riporta la percentuale cumulativa di dapsona trasportata attraverso il monostrato cellulare Caco-2 dal compartimento apicale verso il compartimento basolaterale (trasporto AB, Figura 26-a) e dal compartimento basolaterale verso il compartimento apicale (trasporto BA, Figura 26-b), in funzione del tempo. La percentuale è stata calcolata in base alla quantità di dapsona applicata nel compartimento donatore. Le soluzioni donatrici sono rappresentate da soluzioni sature del farmaco in HBSS, preparate in presenza ed in assenza di Pluronic[®] P85 al 10% e Pluronic[®] F127 al 10% (p/p), come indicato in Tabella XIX.

Come si può notare dai grafici riportati in Figura 26, il trasporto di dapsona a partire da tutte e tre le soluzioni donatrici attraverso il monostrato cellulare Caco-2 in direzione AB è più significativo rispetto a quello in direzione BA. L'inclusione del farmaco in micelle di Pluronic[®] P85 al 10% e Pluronic[®] F127 al 10% provoca una significativa diminuzione del trasporto percentuale di farmaco attraverso il monostrato cellulare rispetto al trasporto a partire dalla soluzione preparata in HBSS in assenza di polossameri. Inoltre, la percentuale di dapsona trasportata quando il farmaco è incluso in micelle di Pluronic[®] P85 non risulta essere significativamente differente rispetto alla percentuale di farmaco trasportata a partire dalla soluzione preparata in Pluronic[®] F127.

Una possibile spiegazione a questi risultati può essere fornita dal fatto che probabilmente le micelle di entrambi i polossameri non rendono il farmaco disponibile per il trasporto. Pluronic[®] P85 risulta possedere caratteristiche di lipofilia più favorevoli per la ripartizione all'interno della membrana cellulare: esso presenta una lunghezza intermedia dei blocchi PPO e risulta possedere una lipofilia intermedia (HLB compreso tra 19 e 20). Come illustrato nel paragrafo 3.1.9.4 dell'Introduzione, i polossameri che possiedono queste caratteristiche vengono generalmente trasportati attraverso la membrana, al contrario di quelli relativamente idrofilici, come Pluronic[®] F127 (HLB compreso tra 20 e 29) che non sono in grado di ripartirsi all'interno della membrana. Tuttavia i risultati ottenuti nel presente studio non sembrano evidenziare alcuna differenza tra i due polimeri.

Come menzionato nel paragrafo 4.1.2 dell'Introduzione, la dimensione delle *tight junctions* è compresa tra i 3 ed i 4 nm. Dalle misure di DLS riportate nelle Tabelle X e XI, si sono ottenute dimensioni micellari (raggio idrodinamico) di circa 25 nm per Pluronic[®] F127 e di circa 26 nm per Pluronic[®] P85. Dal punto di vista dimensionale e geometrico le micelle di polossameri non risultano quindi possedere i requisiti necessari per l'attraversamento del

monostrato cellulare per via paracellulare, come tali. L'ipotesi più plausibile è pertanto quella che né le micelle di Pluronic® F127 né quelle di Pluronic® P85 siano in grado di attraversare il monostrato cellulare.

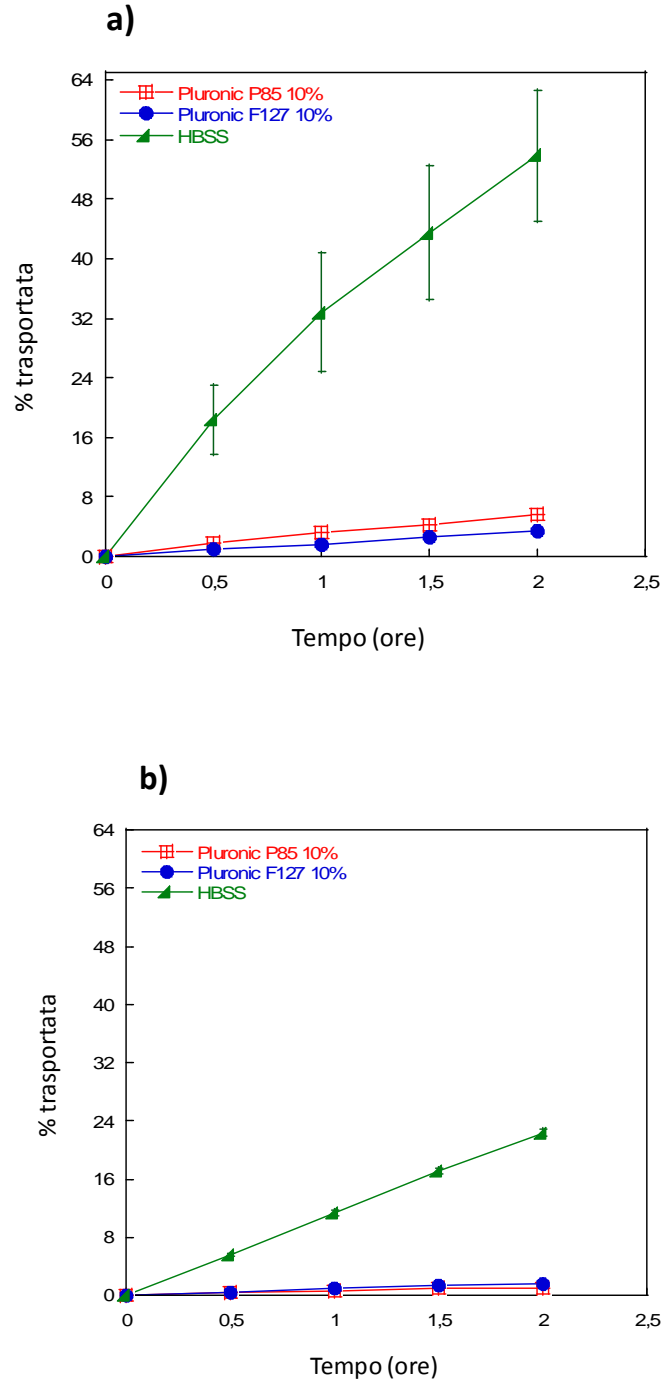


Figura 26. Profili di trasporto di dapson in direzione apicale-basolaterale (a) ed in direzione basolaterale-apicale (b) a partire da soluzioni sature di farmaco preparate in HBSS in presenza ed in assenza di Pluronic F127 al 10% e Pluronic P85 al 10%. Errori espressi come sem.

In Tabella XIX sono riportati i valori di concentrazione di dapsone nelle tre soluzioni donatrici ed i valori di P_{app} per i trasporti del farmaco in direzione apicale-basolaterale (AB) ed in direzione basolaterale-apicale (BA), calcolati secondo l'equazione 12 (Paragrafo 2.5.3, Cap. III). Sono stati inoltre calcolati i rapporti (*efflux ratios*) tra i coefficienti di permeabilità nelle due direzioni, secondo le equazioni 13 e 14. Il calcolo di questi parametri consente di valutare l'importanza del trasporto in una direzione rispetto al trasporto nella direzione opposta. Inoltre, valori di efflux ratio prossimi a 2 indicano che la molecola è probabilmente trasportata attraverso un meccanismo di trasporto attivo, valori inferiori a 2 indicano che probabilmente la molecola attraversa il monostrato cellulare per trasporto passivo.

Il coefficiente di permeabilità apparente della molecola trasportata sia in direzione AB che in direzione BA a partire dalla soluzione in HBSS è significativamente maggiore rispetto a quelli della molecola trasportata a partire dalle soluzioni contenenti polossameri, probabilmente perché solo la frazione di farmaco libero è in grado di attraversare la barriera cellulare.

Tabella XIX. Concentrazione delle soluzioni donatrici, valori di P_{app} ed *efflux ratios* per il trasporto di dapsone attraverso il monostrato cellulare Caco-2, in direzione apicale-basolaterale (AB) ed in direzione basolaterale-apicale (BA), al tempo $t=2$ ore. Errori espressi come deviazioni standard.

<i>molecola</i>	<i>solvente</i>		
	HBSS	P85 10% HBSS	F127 10% HBSS
DAPSONE			
Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	120.55 \pm 74.28	2124.41 \pm 538.09	827.02 \pm 351.41
$P_{app\ 2h\ AB}$ (cm/s) $\times 10^{-6}$	26.10 \pm 11.61	3.40 \pm 0.83*	1.71 \pm 0.96
$P_{app\ 2h\ BA}$ (cm/s) $\times 10^{-6}$	41.83 \pm 1.77	1.96 \pm 0.45*	2.84 \pm 7.75
AB/BA ratio	0.62	1.73	0.60
BA/AB ratio (<i>efflux ratio</i>)	1.60	0.58	1.66

* = significativamente differenti, $p < 0.01$

In presenza di Pluronic[®] F127, il trasporto in direzione AB risulta non significativamente diverso da quello in direzione BA e questo suggerisce che non esistano fenomeni di trasporto attivo del farmaco attraverso le cellule Caco-2. Al contrario, in presenza di Pluronic[®] P85 il trasporto AB è superiore a quello in direzione BA.

L'osservazione dei coefficienti di permeabilità apparenti, come l'analisi dei profili delle percentuali di farmaco trasportate, conducono a formulare l'ipotesi che l'inclusione della

molecola all'interno del sistema micellare la renda meno disponibile per il trasporto o che in qualche modo il suo passaggio attraverso il monostrato risulti essere ostacolato. La differenza di permeabilità in assenza di polossameri potrebbe far pensare che il dapsona sia un substrato di una pompa ad efflusso, poiché il trasporto BA è superiore a quello AB. Tuttavia dai dati di letteratura, il dapsona non risulta un substrato della pompa ad efflusso P-gp, né di altri trasportatori.

3.4 TRASPORTO DI CLOROTIAZIDE ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2

La clorotiazide (Diuril[®]) è un diuretico tiazidico non commercializzato in Italia, indicato nella terapia dell'edema associato ad insufficienza cardiaca congestizia. E' indicato nel trattamento dell'ipertensione sia come unico agente terapeutico sia in associazione con altri antiipertensivi. Viene somministrato per via orale o per via intravenosa. La biodisponibilità dopo somministrazione orale risulta essere del 10-20%, l'emivita è di 45-120 minuti. Il farmaco viene eliminato principalmente per via renale, immodificato.

Il farmaco appartiene alla classe IV del sistema BCS; si tratta di una molecola dotata di scarsa solubilità e scarsa permeabilità e queste caratteristiche spiegano le proprietà farmacocinetiche sfavorevoli.

Il trasporto di clorotiazide in presenza ed in assenza di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 è stato testato in vitro attraverso il monostrato cellulare Caco-2, per valutare se l'aumento della solubilità determinato dai Polossameri possa influire sulle proprietà di permeabilità del farmaco e migliorarne la biodisponibilità.

In Figura 27 è mostrato il grafico che riporta la percentuale cumulativa di clorotiazide trasportata attraverso le cellule Caco-2 in funzione del tempo, sia in direzione apicale-basolaterale (Fig. 27-a), sia in direzione basolaterale-apicale (Fig. 27-b). Le percentuali sono state calcolate in base alla quantità di farmaco contenuta nella soluzione donatrice, rappresentata da una soluzione satura del farmaco in HBSS, in Pluronic[®] F127 al 10% (p/p) ed in Pluronic[®] P85 al 10% (p/p).

In assenza di polimero il trasporto di clorotiazide è superiore in direzione BA rispetto alla direzione AB, suggerendo che il farmaco potrebbe essere substrato di trasportatori attivi. I risultati riportati in letteratura a questo proposito non sono completamente in accordo. Infatti,

secondo alcuni autori [231-233], il trasporto nei due sensi è uguale e quindi la molecola permea per diffusione passiva. Secondo altri autori [232], invece, il trasporto BA è superiore a quello AB, corrispondente ad una percentuale di trasporto transcellulare di circa 25%.

In Tabella XX sono riportati i valori di concentrazione di clorotiazide nelle tre soluzioni donatrici ed i valori di P_{app} per i trasporti del farmaco in direzione apicale-basolaterale (AB) ed in direzione basolaterale-apicale (BA), calcolati secondo l'Equazione 12 (Paragrafo 2.5.3 Cap. III) . Sono stati inoltre calcolati i rapporti (*efflux ratios*) tra i coefficienti di permeabilità nelle due direzioni, secondo le equazioni 13 e 14 . Dal momento che i profili del trasporto della molecola non sono lineari, il P_{app} è stato calcolato al tempo $t= 1$ ora, per diminuire l'errore legato all'approssimazione della linearità assunta dal calcolo del P_{app} .

In assenza di polossameri, la differenza nel coefficiente di permeabilità nelle due direzioni AB e BA, pur non significativa, è di circa il 35%, in accordo con il dato di letteratura [232].

L'inclusione del farmaco all'interno delle micelle di Pluronic[®] P85 provoca un significativo aumento del trasporto del farmaco in direzione apicale-basolaterale ma non in direzione basolaterale-apicale. Ciò suggerisce che il farmaco sia substrato di una pompa a efflusso e che tale pompa sia probabilmente inibita dai polossameri. Tale spiegazione potrebbe giustificare il fatto che il trasporto di clorotiazide in direzione basolaterale-apicale a partire dalla soluzione preparata in HBSS sia superiore rispetto al trasporto in presenza di polossameri, anche se tale differenza non risulta essere statisticamente significativa ($p>0.05$).

Come già menzionato, il rapporti (*ratios*) fra i coefficienti di permeabilità nelle due direzioni di trasporto sono parametri utilizzati per quantificare la differenza nel trasporto di molecole in una direzione rispetto all'altra (trasporto asimmetrico). Valori di tali rapporti maggiori o uguali a 2, indicano che la molecola è trasportata mediante un meccanismo di trasporto attivo.

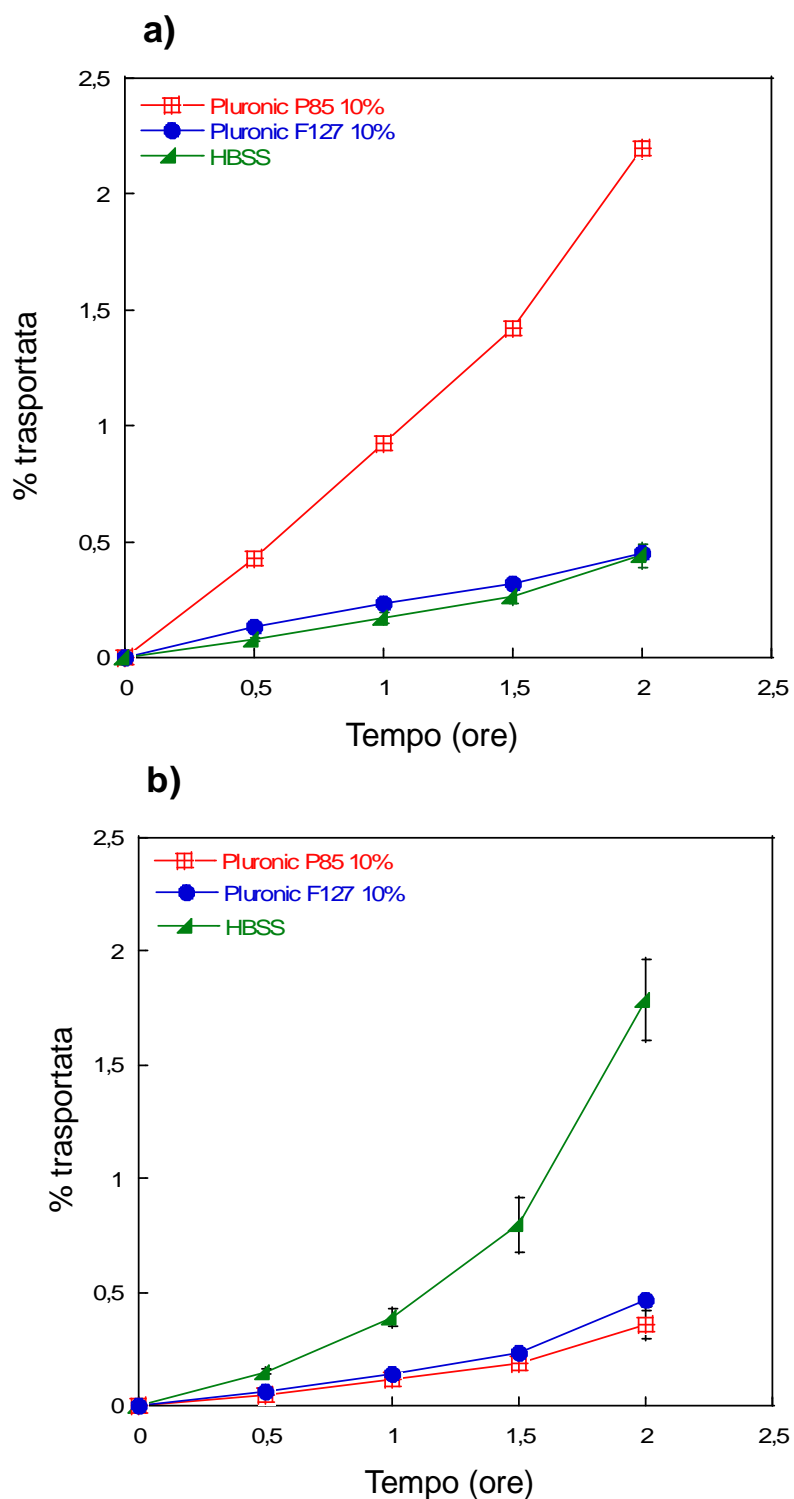


Figura 27. Profili di trasporto di clorotiazide in direzione apicale-basolaterale (a) ed in direzione basolaterale-apicale (b) a partire da soluzioni sature di farmaco preparate in HBSS in presenza ed in assenza di Pluronic® F127 al 10% e Pluronic® P85 al 10%. Errori espressi come sem.

Tabella XX. Concentrazione delle soluzioni donatrici, valori di P_{app} ed *efflux ratios* per il trasporto di clorotiazide attraverso il monostrato cellulare Caco-2, in direzione apicale-basolaterale (AB) ed in direzione basolaterale-apicale (BA), al tempo t= 1 ora. Errori espressi come deviazioni standard.

<i>Molecola</i>	<i>Solvente</i>		
	HBSS	P85 10% HBSS	F127 10% HBSS
Concentrazione($\mu\text{g/ml}$)	903.0 \pm 98.3	2323.2 \pm 968.2	1792.6 \pm 627.9
P_{app} 1h AB (cm/s) $\times 10^{-7}$	2.10 \pm 0.58	11.5 \pm 3.96*	2.87 \pm 0.12**
P_{app} 1h BA (cm/s) $\times 10^{-7}$	3.38 \pm 1.62	1.07 \pm 0.22*	1.33 \pm 0.23**
AB/BA ratio	0.62	10.75	2.16
BA/AB ratio (<i>efflux ratio</i>)	1.61	0.09	0.46

* e ** significativamente differenti ($p < 0.001$)

Come si può osservare dalla Tabella XX, il rapporto BA/AB relativo al trasporto di clorotiazide a partire dalla soluzione preparata in HBSS è prossimo a 2: ciò può significare che il farmaco è probabilmente coinvolto in un meccanismo di efflusso. Tale sistema di trasporto risulta essere inibito da Pluronic® P85: in presenza del polossamero infatti sia il valore di *efflux ratio* BA/AB, sia il valore di P_{app} B/A risultano essere significativamente diminuiti. Anche Pluronic® F127 sembra avere un qualche effetto sull'inibizione di tale sistema di trasporto: in presenza di questo polossamero il valore BA/AB *ratio* appare diminuito in modo significativo. Dal momento che Pluronic® P85 risulta essere un inibitore della P-gp, si può pensare che essa sia il trasportatore coinvolto nell'efflusso di clorotiazide, anche se questa ipotesi non è supportata da altri studi riportati in letteratura che classificano questo farmaco come substrato della P-gp.

Concludendo, si può affermare che la permeabilità di clorotiazide, molecola dotata di scarse solubilità e permeabilità, è aumentata in modo significativo dall'inclusione in micelle di Pluronic® P85 al 10% (p/p); l'inclusione in micelle di Pluronic® F127 non ha un effetto significativo sul valore del coefficiente di permeabilità apparente calcolato per il trasporto in direzione AB.

L'aumento della permeabilità del farmaco attraverso il monostrato cellulare Caco-2 può essere spiegato con una inibizione da parte di Pluronic® P85 di una pompa a efflusso coinvolta nel trasporto del farmaco dal compartimento basolaterale a quello apicale. Anche

Pluronic[®] F127 mostra un effetto di inibizione di una pompa a efflusso e provoca una lieve diminuzione dell'efflux ratio, ma tale effetto non è sufficiente per determinare un significativo aumento del P_{app} AB di clorotiazide rispetto al valore ottenuto in HBSS. Per provare questa ipotesi sarebbe utile effettuare esperimenti di trasporto di clorotiazide in presenza di inibitori specifici delle pompe a efflusso presenti nella membrana apicale del monostrato cellulare Caco-2.

3.5 VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA P-gp DA PARTE DI PLURONIC[®] P85 MEDIANTE TRASPORTO DI DIGOSSINA ATTRAVERSO LE CELLULE CACO-2

La digossina è un glicoside digitalico cardiotonico che agisce aumentando la forza e la velocità di contrazione delle fibre del cuore. È indicata nelle cardiopatie con fibrillazione atriale ed elevata risposta ventricolare, nello scompenso cardiaco, nell'ipertensione, nelle coronaropatie e valvulopatie.

La digossina è assorbita in maniera passiva nel tratto intestinale; dopo somministrazione orale il picco delle concentrazioni plasmatiche viene raggiunto in una o due ore, l'emivita è variabile dalle 36 alle 48 ore. La percentuale di digossina assorbita dopo somministrazione orale varia sia da soggetto a soggetto, sia a seconda della formulazione e risulta essere limitata dalla P-gp intestinale, di cui il farmaco è substrato.

Circa il 75% del farmaco è escreto, immodificato, per via renale sia per escrezione tubulare che per filtrazione glomerulare.

Nella presente ricerca la digossina, farmaco appartenente alla classe II del sistema BCS [234] è stato scelto in quanto substrato della P-gp per valutare l'effetto di inibizione di tale pompa a efflusso esercitato da Pluronic[®] P85. A questo scopo, il trasporto del farmaco attraverso il monostrato cellulare Caco-2 è stato studiato a partire da una soluzione donatrice preparata in HBSS in presenza ed in assenza di Pluronic[®] P85. Il trasporto di digossina è stato effettuato anche a partire dalla soluzione donatrice contenente Pluronic[®] F127, al fine di valutare l'influenza delle caratteristiche di lipofilia dei polossameri sull'azione di inibizione della pompa.

In questi esperimenti non è stata valutata la cinetica di trasporto, ma la quantità di farmaco presente nel compartimento ricevente e donatore è stata dosata dopo 2 ore.

La concentrazione media delle soluzioni sature donatrici di digossina preparate in HBSS era pari a circa 9.5 µg/ml.

In Figura 28-a è riportato il grafico relativo al trasporto di digossina effettuato in direzione apicale-basolaterale. Come si può notare, non è stato possibile quantificare la quantità di farmaco presente nel compartimento basolaterale, a causa del basso limite di quantificazione del metodo di analisi HPLC (che risulta essere pari a circa 1.5 µg/ml).

Come si può notare dal grafico, la percentuale di farmaco ritrovata nel compartimento donatore al termine del trasporto effettuato a partire dalle soluzioni preparate in HBSS, Pluronic[®] P85 al 10% (p/p) e Pluronic[®] F127 al 10% (p/p) risultano essere pari rispettivamente al 90%, 85% e 75% della quantità applicata nel compartimento apicale. Assumendo che né il filtro né il monostrato cellulare assorbano il farmaco³, si può calcolare la percentuale di farmaco permeata nel compartimento ricevente basolaterale, rispetto alla quantità applicata nel compartimento donatore apicale, che risulta essere del 10% (HBSS), 15% (Pluronic[®] P85) e 25% (Pluronic[®] F127). L'inclusione del farmaco in micelle di polossameri sembra determinare un aumento della percentuale di farmaco trasportata attraverso il monostrato. Tale effetto sembra essere maggiore quando il farmaco è incluso in micelle di Pluronic[®] P85 (la maggiore lipofilia di questo polossamero produce anche un maggior incremento di solubilità del farmaco).

Nel caso del trasporto in direzione BA (Fig. 28-b), è stato possibile quantificare la digossina in entrambi i compartimenti. In questo caso, il trasporto è maggiore per la soluzione in HBSS rispetto alle due soluzioni contenenti polossameri.

³ Al fine di valutare l'effetto del filtro sul trasporto del farmaco e di verificare un eventuale assorbimento di digossina su di esso, sono stati effettuati esperimenti "controllo", consistenti nella valutazione del trasporto della molecola attraverso i filtri di policarbonato in assenza del monostrato cellulare. I supporti non influenzano il trasporto di farmaco, in quanto esso non viene assorbito sulla loro superficie e le percentuali di farmaco recuperate nel compartimento donatore e ricevente risultano essere prossime al 100% (grafici non riportati).

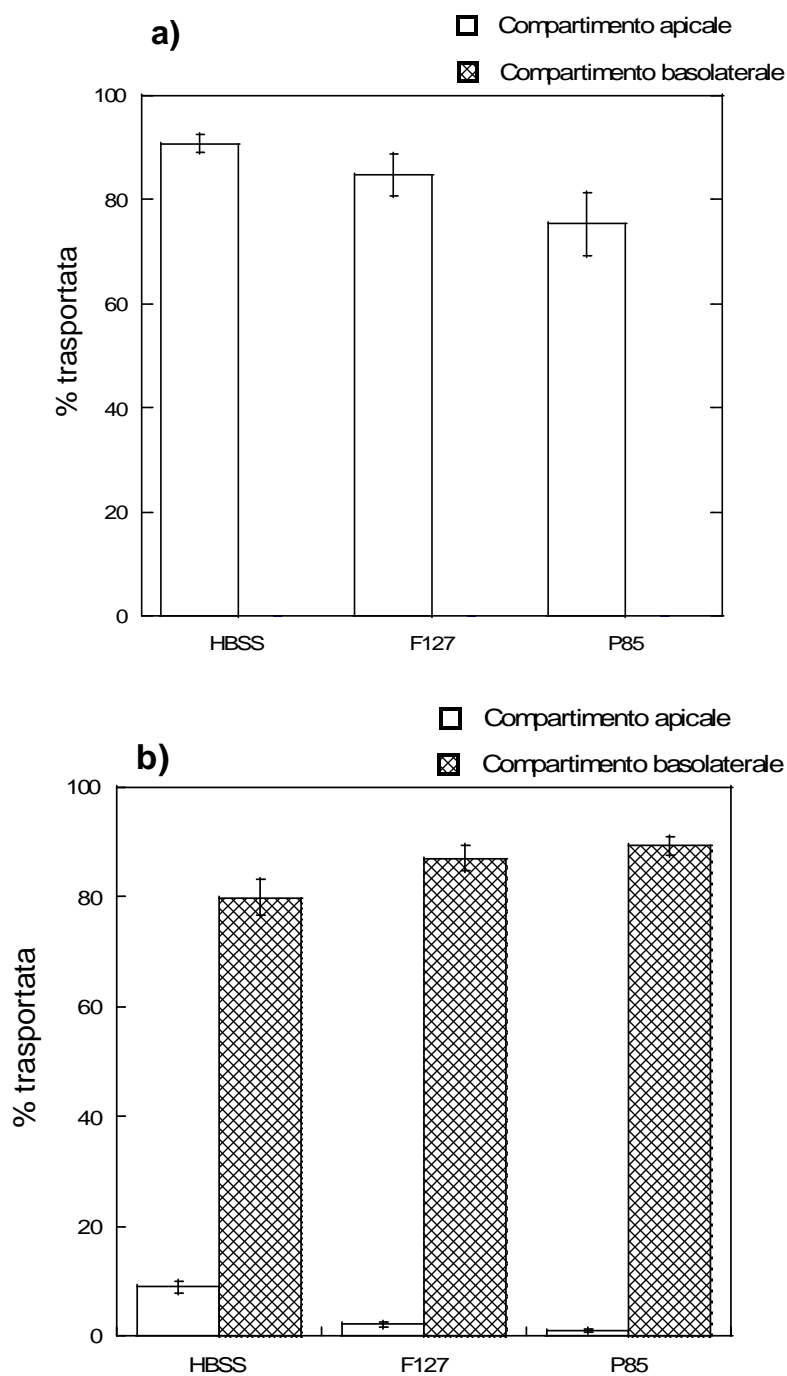


Figura 28. Trasporto (%) di digossina in direzione apicale-basolaterale (a) ed in direzione basolaterale-apicale (b) a partire da soluzioni sature di farmaco preparate in HBSS in presenza ed in assenza di Pluronic® F127 al 10% e Pluronic® P85 al 10%. Errori espressi come sem.

La quantità di farmaco ritrovata nel compartimento apicale dopo trasporto a partire dalla soluzione contenente Pluronic® F127 non risulta essere significativamente differente ($P>0.05$) rispetto a quella ritrovata a partire dalla soluzione preparata in Pluronic® P85.

Questi risultati sono confermati dal calcolo dei valori di P_{app} BA (Tabella XXI): i polossameri producono una significativa diminuzione del valore del coefficiente di permeabilità apparente della digossina in direzione basolaterale-apicale, rispetto al valore del coefficiente calcolato per il trasporto del farmaco a partire dalla soluzione in HBSS.

Il fatto che anche Pluronic® F127 mostri un effetto di inibizione sulla pompa a efflusso può suggerire che i Polossameri agiscano come inibitori non specifici della P-gp, oppure che la digossina sia substrato di un'altra pompa a efflusso (BCRP, MRP2) presente a livello della parete apicale e che tale pompa sia inibita in maniera non specifica dai polossameri.

Tabella XXI. Concentrazione delle soluzioni donatrici, valori di P_{app} per il trasporto di digossina attraverso il monostrato cellulare Caco-2, in direzione basolaterale-apicale (B-A), al tempo $t= 2$ ore. Errori espressi come deviazioni standard. Il valore del coefficiente di P_{app} A-B non è stato calcolato in quanto la concentrazione di farmaco ritrovata nel compartimento ricevente apicale era al di sotto del limite di quantificazione del metodi HPLC.

DIGOSSINA	HBSS	P85 10% HBSS	F127 10% HBSS
Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	9.59 ± 1.37	50.95 ± 0.76	35.94 ± 1.75
$P_{app\ 2h\ AB}$ (cm/s) $\cdot 10^{-6}$	0	0	0
$P_{app\ 2h\ BA}$ (cm/s) $\cdot 10^{-6}$	7.91 ± 0.70	1.13 ± 0.48	2.07 ± 0.60

4. EFFETTO DEI POLOSSAMERI SULLA PERMEAZIONE TRANSDERMICA DI DAPSONE, CLOROTIAZIDE E DIGOSSINA

L'utilizzo di sistemi colloidali uniti o meno alla presenza di promotori di assorbimento rappresenta uno dei metodi non invasivi più utilizzati per modificare il trasporto di farmaci attraverso la barriera cutanea.

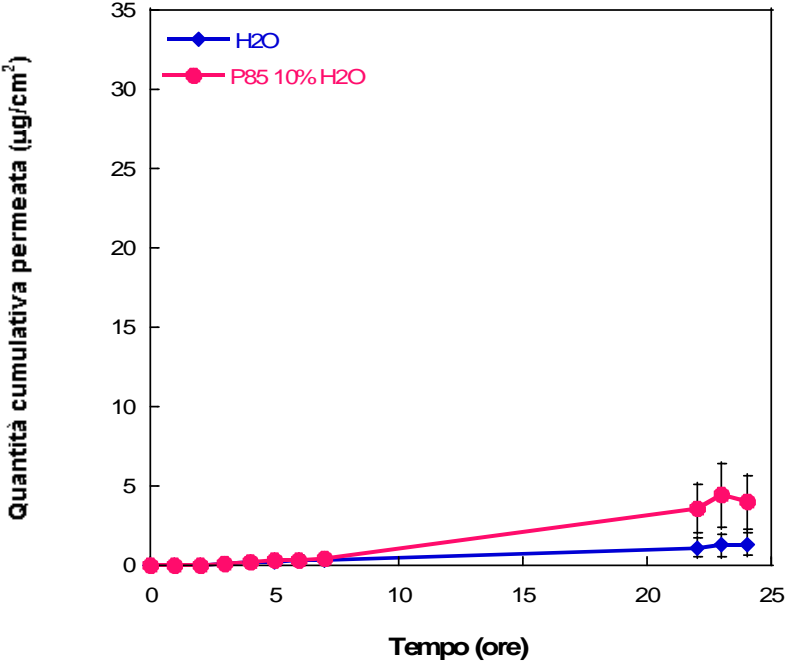
In questa ricerca, i farmaci modello dapstone, clorotiazide e digossina sono stati inclusi all'interno di micelle di polossameri, che si sono dimostrati efficaci per quanto riguarda l'aumento della loro solubilità in solventi acquosi.

Per la valutazione in vitro dell'effetto di tali polimeri sull'assorbimento transdermico, le soluzioni dei tre farmaci sono state preparate in Pluronic[®] P85 alla concentrazione del 10% (p/p), poiché questo polossamero ha dimostrato produrre i più significativi aumenti della solubilità in acqua per tutti e tre i farmaci studiati. Gli esperimenti sono stati condotti in celle di diffusione di Franz per un tempo di 22 ore (dapstone, digossina) e 24 ore (clorotiazide); come membrana è stata utilizzata l'epidemide isolata (strato corneo più epidermide) dalla pelle di orecchio di maiale. Esperimenti preliminari condotti sulla pelle *full thickness* (comprendente strato corneo, epidermide e derma) hanno infatti dimostrato che i farmaci dapstone, clorotiazide e digossina non sono in grado di permeare in quantità significative (risultati non mostrati). Numerosi dati in letteratura hanno dimostrato che la permeazione in vitro di molecole lipofile è artificialmente impedita se la membrana utilizzata include una consistente parte del derma. Questo tessuto, essenzialmente acquoso, costituisce una importante barriera al passaggio di molecole poco solubili in acqua. Tuttavia, in vivo, la vascolarizzazione della pelle è principalmente localizzata al confine tra epidermide e derma, pertanto il derma non rappresenta una barriera all'assorbimento. Per molecole così lipofile è quindi più realistico utilizzare come membrana la sola epidermide.

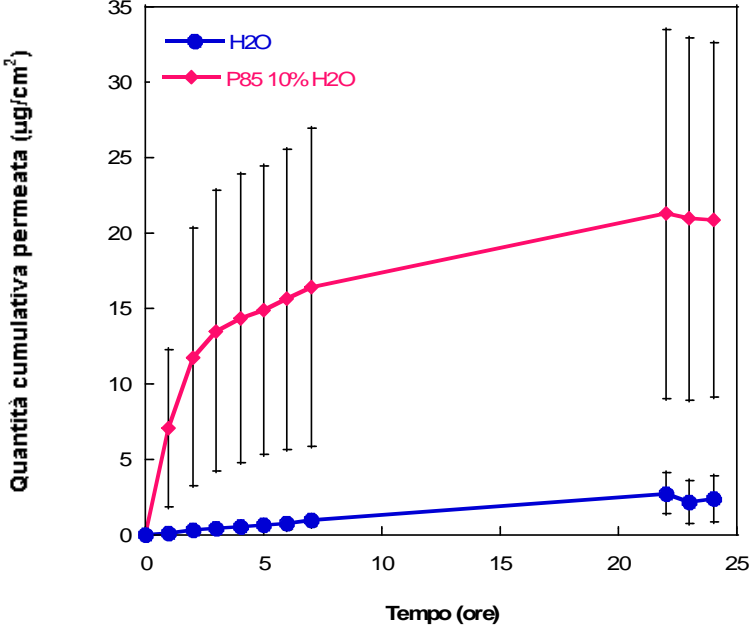
In questo paragrafo sono mostrati i risultati relativi all'influenza dell'incremento di solubilità sulla permeazione transdermica delle tre molecole modello (Fig. 29-30).

Nei grafici riportati in Figura 29 sono rappresentate le quantità cumulative di farmaco (dapstone, figura 27-a, clorotiazide, figura 27-b, digossina, figura 27-c) normalizzate per la

a)



b)



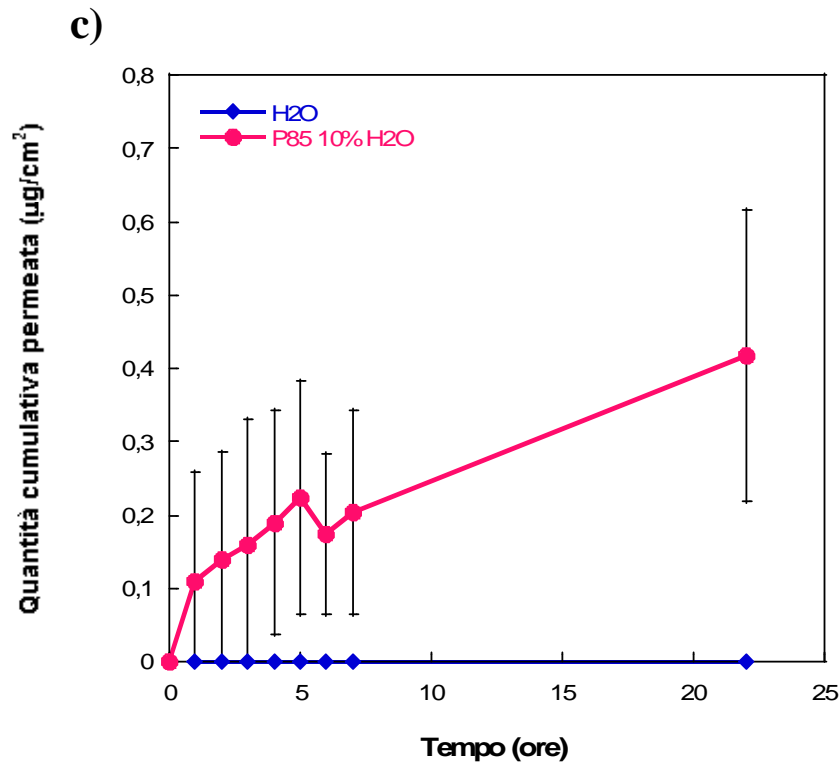
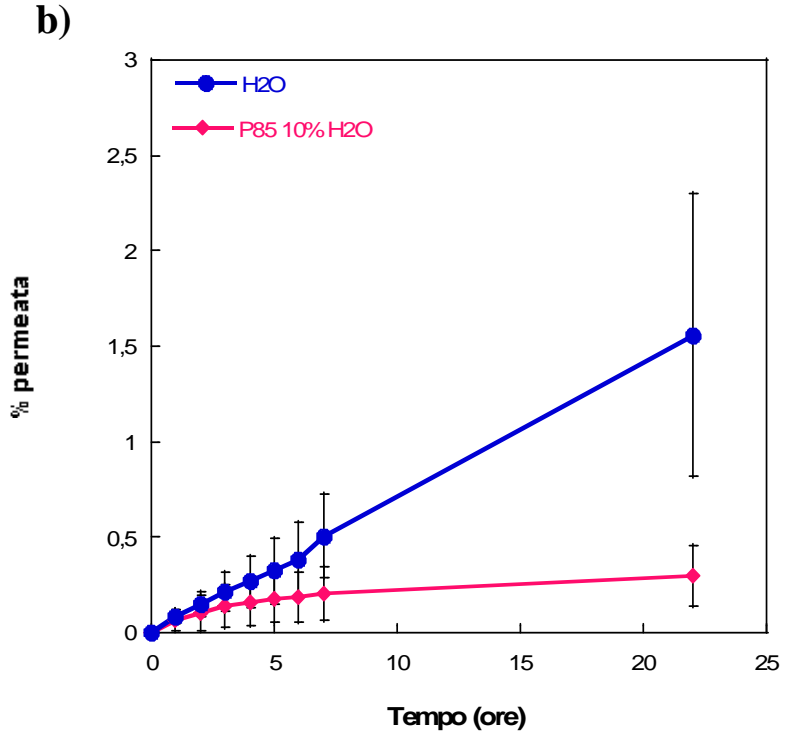
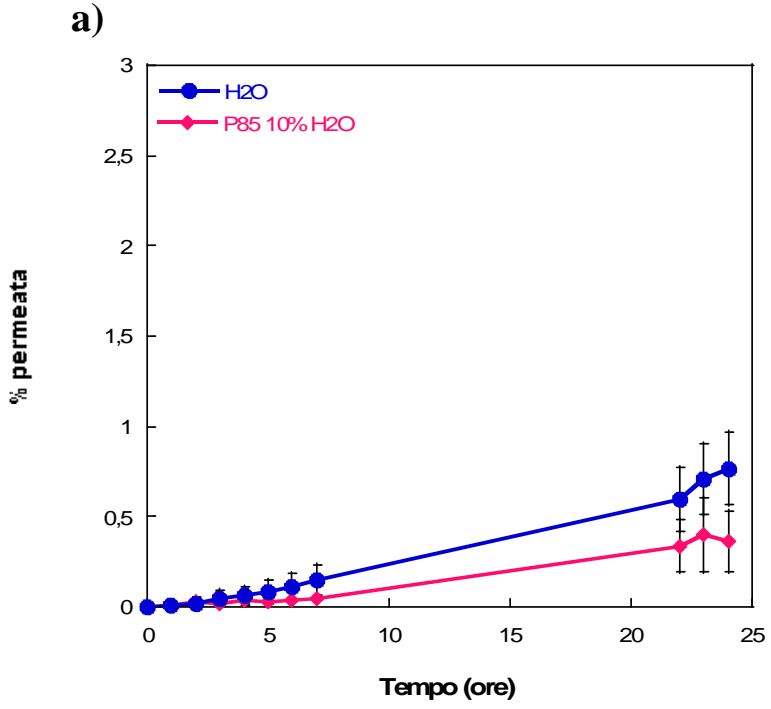


Figura 29. Permeazione ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di dapsone (a), clorotiazide (b) e digossina (c) attraverso l'epidermide suina, a partire da soluzioni sature dei farmaci in acqua in presenza ed in assenza di Pluronic® P85. Medie \pm s.e.m.

superficie di permeazione, in funzione del tempo. Come si può notare da un primo confronto dei tre grafici, le quantità di digossina permeate attraverso l'epidermide sono notevolmente inferiori rispetto alle quantità di dapsone e clorotiazide (si confrontino i valori massimi degli assi delle ordinate).

Per tutti e tre i farmaci, le quantità permeate attraverso l'epidermide sono significativamente maggiori a partire dalle soluzioni preparate in Pluronic® P85 al 10% (p/p).

Dal momento che le soluzioni donatrici erano rappresentate da soluzioni sature dei farmaci e che quindi le quantità di farmaco applicate non erano uguali, sono stati costruiti i grafici che rappresentano la percentuale di farmaco permeata (quantità ritrovata nel compartimento ricevente rispetto alla quantità applicata) in funzione del tempo. Tali grafici sono riportati in Figura 30.



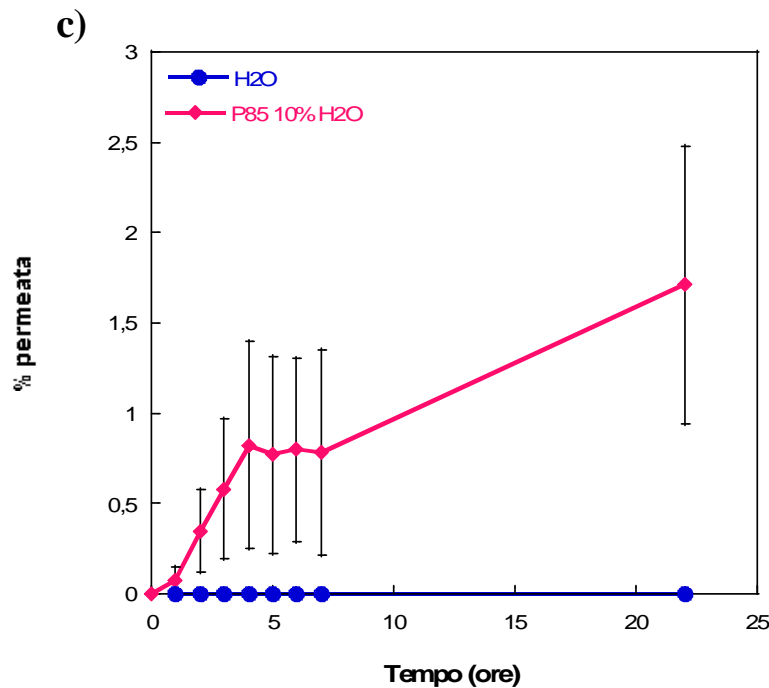


Figura 30. Permeazione (%) di dapsone (a), clorotiazide (b) e digossina (c) attraverso l'epidermide suina, a partire da soluzioni sature dei farmaci in acqua in presenza ed in assenza di Pluronic® P85. Medie \pm s.e.m.

Per quanto riguarda la permeazione del farmaco dapsone (Fig. 30-a) attraverso l'epidermide suina, la presenza di Pluronic® P85 alla concentrazione del 10% in acqua, non ha prodotto un aumento della percentuale di farmaco permeata rispetto alla soluzione acquosa. Anche la permeazione percentuale di clorotiazide (Fig. 30-b) non è incrementata dalla presenza del Polossamero; per questo farmaco la permeazione a partire dalla soluzione acquosa è significativamente maggiore rispetto alla permeazione a partire dalla soluzione contenente Pluronic® P85. Il farmaco digossina (Fig. 30-c) non è in grado di permeare attraverso l'epidermide a partire dalla soluzione acquosa. L'inclusione all'interno di micelle di Pluronic® P85 produce un significativo aumento della permeabilità del farmaco attraverso l'epidermide suina.

Questi risultati possono essere in parte spiegati tramite considerazioni sull'effetto di aumento della solubilità determinato da Pluronic® P85 per ciascun farmaco. Come discusso nel Paragrafo 2 di questo capitolo, la presenza del polimero produce effetti quantitativamente

differenti sulla solubilità di ciascun farmaco: nel caso del dapsona, la presenza del polossamero alla concentrazione del 10% (p/p) è in grado di incrementare la solubilità in acqua del farmaco fino 6 volte, nel caso della clorotiazide la presenza del polimero incrementa la solubilità in acqua del farmaco di circa 5 volte ed infine nel caso della digossina l'aumento di solubilità determinato dalla presenza in soluzione acquosa di Pluronic[®] P85 è pari ad un fattore di circa 2. L'incremento della solubilità dei farmaci determinato dal polimero può essere correlato con la sua capacità di includere la molecola nel *core* micellare. Anche se è stato dimostrato, tramite un calcolo approssimato del volume del *core* delle micelle di polossameri e del volume occupato dal farmaco (Capitolo IV, Paragrafo 2), che tutte e tre le molecole possiedono dimensioni tali da consentire loro di essere contenute nel *core* della micella, l'interazione di una molecola con la porzione idrofobica e la sua ripartizione all'interno della micella sono influenzate da altri fattori quali la geometria molecolare (l'assunzione di una geometria sferica rappresenta una semplificazione), la presenza di stereocentri, la capacità di stabilire interazioni idrofobiche con le catene PO, la presenza di gruppi ossidrilici. Si può ipotizzare pertanto che il minore effetto di incremento della solubilità apportato ad una molecola sia correlabile con una sua inclusione solo parziale all'interno della struttura micellare, o meglio con l'inclusione di un minor numero di molecole di farmaco all'interno del *core*. Questa considerazione consentirebbe di spiegare in parte le differenze nei profili di permeazione ottenuti per i tre farmaci: un farmaco che in presenza di Pluronic[®] P85 mostra un profilo di solubilità significativamente non differente (dapsona) o inferiore (clorotiazide) rispetto a quello ottenuto a partire dalla soluzione acquosa, è più efficientemente incluso nelle micelle di polossamero e pertanto il numero di molecole disponibili per la permeazione attraverso il tessuto è inferiore. Nel caso della digossina, supponendo che la sua inclusione all'interno del *core* micellare sia inferiore o riguardi un numero inferiore di molecole, la permeazione a partire dalla soluzione contenente il polimero risulta essere significativamente maggiore, probabilmente a causa del fatto che un maggior numero di molecole risultano essere disponibili per la permeazione.

Queste supposizioni potrebbero trovare conferma attraverso studi di spettroscopia ¹H NMR accoppiati alla spettroscopia bidimensionale NOESY che consentono di studiare il processo di formazione di micelle [235], il riarrangiamento strutturale di peptidi che interagiscono con micelle [236, 237] e l'interazione farmaco-micella ([238, 239]. In questo tipo di studi vengono confrontati gli spettri dei polimeri in presenza ed in assenza di farmaco ottenuti ad

una concentrazione inferiore alla CMC con quelli ottenuti ad una concentrazione superiore alla CMC. Uno *shift* protonico nello spettro ottenuto ad un valore di concentrazione del polimero superiore alla CMC indica che il gruppo chimico al quale tale protone appartiene va ad inserirsi nel *core* micellare.

Tali studi non sono stati effettuati nella presente ricerca ma potrebbero costituirne un interessante sviluppo.

5. VALUTAZIONE *EX-VIVO* DELLA BIOADESIONE DI POLOSSAMERI ALLA VESCICA URINARIA SUINA

La mucoadesione rappresenta un'importante strategia per l'ottenimento di formulazioni a rilascio controllato di farmaci, sia nell'ambito della somministrazione topica (mantenimento della molecola in contatto con il sito d'azione) sia nell'ambito della somministrazione sistemica (mantenimento della molecola in contatto con il sito di assorbimento).

Le formulazioni mucoadesive sfruttano le proprietà di mucoadesione di polimeri che si legano allo strato di muco mediante forze interfacciali che si sviluppano dopo idratazione, rigonfiamento o completa dissoluzione del polimero. La metilcellulosa, l'idrossietil cellulosa, vari tipi di Carbopol[®] e il chitosano sono definiti come polimeri idrofili mucoadesivi già utilizzati per la somministrazione buccale, orale, vaginale, rettale, nasale e oculare.

Le proprietà mucoadesive dei polossameri (in particolare dei gel termoreversibili di Pluronic[®] F127) sono ampiamente riportate in letteratura; esse sono state illustrate nel paragrafo 2.6.6.

I gel di Pluronic[®] F127 sono stati studiati per applicazioni buccali, rettali, oftalmiche e nasali, ma in letteratura non sono fin'ora descritte applicazioni alla vescica urinaria.

Le proprietà di mucoadesione di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] F68 alla vescica urinaria sono state valutate mediante misura della forza massima di distacco dei polimeri in forma solida dalla mucosa, a vari tempi di contatto ed ad un determinato valore di pressione. La misurazione è stata effettuata con un dinamometro e sono stati inoltre calcolati il lavoro di adesione e la *deformation to failure* (DF) (Paragrafo 2.7.4 cap. III).

5.1 ESPERIMENTI PRELIMINARI

La bioadesione di polimeri alla vescica urinaria non è mai stata studiata in vitro con il metodo del dinamometro. Per questo motivo, sono stati considerati diversi parametri sperimentali riportati come critici in questo tipo di esperimenti effettuati su tessuti mucosali differenti.

Sono stati effettuati esperimenti preliminari per valutare come la temperatura del tessuto e la velocità di distacco della porzione superiore dello strumento possano influenzare le proprietà

bioadesive dei polimeri. Per valutare l'influenza della temperatura, i campioni di tessuto sono stati immersi in tampone PBS a 4°C e fissati al supporto di polistirolo come precedentemente descritto. La temperatura della mucosa di polimero è stata misurata, pochi secondi prima del contatto con la pastiglia, con un termometro digitale (TESTO, GmbH & Co, Lenzkirch, Germania) ed è risultata essere paragonabile alla temperatura ambiente ($19 \pm 4^\circ\text{C}$). Un secondo gruppo di tessuti mucosali è stato immerso in tampone PBS a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e rapidamente fissati al supporto. La temperatura della mucosa, pochi secondi prima del contatto con il polimero, è risultata essere pari a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Questi esperimenti sono stati effettuati con compresse di Pluronic[®] F127 e Carbopol[®] 934.

Per Carbopol[®] 934 a 37°C , anche se il valore di F_{max} non è significativamente differente rispetto a quello ottenuto a temperatura ambiente, il lavoro di adesione è risultato essere significativamente più elevato. I risultati sono mostrati in Tabella XXII. Ciò significa che la *deformation to failure* (DF) è un parametro che occorre prendere in considerazione per l'interpretazione dei risultati: come mostrato in Tabella XXII, DF è significativamente più elevato a 37°C (ANOVA $p < 0.05$). Per Pluronic[®] F127 a 37°C il valore di F_{max} è significativamente più basso rispetto a quello ottenuto a temperatura ambiente, mentre il valore di DF è significativamente più elevato; di conseguenza il valore di WoA non risulta essere significativamente differente. DF è un parametro correlato con la plasticità del processo di adesione [221]; l'aumento della temperatura probabilmente causa una diminuzione nell'elasticità dei polimeri che, per Pluronic[®] F127 può essere spiegata con le sue proprietà di gelificazione termoreversibile. Si sa che per forme di dosaggio solide o parzialmente idratate, la forza del legame tra la superficie mucosale e le catene di polimero è principalmente determinata dal movimento dell'acqua, dalla mucosa verso il polimero allo stato secco (teoria della disidratazione [240]), che non solo consolida il legame, ma conferisce anche plasticità al polimero. Quando un polimero gelifica, l'acqua deve penetrare all'interno di uno strato supplementare idratato (il gel) prima di raggiungere la superficie solida. Per lo stesso tempo di contatto, la quantità di acqua permeata è quindi più bassa, il legame risultante è più debole (minore F_{max}) ed il polimero risulta essere meno elastico (più elevato lavoro di adesione), in confronto ai valori degli stessi parametri ottenuti a temperatura ambiente.

Tabella XXII. Effetti della temperature del tessuto e del tempo di contatto sulla forza di distacco (F_{max}), sul lavoro di adesione (WoA) e sulla Deformation to Failure di differenti polimeri alla vescica urinaria di maiale. Temperatura ambiente. Velocità di distacco: 300 mm/min. Per dettagli sulle differenze statisticamente significative (ANOVA, $p < 0.05$), vd testo.

Tempo di contatto (min)	F_{max} (N \pm s.e.m.)	W o A (mJ \pm s.e.m.)	DF (mm)
<i>Carbopol 934</i>			
5 *	0.68 \pm 0.07	20.43 \pm 6.32 ^b	15.75 \pm 2.75
5	0.59 \pm 0.01 ^c	9.76 \pm 0.57 ^{b,d}	10.67 \pm 1.20
1	0.53 \pm 0.01	7.91 \pm 0.26	7.50 \pm 0.42
3	0.60 \pm 0.10	9.19 \pm 1.38	8.50 \pm 0.00
4	0.61 \pm 0.05	9.48 \pm 0.17	10.67 \pm 0.44
<i>Pluronic[®] F 127</i>			
5 *	0.45 \pm 0.00 ^a	13.39 \pm 1.09	12.67 \pm 0.88
5	0.53 \pm 0.02 ^{a,c}	13.18 \pm 0.97 ^d	9.33 \pm 0.44
<i>Pluronic[®] F 68</i>			
4	0.45 \pm 0.00	8.43 \pm 0.09	6.83 \pm 0.73
5	0.49 \pm 0.01 ^c	11.41 \pm 0.45 ^d	10.83 \pm 0.67
10	0.53 \pm 0.02	11.81 \pm 2.04	10.75 \pm 1.25
15	0.51 \pm 0.07	11.94 \pm 1.50	11.25 \pm 1.25
<i>Chitosano</i>			
3	0.44 \pm 0.01	14.55 \pm 3.16	10.50 \pm 1.63
5	0.49 \pm 0.01	15.94 \pm 1.24	11.33 \pm 0.60
8	0.48 \pm 0.03 ^c	16.45 \pm 1.06 ^d	11.75 \pm 0.75

* 37 C

^{a,b}: differenze statisticamente significative

^c: differenza statisticamente significativa rispetto a Carbopol[®]

^d: differenza statisticamente significativa rispetto a chitosano

Ulteriori esperimenti sono stati condotti variando la velocità di distacco, un parametro strumentale che risulta essere critico per la valutazione della mucoadesione [218].

In Tabella XXIII sono mostrati i risultati degli esperimenti di bioadesione di Carbopol[®] 934 e Pluronic[®] F127 effettuati ad una velocità di distacco della porzione superiore del dinamometro pari a 120 mm/min, a tempi di contatto differenti.

Tabella XXIII. Forza di distacco (F_{max}), lavoro di adesione (WoA) e *Deformation to Failure* (DF) di Carbopol 934 e Pluronic[®] F127 nei confronti della mucosa vescicale di maiale ad una velocità di distacco di 120 mm/min. Temperatura ambiente. Per dettagli sulle differenze statisticamente significative (ANOVA, $p < 0.05$), vd testo.

Contact time (min)	F_{max} (N \pm s.e.m.)	WoA (mJ \pm s.e.m.)	DF (mm)
<i>Carbopol[®] 934</i>			
3	0.46 \pm 0.01	4.93 \pm 0.48	8.30 \pm 0.30
5	0.50 \pm 0.04	6.20 \pm 0.44	6.93 \pm 0.29
10	0.50 \pm 0.00	5.11 \pm 0.43	8.87 \pm 1.86
<i>Pluronic[®] F 127</i>			
3	0.50 \pm 0.05	5.76 \pm 0.23	5.67 \pm 0.37
5	0.45 \pm 0.00	5.49 \pm 0.53	5.33 \pm 0.29
10	0.55 \pm 0.03	7.25 \pm 0.57	5.50 \pm 0.30

I risultati mostrati in Tabella XXIII evidenziano che i valori di F_{max} e WoA per ciascun polimero, ottenuti a 120 mm/min sono significativamente più bassi rispetto a quelli ottenuti a 300 mm/min (Tabella XXII). Una velocità di distacco minore, che influenza le proprietà di mucoadesione di Carbopol[®] 934 alla mucosa gastrica suina, non consente di discriminare il comportamento biadesivo di Pluronic[®] F127 rispetto a quello di Carbopol[®] 934, per gli stessi tempo di contatto.

Ad una velocità di distacco inferiore, il tempo di contatto sembra avere una debole influenza sul valore di F_{max} di Pluronic[®] F127: la forza di distacco del polimero dopo 3 e 5 minuti di

contatto con la mucosa vescicale sono significativamente più basse rispetto a quella ottenuta dopo un tempo di contatto di 10 minuti.

5.2 INFLUENZA DEL TEMPO DI CONTATTO

Negli esperimenti di valutazione della mucoadesione basati sulla misura della forza di distacco riportati in letteratura, i tempi di contatto tra il polimero ed il tessuto appaiono molto differenti. Essi variano dai 10 secondi a diversi minuti, a seconda del tipo di polimero, del modello animale utilizzato e altre condizioni sperimentali quali ad esempio la pre-idratazione del tessuto o il fatto che la forza di adesione venga o meno misurata in un liquido. Tobyn *et al.* [218] hanno studiato l'influenza di alcune condizioni sperimentali e parametri strumentali sui risultati delle valutazioni in vitro delle proprietà mucoadesive di Carbopol[®] 934P sulla mucosa gastrica. Da questo studio è emerso che il tempo di contatto è un parametro critico che influenza significativamente i risultati: un aumento del tempo di contatto conduce ad un significativo aumento nella mucoadesione. In particolare, il lavoro di adesione medio è risultato essere linearmente correlato con il tempo di contatto fino a 2 minuti. Ponchel *et al.* [217] hanno dimostrato che per il modello di tessuto mucosale buccale, l'interpenetrazione tra il muco ed il polimero risulta essere uno dei fattori principali per la determinazione della forza di mucoadesione risultante.

L'influenza del tempo di contatto tra polimeri ed il tessuto vescicale in un esperimento condotto con il dinamometro non è mai stata studiata. Per questo motivo sono stati condotti esperimenti variando il tempo di contatto tra la mucosa vescicale e polimeri mucoadesivi (Carbopol[®] 934 e chitosano), al fine di verificare se esistesse un tempo ottimale per lo stabilirsi delle interazioni tra le due superfici.

Gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente con pastiglie di Carbopol[®] 934, per tempi di contatto di 1,3,4,5 minuti e con pastiglie di chitosano, per tempi di 3,5,8, minuti. I risultati (riportati in Tabella XXII) mostrano che l'aumento del tempo di contatto influenza debolmente la forza di adesione del chitosano alla mucosa vescicale: la F_{max} ottenuta dopo un tempo di contatto di 3 minuti è leggermente inferiore rispetto a quelle ottenute dopo 5 e 8 minuti. Il lavoro di adesione e Df non sembrano essere influenzati dal tempo di contatto.

Per Carbopol[®] 934 il tempo di contatto non influenza nessuno dei parametri misurati. Questo probabilmente significa che per il modello vescicale, l'interpenetrazione tra questo polimero

ed il tessuto (che avviene sostanzialmente quando uno strato di muco è presente sulla mucosa), non costituisce una tappa critica per la determinazione della forza di bioadesione.

La “teoria dell’interpenetrazione”, basata sulla diffusione di catene del polimero verso il muco e delle glicoproteine del muco verso il polimero per gradiente di concentrazione, spiega il consolidamento del legame mucoadesivo con lo stabilirsi di interazioni secondarie che creano un legame stabile in grado di superare le proprietà antiaderenti dello strato di muco stesso [240]. Secondo N’Dow *et al.* [241], la mucosa urinaria umana e quella porcina non possiedono uno strato continuo di muco, che caratterizza ad esempio, il tessuto intestinale; questo potrebbe spiegare il fatto che i parametri di mucoadesione calcolati per chitosano e Carbopol[®] 934 risultano indipendenti dal tempo nel modello mucosale vescicale.

Gli esperimenti successivi sono stati effettuati scegliendo un tempo di contatto di 5 minuti; le proprietà mucoadesive di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] F68 sono state confrontate con quelle di Carbopol[®] 934 e chitosano.

Come si può evincere dai risultati mostrati in Tabella XXII, la forza di adesione di Carbopol[®] è risultata essere significativamente superiore rispetto a quella di Pluronic[®] F68, Pluronic[®] F127 e chitosano, mentre per quanto riguarda il lavoro di adesione il valore del chitosano è significativamente più elevato di quello degli altri tre polimeri. Per Carbopol[®] 934 sia i valori di F_{max} che quello di DF risultano elevati: questo significa che il legame tra il polimero e la superficie mucosale è forte; in altre parole l’intensità del legame tra Carbopol[®] 934 e il tessuto vescicale è sufficientemente elevata per deformare il punto di adesione ed allungare la superficie mucosale oltre il suo punto di riposo. Il lavoro di adesione del chitosano alla mucosa vescicale è significativamente più elevato rispetto a quello di Carbopol[®] 934 anche se il valore di F_{max} è significativamente inferiore e Df non è significativamente differente. La ragione non è del tutto chiara: questo potrebbe essere dovuto ad una differenza nella forma delle curve forza-spostamento, che risulterebbe evidente probabilmente con ulteriori elaborazioni matematiche.

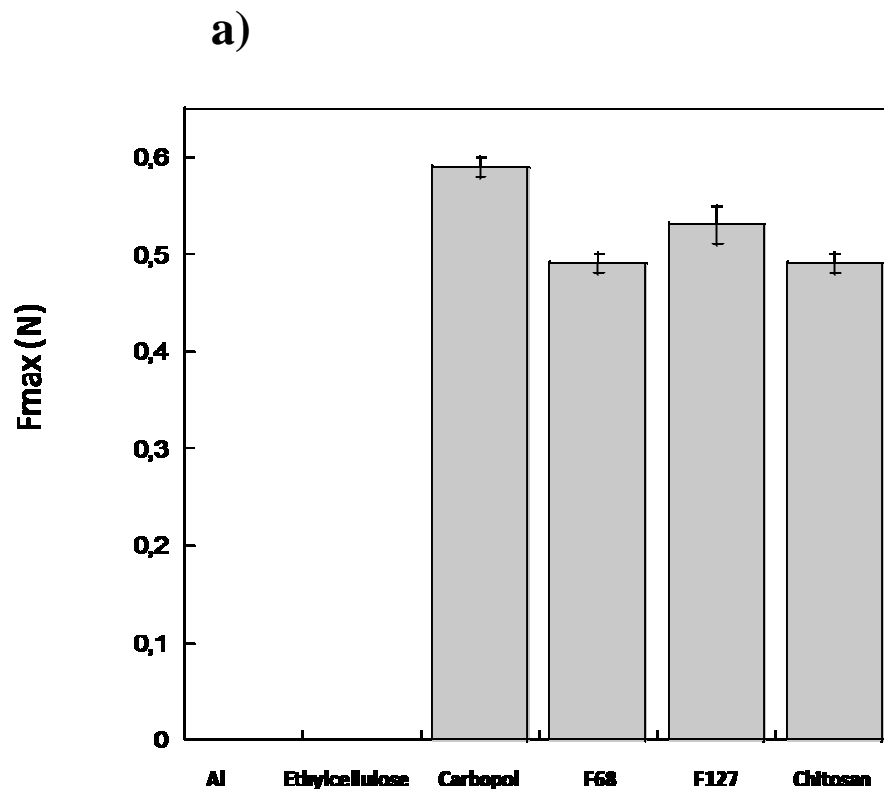
La bioadesione di Carbopol[®] 934 e del chitosano (che appartengono ai cosiddetti “muco adesivi di prima generazione”) alla vescica è attivata dalla presenza di liquido sulla superficie ed è basata sulla formazione di interazioni aspecifiche (legami ad idrogeno) dei gruppi $-COOH$ (Carbopol) e $-OH$ (chitosano) con i gruppi ossidrilici delle mucine. La mucoadesione di gel di chitosano alla mucosa gastrica è stata studiata da Lehr *et al.* [242] ed è principalmente basata su interazioni elettrostatiche.

Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato i polimeri in forma solida ed il pH della superficie mucosale risultava essere attorno a 7.4, valore più elevato rispetto al pKa del chitosano (6.5). Per queste ragioni, presumibilmente il polimero non stabilisce interazioni di tipo elettrostatico con i gruppi solfato dei glicosamminoglicani mucosali.

5.3 PROPRIETÀ MUCOADESIVE DEI POLOSSAMERI

I polossameri mostrano la proprietà peculiare della gelificazione termo reversibile; in particolare il comportamento termo reversibile di Pluronic® F127 è stato ampiamente studiato, su vari tessuti mucosali, mentre per Pluronic® F68 l'utilizzo in forme farmaceutiche per applicazione mucosale è molto limitato.

I valori di F_{max} e lavoro di adesione dei due polossameri alla mucosa vescicale sono stati comparati con quelli di Carbopol® 934 e chitosano (controlli positivi) e a quelli di metilcellulosa ed alluminio (controlli negativi). I risultati sono riportati in Figura 31.



b)

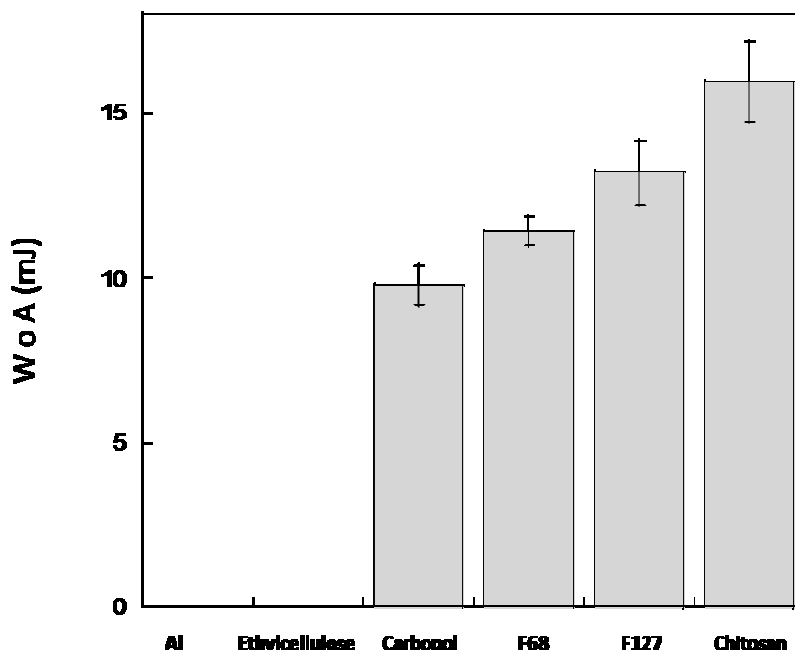


Figura 31. Confronto tra F_{\max} (a) e lavoro di adesione (WoA) (b) di materiali non bioadesivi (alluminio ed etilcellulosa) e polimeri (Carbopol[®] 934, Pluronic[®] F68, Pluronic[®] F127, chitosano) alla vescica urinaria di maiale. Tempo di contatto = 5 minuti, velocità di distacco = 300 mm/min). Media \pm s.e.m. Per dettagli sulle differenze statisticamente significative (ANOVA, $p < 0.05$), vd testo.

I grafici mostrano che i polossameri risultano essere mucoadesivi, se paragonati ad un materiale inerte (alluminio) e ad un polimero inerte (etilcellulosa), i cui valori di F_{\max} (Fig. 31-a) e di lavoro di adesione (Fig. 31-b) sono risultati essere uguali a zero.

La Figura 31-a mostra che la F_{\max} di Carbopol[®] 934 è significativamente più elevata di quelle di Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] F68 e che la F_{\max} di Pluronic[®] F127 è significativamente più elevata di quella di Pluronic[®] F68.

I risultati del lavoro di adesione sono mostrati in Figura 31-b. Il valore ottenuto per il chitosano è significativamente più elevato rispetto a quello ottenuto per i polossameri; il lavoro di adesione di Pluronic[®] F127 è significativamente maggiore rispetto a quello di

Carbopol[®] 934 e sembra essere più elevato rispetto a quello di Pluronic[®] F68, anche se la differenza non è statisticamente significativa.

Possiamo affermare che Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] F68 mostrano proprietà mucoadesive; la loro struttura consiste nella ripetizione di unità polietilene ossido-polipropilene ossido-polietilene ossido (PEO-PPO-PEO) con gruppi ossidrilici terminali, pertanto l'interazione con i gruppi ossidrilici delle catene di mucina è probabilmente basata su legami idrogeno che formano interazioni superficiali deboli (contatto, prima tappa dell'interazione nel processo di mucoadesione). Per valutare se il consolidamento del contatto possa essere meglio spiegato dalla "teoria della disidratazione" o dalla "teoria dell'interpenetrazione" [240], è stata valutata l'influenza di tempi di contatto più lunghi sulla mucoadesione dei Polossameri. Come già menzionato, la "teoria della disidratazione" può spiegare processi di mucoadesione che avvengono molto velocemente, con tempi dell'ordine dei secondi, mentre la "teoria della interpenetrazione" richiede che macromolecole di grandi dimensioni diffondano e penetrino nelle rispettive superfici che li contengono, processo che richiede tempi più lunghi.

La bioadesione di Pluronic[®] F68 è stata valutata per tempi di 4,10 e 15 minuti; è stato scelto questo Polossamero per evitare l'effetto della gelificazione termo reversibile riportato per Pluronic[®] F127. I risultati sono mostrati in Tabella XXII. La F_{max} dopo un tempo di contatto di 4 minuti è significativamente più bassa rispetto al valore dopo 10 e 15 minuti; gli stessi risultati sono stati ottenuti con il lavoro di adesione.

Dal momento che il tempo di contatto sembra avere un effetto sulle proprietà mucoadesive di Pluronic[®] F68, è stato ipotizzato che, dopo la formazione di legami idrogeno, il consolidamento dell'interazione tra il polimero e la superficie mucosale sia probabilmente dovuta alla diffusione del polimero e delle catene di mucina secondo il loro gradiente di concentrazione, con conseguente interpenetrazione delle superfici e formazione di un legame più stabile.

I polossameri sono polimeri non *cross-linked*, si suppone pertanto che la mobilità delle loro catene sia relativamente elevata se paragonata, ad esempio, a quella del Carbopol[®] (polimero *cross-linked*) per il quale, come già affermato, la "teoria della disidratazione" sembra spiegare più correttamente il processo di mucoadesione.

CAPITOLO V

Conclusioni

CAPITOLO V

Conclusioni

La dimensione delle micelle formate da Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] P85 a diversi valori di concentrazione ed in diversi solventi acquosi ha portato a concludere che i polimeri formano strutture micellari di dimensioni complessivamente comprese tra i 16 ed i 30 nm. L'aumento della concentrazione dei polimeri sembra causare una certa diminuzione delle dimensioni micellari. La CMC di Pluronic[®] P85 è risultata essere inferiore rispetto a quella di Pluronic[®] F127. È stato riscontrato inoltre che la presenza di sali o di un farmaco all'interno del solvente influenza il processo di formazione delle micelle di Pluronic[®] P85: i sali esercitano un effetto "salting out" e diminuiscono i valori di CMC, favorendo il processo di micellizzazione, mentre la presenza di un farmaco aumenta i valori di CMC, consentendo la formazione di micelle parziali quando il polimero è sciolto in acqua o in HBSS alla concentrazione del 10%.

I polossameri si sono dimostrati in grado di aumentare significativamente la solubilità dei farmaci dapsona, clorotiazide e digossina, dotati di scarsa solubilità in solventi acquosi (appartenenti rispettivamente, alle classi II, IV e II del sistema BCS). L'aumento della solubilità è risultato essere proporzionale alla concentrazione del polimero. Pluronic[®] P85 alla concentrazione del 10% in HBSS ha prodotto l'aumento più significativo della solubilità di tutti e tre i farmaci. L'aumento della solubilità determinato dai polossameri rispetto alle soluzioni acquose prive dei polimeri è risultato quantitativamente più significativo per dapsona e clorotiazide rispetto a digossina, la cui solubilità risulta essere solamente raddoppiata rispetto a quella in acqua. La ragione è probabilmente da ricercarsi in un maggiore ingombro sterico di questa molecola: essa ha un peso molecolare maggiore rispetto alle altre due e presenta numerosi stereocentri; la sua inclusione all'interno del *core* micellare risulta essere, probabilmente, solo parziale.

La percentuale del farmaco dapsona trasportata attraverso il monostrato cellulare Caco-2 risulta essere inferiore in presenza di polossameri rispetto alla soluzione preparata in tampone. Il dapsona è un farmaco di classe II dotato di discrete caratteristiche di permeabilità, pertanto

il suo trasporto non è significativamente migliorato dall'inclusione nelle micelle. Dal momento che le micelle di polossameri non sono probabilmente in grado di attraversare la membrana, si suppone che il farmaco contenuto all'interno delle micelle risulti essere meno disponibile per il trasporto attraverso il monostrato.

Il calcolo dei coefficienti di permeabilità apparenti di dapsona relativi alle due direzioni di trasporto (apicale verso basolaterale AB e basolaterale verso apicale, BA), ha evidenziato una asimmetria nel trasporto, che risulta essere più importante in senso BA rispetto ad AB. Questo risultato ha portato a formulare l'ipotesi che il farmaco sia substrato di un trasportatore ad efflusso, ma questo dato non è confermato dalla letteratura.

Il trasporto attraverso il monostrato cellulare Caco-2 di clorotiazide, molecola dotata di scarse solubilità e permeabilità, è aumentato in modo significativo dall'inclusione in micelle di Pluronic® P85 al 10% (p/p); l'inclusione in micelle di Pluronic® F127 non ha un effetto significativo sul valore del coefficiente di permeabilità apparente calcolato per il trasporto in direzione AB.

L'inclusione del farmaco clorotiazide all'interno delle micelle di Pluronic® P85 provoca un significativo aumento del trasporto del farmaco in direzione apicale-basolaterale ma non in direzione opposta. Ciò suggerisce che il farmaco sia substrato di una pompa a efflusso e che tale pompa sia probabilmente inibita dai polossameri. Dal momento che Pluronic® P85 risulta essere un inibitore della P-gp, si può pensare che essa sia il trasportatore coinvolto nell'efflusso di clorotiazide, anche se questa ipotesi non è supportata da altri studi riportati in letteratura che classificano questo farmaco come substrato della P-gp.

Anche Pluronic® F127 mostra un effetto di inibizione di una pompa a efflusso, ma tale effetto non è sufficiente per determinare un significativo aumento del P_{app} AB di clorotiazide rispetto al valore ottenuto in HBSS.

Per provare questa ipotesi sarebbe utile effettuare esperimenti di trasporto di clorotiazide in presenza di inibitori specifici delle pompe a efflusso presenti nella membrana apicale del monostrato cellulare Caco-2 oppure effettuare esperimenti di trasporto attraverso il sistema PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*) che consente, attraverso l'eliminazione di tutti i sistemi di trasporto attivo, di studiare la permeazione di molecole solamente mediante il meccanismo della diffusione passiva.

L'inclusione del farmaco digossina all'interno delle micelle di polossameri determina un incremento della percentuale di farmaco trasportata attraverso il monostrato. Tale effetto sembra essere maggiore quando il farmaco è incluso all'interno delle micelle di Pluronic[®] P85; la maggiore lipofilia di questo polossamero rispetto a Pluronic[®] F127 produce anche un maggior incremento di solubilità del farmaco.

Nel caso del trasporto in direzione AB non è stato possibile quantificare il farmaco presente all'interno del compartimento basolaterale, a causa del basso limite di quantificazione del metodo analitico. Nel caso del trasporto in direzione BA è stato possibile quantificare la digossina in entrambi i compartimenti ed è risultato che il trasporto è maggiore a partire dalla soluzione in HBSS rispetto alle due soluzioni contenenti polossameri.

La maggiore quantità di farmaco ritrovata nel compartimento apicale dopo trasporto a partire dalla soluzione in HBSS risulta essere coerente anche con l'ipotesi del blocco della P-gp formulata per Pluronic[®] P85. Il fatto che anche Pluronic[®] F127 mostri un effetto di inibizione sulla pompa a efflusso può suggerire che i polossameri agiscano come inibitori non specifici della P-gp, oppure che la digossina sia substrato di un'altra pompa a efflusso (BCRP, MRP2) presente a livello della parete apicale e che tale pompa sia inibita in maniera non specifica dai polossameri.

Le quantità dei farmaci dapsona, clorotiazide e digossina permeate attraverso l'epidermide a partire dalle soluzioni contenenti Pluronic[®] P85 sono significativamente maggiori rispetto alle quantità permeate a partire dalle soluzioni acquose.

Dal calcolo delle percentuali di farmaco permeate si evince che per i farmaci dapsona e clorotiazide l'inclusione all'interno delle micelle non aumenta significativamente la permeazione transdermica rispetto alla soluzione acquosa. L'inclusione del farmaco digossina in micelle di Pluronic[®] P85 consente al farmaco di permeare (sebbene in quantità molto basse) attraverso l'epidermide, al contrario della soluzione del farmaco preparata in acqua a partire dalla quale il flusso del farmaco risulta essere pari a zero.

La differenza riscontrata per i tre farmaci è probabilmente spiegabile con i già citati risultati di solubilità, che hanno mostrato una più efficiente solubilizzazione (correlabile con una maggiore inclusione all'interno del core delle micelle) da parte di Pluronic[®] P85 nei confronti di dapsona e clorotiazide. Si può supporre che il numero di molecole disponibili per la permeazione sia inferiore rispetto a quello di digossina, molecola inclusa meno

efficientemente all'interno delle micelle, probabilmente per ragioni di geometria ed ingombro sterico. Queste ipotesi potrebbero essere confermate da studi di spettroscopia NMR accoppiata all'analisi bidimensionale NOESY, che consentono di studiare l'efficienza dell'interazione farmaco-micella.

Pluronic[®] F127 e Pluronic[®] F68 hanno mostrato proprietà di bioadesione alla mucosa vescicale paragonabili a quelle di chitosano e Carbopol[®] 934, polimeri già ampiamente utilizzati per le loro proprietà di mucoadesione, utilizzati in questo studio come controlli positivi.

Le proprietà bioadesive dei polossameri hanno dimostrato essere influenzate dalla temperatura e dal tempo di contatto; la dipendenza da questi parametri ha consentito di formulare ipotesi sui meccanismi che sono alla base del processo di bioadesione dei Pluronic[®] alla mucosa vescicale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M.V.S. Varma, S. Khandavilli, Y. Ashokraj, A. Jain, A. Dhanikula, A. Sood, N.S. Thomas, O. Pillai, P. Sharma, R. Gandhi, S. Agrawal, V. Nair and R. Panchagnula, Biopharmaceutic Classification System: a scientific framework for pharmacokinetic optimisation in drug research, *Current Drug Metabolism* 5 (2004) 375-388.
- [2] S. Pinnamaneni, N. Das and S. Das, Formulation approaches for orally administered poorly soluble drugs, *Review, Pharmazie* 57 (2002) 291-300.
- [3] S. Croy and G. Kwon, Polymeric micelles for drug delivery, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 4669-4684.
- [4] G. Amidon, H. Lennernas, V. Shah and J. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res.* 12 (1995) 413-420.
- [5] R. Lobenberg and G. Amidon, New scientific approaches to international regulatory standards, *Eur. J.Pharm.Biopharm.* 50 (2000) 11-23.
- [6] C. Wu and L. Benet, Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharm.Res.* 22 (2005) 11-23.
- [7] C. Pouton, Formulation of poorly water-soluble drug for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system, *Eur.J.Pharm.Sci.* 29 (2006) 278-287.
- [8] V. Levich, *Physicochemical hydrodynamics*, Englewood Cliffs, Prentice Hall, New Jersey (1962).
- [9] D. Hörter and J. Dressman, Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 75-87.
- [10] R. Panchagnula and N.S. Thomas, Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research, *Int. J. Pharm.* 201 (2000) 131-150.
- [11] H. Ansel, N. Popovich and L. Allen, *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*, Williams & Wilkins 6 ed. 109 (1995).

-
- [12] S. Majumdar and a. Mitra, Chemical modifications and formulation approaches to elevated drug transports across cell membranes, *Exp. Opin. Drug Deliv.* 3 (2006) 511-527.
- [13] R.G. Strickley, Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, *Pharm. Res.* 21 (2004) 201-230.
- [14] N. Das and S. Das, Formulation of poorly water soluble drugs, *Drug Delivery Report Spring/Summer* (2006) 52-55.
- [15] B. Aungst, Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism, *J. Pharm. Sci.* 82 (2005) 979-987.
- [16] T. Loftsson, D. Hreinsdottir and M. Masson, Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, *Int. J. Pharm.* 302 (2005) 18-28.
- [17] R. Challa, A. Ahuja, J. Ali and R. Khar, Cyclodextrins in drug delivery: an update review, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6 (2005) E329-E357.
- [18] M. Davis and M. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 1023-1035.
- [19] W. Chiou and S. Riegelman, Pharmaceutical applications of solid dispersions systems, *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 1281-1302.
- [20] C. Leuner and J. Dressman, Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions, *Review, Eur. J.Pharm.Biopharm.* 50 (2000) 47-60.
- [21] A. Serajuddin, Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs., *J. Pharm. Sci.* (1999) 1058-1066.
- [22] A. Spornath and A. aserin, Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals, *Review, Adv. Colloid. Interface Sci.* 128 (2006) 47-64.
- [23] C. Porter, N. Trevaskis and W. Charman, Lipids and lipid-based formulations: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 231-248.
- [24] V. Torchilin, Micellar nanocarrier: pharmaceutical perspectives, *Review, Pharm. Res.* 24 (2007) 1-16.
- [25] M.-C. Jones and J.-C. Leroux, Polymeric micelles- a new generation of colloidal drug carriers, *Eur. J.Pharm.Biopharm.* 48 (1999) 101-111.

- [26] K. Kataoka, A. Harada and T. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterisation and biological significance, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 113-131.
- [27] G. Kwon, Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 20 (2003) 357-403.
- [28] J. Chaumeil, Micronization: a method of improving the bioavailability of poorly soluble drugs, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 20 (1998) 211-215.
- [29] T. Tadros, Principles of emulsion stabilization with special reference to polymeric surfactants, Review, *J. Cosm. Sci.* 57 (2006) 153-169.
- [30] L. Huang and W. Tong, Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 321-334.
- [31] A. Martin and P. Bustamante, *Physical Pharmacy*, Fourth Edition ed., Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1993.
- [32] V. Torchilin, Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems, *J. Control. Release* 73 (2001) 137-172.
- [33] A. Lavasanifar, J. Samuel and G.S. Kwon, Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 169-190.
- [34] S. Jeon, J. Lee, J. Andrade and P. Degennes, Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. Simplified theory., *J. Colloid. Interf. Sci.* 142 (1991) 149-158.
- [35] M. Yokoyama and T. Okano, Targetable drug carriers: present status and future perspective, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 21 (1996) 77-80.
- [36] D. Le Garrec, J. Taillefer, J. Van Lier, V. Lenaerts and J.-C. Leroux, Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model, *J. Drug Target.* 10 (2002) 429-437.
- [37] B. Luppi, I. Orienti, F. Bigucci, T. Cerchiara, G. Zuccari, S. Fazzi and V. Zecchi, Poly(vinylalcohol-co-vinyloleate) for the preparation of micelles enhancing retinyl palmitate transcutaneous permeation, *Drug Deliv.* 9 (2002) 147-152.
- [38] L. Ould-Ouali, A. Arien, J. Rosenblatt, A. Nathan, P. Twaddle, T. Matalenas, M. Borgia, S. arnold, D. Leroy, M. Dinguizili, L. Rouxhet, M. Brewster and V. Preat, Biodegradable self-assembling PEG-Copolymer as vehicle for poorly water soluble drugs, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1581-1590.

-
- [39] G. Gaucher, M.-H. Dufresne, V. Sant, N. Kang, D. Maysinger and J.-C. Leroux, Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery, *J. Contr. Release* 109 (2005) 169-188.
- [40] I.R. Schmolka, Artificial skin, preparation and properties of Pluronic F127 gels for the treatment of burns, *J. Biomed. Mater. Res.* 6 (1972) 571-582.
- [41] D. Le Garrec, S. Gori, L. Luo, D. Lessard, D.C. Smith, M.-A. Yessine, M.M. Ranger and J.-C. Leroux, Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo evaluation, *J. Contr. Release* 99 (2004) 83-101.
- [42] L. Van Zuylen, J. Verweij and A. Sparreboom, Role of formulation vehicles in taxane pharmacology, *Invest. New Drugs* 19 (2001) 125-141.
- [43] G. Barratt, Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 21-37.
- [44] S.M. Moghimi, Modulation of lymphatic distribution of subcutaneously injected poloxamer 407-coated nanospheres: the effect of the ethylene oxide chain configuration, *FEBS Lett.* 540 (2003) 241-244.
- [45] A.H. Dantzig, D.P. de Alwis and M. Burgess, Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 133-150.
- [46] T.M. Fahmy, P.M. Fong, A. Goyal and W.M. Saltzman, Targeted drug delivery, *Mater. Today* 8 (2005) 18-26.
- [47] E.V. Batrakova, S. Li, Y. Li, V.Y. Alakhov, W.F. Elmquist and A.V. Kabanov, Distribution kinetics of a micelle-forming block copolymer Pluronic P85, *J. Contr. Release* 100 (2004) 389-397.
- [48] C.O. Rangel Yagui, A. Pessoa Jr and L. Costa Tavares, Micellar solubilization of drugs, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 8 (2005) 147-163.
- [49] S.M. Moghimi and A.C. Hunter, Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine, *TIBTECH* 18 (2000) 412-420.
- [50] H.M. Aliabadi and A. Lavasanifar, Polymeric micelles for drug delivery, *Exp. Opin. Drug Deliv.* 3 (2006) 571-582.

-
- [51] E.V. Batrakova and A.V. Kabanov, Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers, *J. Contr. Release* 130 (2008) 98-106.
- [52] J.Z. Krezanoski. 4, U.S. 1980.
- [53] L. Reeve. in (Domb, A., Kost, Y. and Wiseman, D., eds.) *Handbook of biodegradable polymers, Drug targeting and delivery*, Harwood academic Publishers, London, Great Britain 1997, pp. 231-249.
- [54] Y. Cao, A. Rodriguez, M. Vacanti, C. Ibarra, C. Arevalo and C.A. Vacanti, Comparative study of the use of poly(glycolic acid) calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.9* (1998) 475-487.
- [55] A. Sosnik and M.V. Sefton, Semi-synthetic collagen/poloxamine matrices for Tissue Engeneering of autologous porcine cartilage, *Biomaterials* 26 (2005) 7425-7435.
- [56] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova and V.Y. Alakhov, Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Contr. Release* 82 (2002) 189-212.
- [57] L.E. Bromberg and E.S. Ron, Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 31 (1998) 197-221.
- [58] A.V. Kabanov and V.Y. Alakhov, Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 19 (2002) 1-72.
- [59] A.H. Kibe. in (Association, A.P., ed.), Washington, DC 2000, pp. 386-388.
- [60] United states Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville 2002, pp. 2593-2595.
- [61] I. Oh, K. Lee and S.-C. Shin, Fluorescence spectroscopy studies on micellization of Poloxamer 407 solutions, *Arch. Pharm. Res.* 26 (2003) 653-658.
- [62] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova and V.Y. Alakhov, Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for oral and gene delivery, *J. Contr. Release* 82 (2002) 189-212.
- [63] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth and T.A. Hatton, Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblocks copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules* 27 (1994) 2414-2425.

-
- [64] P. Alexandridis, V. Athanassiou, S. Fukuda and T.A. Hatton, Surface activity of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers, *Langmuir* 10 (1994) 2604-2612.
- [65] G. Wanka, H. Hoffman and W. Ulbricht, Phase diagrams and aggregation behavior of poly(ethylene oxide)- poly(propylene oxide)- poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions, *Macromolecules* 27 (1990) 4115-4159.
- [66] Y.-L. Su, H.-Z. Liu, C. Guo and J. Wang, Association behavior of PEO-PPO-PEO block copolymers in water or organic solvent observed by FTIR spectroscopy, *Molecular simulation* 29 (2000) 803-808.
- [67] P. Alexandridis and H. T.A., Poly(ethylene oxide)- Poly(propylene oxide)- Poly(ethylene oxide) block copolymer in aqueous solutions and interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloid. Surfaces: A* 96 (1995) 1-46.
- [68] N.J. Jain, V.K. Aswal, P.S. Goyal and P. Bahadur, Micellar structure of an ethylene oxide-propylene oxide block copolymer: a small-angle neutron scattering study, *J.Phys. Chem. B* 102 (1998) 8452-8458.
- [69] N.J. Jain, V.K. Aswal, P.S. Goyal and P. Bahadur, Salt induced micellization and micelle structures of PEO/PPO/PEO block copolymers in aqueous solutions, *Coll. Surfaces A* 173 (2000) 85-94.
- [70] O.V. Elisseeva, N.A.M. Besseling, L.K. Koopal and M.A. Cohen Stuart, Influence of NaCl on the behaviour of PEO-PPO-PEO triblock copolymers in solution, at interfaces, and in asymmetric liquid films, *Langmuir* 21 (2005) 4954-4963.
- [71] K. Nakashima and P. Bahadur, Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: recent trends, *Adv. Colloid. Interface Sci.* 123-126 (2006) 75-96.
- [72] K. Patel, P. Bahadur, C. Guo, J.H. Ma, H.-Z. Liu, A. Yamashita, A. Khanal and K. Nakashima, Salt induced micellization of very hydrophilic PEO-PPO-PEO block copolymers in aqueous solutions, *Eur. Polym. J.* (in press).
- [73] J.P. Mata, P.R. Majhi, C. Guo, H.Z. Liu and P. Bahadur, Concentration, temperature, and salt-induced micellization of a triblock copolymer Pluronic L64 in aqueous media, *J.Colloid. Interf. Sci.* 292 (2005) 548-556.
- [74] M. Malmsten and B. Lindman, Self-assembly in aqueous block copolymer solutions, *Macromolecules* 25 (1992) 5440-5445.

-
- [75] N. Pandit and J. Kisaka, Loss of gelation ability on Pluronic F127: micellar assembly, gelation and partitioning, *Int. J. Pharm.* 145 (1996) 129-136.
- [76] P. Alexandridis, V. Athanassiou and T.A. Hatton, Pluronic-P105 PEO-PPO-PEOblock copolymer in aqueous urea solutions: micelle formation, structure, and microenvironment, *Langmuir* 11 (1995) 2442-2450.
- [77] L. Jiang, Y.-Y. Zheng and J.-x.-Q. Zhao, Effect of phenol on micellization of Pluronic block copolymer F127 and solubilization of anthracene in the micelle, *Fine Chemicals* 18 (2001) 731-735.
- [78] F. Hecht and H. Hoffman, Interaction of ABA block copolymers with ionic surfactants in aqueous solution, *Langmuir* 10 (1994) 86-91.
- [79] P.R. Desai, N.J. Jain, R.K. Sharma and P. Bahadur, Effects of additives on micellization of PEO/PPO/PEO block copolymer F127 in aqueous solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. aspects* 178 (2001) 57-69.
- [80] P.K. Sharma and S.R. Bhatia, Effect of anti-inflammatories on Pluronic F127: micellar assembly, gelation and partitioning, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 361-377.
- [81] I. Pepic, N. Jalsenjak and I. Jalsenjak, Micellar solutions of triblock copolymer surfactants with pilocarpine, *Int. J. Pharm.* 272 (2004) 57-64.
- [82] J. Armstrong, B. Chowdry, J. Mitchell, A. Beezer and S. Leharne, Effect of cosolvents and cosolutes upon aggregation transitions in aqueous solutions of poloxamer F87 (poloxamer P237): a high sensitivity differential scanning calorimetry study, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 1738-1745.
- [83] A. Caragheorghopol, H. Caldararu, I. Dragutan, H. Joela and W. Brown, Micellization and micellar structure of a poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide)/poly(ethylene oxide) triblock copolymer in water solution, as studied by the spin probe technique, *Langmuir* 13 (1997) 6912-6921.
- [84] Y.-L. Su, X.-F. Wei and H.-Z. Liu, Influence of 1-pentanol on the micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers in aqueous solutions, *Langmuir* 19 (2003) 2995-3000.
- [85] C.S. Yong, J. Choi, Q.Z. Quan, J.D. Rhee, C.K. Kim, S.J. Lim, K.M. Kim, P.S. Oh and H.G. Choi, Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium, *Int. J. Pharm.* 226 (2001) 195-205.

- [86] R. Nagarajan, Solubilization of "guest" molecules into polymeric aggregates, *Polym. Adv. Tech.* 12 (2001) 23-43.
- [87] G. Riess, Micellization of block copolymers, *Prog. Polym. Sci* 28 (2003) 1107-1170.
- [88] I.F. Paterson, B.Z. Chowdry and S.A. Leharne, Investigations of naphthalene solubilization in aqueous solutions of ethylene oxide-b-propylene oxide-b-ethylene oxide copolymers, *Lagmuir* 15 (1999) 6187-6194.
- [89] N. Rapoport, Stabilization and activation of Pluronic micelles for tumor-targeted drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 16 (1999) 93-111.
- [90] J. Rodriguez-Hernandez, F. Chécot, Y. Gnanou and S. Lecommandoux, Toward "smart" nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution, *Prog. Polym. Sci* 30 691-724.
- [91] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova and V.Y. Alakhov, Pluronic Block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Contr. Release* 82 (2002) 189-212.
- [92] V.Y. Alakhov, E.Y. Moskaleva, E.V. Batrakova and A.V. Kabanov, Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 block copolymer, *Bioconjug. Chem.* 7 (1996) 209-216.
- [93] V.Y. Alakhov, E. Klinski, S. Li, G. Pietrzynski, A. Venne, E.V. Batrakova, T. Bronitch and A.V. Kabanov, Block copolymer based formulations of doxorubicin. From cell screen to clinical trials, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 16 (1999) 113-134.
- [94] E.V. Batrakova, S. Lee, S. Li, A. Venne, V.Y. Alakhov and A.V. Kabanov, Fundamental relationships between the composition of Pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1373-1379.
- [95] E.V. Batrakova, S. Li, S. Vinogradov, V.Y. Alakhov, D. Miller and A.V. Kabanov, Mechanism of Pluronic effect on P-glycoprotein efflux-system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299 (2001) 483-493.
- [96] G. Dumortier, J.L. Grossiord, M. Zuber, G. Couarraze and J.C. Chaumeil, Thermoreversible morphine gel, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17 (1991) 1255-1265.
- [97] T. Moore, S. Croy, S. Mallapragada and N. Pandit, Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F127 gel dissolution, drug release in stirred systems, *J. Control. Release* 67 (2000) 191-202.

- [98] P. Chen-Chow, Drug release from Pluronic F127 gels, *Diss. Abstr. Int.* 340 (1980) 4751.
- [99] J. Rassing, W. Mackenna, S. Bandopadhyay and E. Eyring, Ultrasonic and ¹³C-nmr studies in gel formation in aqueous solutions of the ABA block polymer Pluronic F127, *J. Mol. Liquid.* 27 (1984) 165-178.
- [100] C. Charrueau, C. Tuleu, V. Astre, J.L. Grossiord and J.C. Chaumeil, Poloxamer 407 as thermogelling and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids, *Dug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 351-357.
- [101] J.M. Ryu, S.J. Chung, M.H. Lee, C.K. Kim and C.K. Shim, Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquis duppositoires in the rectum, *J. Contr. Release* 59 (1999) 163-172.
- [102] H. Choi, M. Lee, M. Kim and C. Kim, Effect of additives on the pyisicochemical properties of liquid suppository bases, *Int. J. Pharm.* 190 (1999) 13-19.
- [103] J.Y. Chang, Y.K. Oh, H.G. Choi, Y.B. Kim and C.K. Kim, Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 155-163.
- [104] A. Shawesh, S. Kallionem, O. Antikainen and J. Yliruusi, Influence of storage time and temperature on the stability of indomethacin Pluronic F-127 gels, *Pharmazie* 57 (2002) 690-694.
- [105] A.A. Koffi, F. Agnely, G. Ponchel and J.L. Grossiord, Modulation on the rheological and mucoadhesive properties of hermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine, *Eur. J.Pharm.Sci.* 27 (2006) 328-335.
- [106] K. Edsman, J. Carlfors and R. Petersson, Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophtalmic use, *Eur. J.Pharm.Sci.* 6 (1998) 105-112.
- [107] G. Wei, H. Xu, P.T. Ding, S.M. Li and J.M. Zheng, Thertmosetting gels with modulated gelation temperature for ophtalmic use, the rheological and gamma scintigraphic studies, *J. Control. Release* 83 (2002) 65-74.
- [108] A.M. Le Ray, P. Iooss, A. Gouyette, V. Vonarx, T. Patrice and C. Merle, Development of a "continuous-flow adhesion cell" for the assessment of hydrogel adhesion, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 897-904.
- [109] E.Y. Kim, Z.G. Gao, J.S. Park, H. Li and K. Han, rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophtalmic delivery, *Int. J. Pharm.* 233 (2002) 159-167.

- [110] A.M. El Gendy, H.W. Yun and A.A. Kassem, In vitro release studies of flubiprofen from different topical formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 823-831.
- [111] M.L. Veyries, G. Couarraze, S. Geiger, F. Agnely, L. Massias, B. Kunzli and F. Faurisson, Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels, *Int. J. Pharm.* 192 (1999) 183-193.
- [112] R.M. Nalbandian, R.L. Henry and H.S. Wilks, Artificial skin II. Pluronic F127 silver nitrate or silver lactate gel in the treatment of thermal burns, *J. Biomed. Mater. Res.* 6 (1972) 583-590.
- [113] S. Miyazaki, T. Tobiyama, M. Takada and D. Attwood, Percutaneous absorption of indomethacin from Pluronic F127 gels in rats, *J. Pharm. Pharmacol* 47 (1995) 455-457.
- [114] Y.Y. Wang, C.T. Hong, W.T. Chiu and J.Y. Fang, In vitro and in vivo evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels, *Int. J. Pharm.* 224 (2001) 1-2.
- [115] A.F. Kattan El, C.S. Asbull, N. Kim and B.B. Micniak, Effect of formulation variables on the percutaneous permeation of ketoprofen from gel formulations, *Drug Deliv.* 7 (2000) 3.
- [116] S.C. Chi, K. Do, H.K. Tan and H.W. Chun. United States 1996.
- [117] J.Y. Fang, Y.L. Leu, Y.Y. Wang and Y.H. Tsai, In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model, *Eur. J. Pharm. Sci.* 15 (2002) 417-423.
- [118] S.C. Shin, C.W. Cho and I.J. Oh, Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins, *Int. J. Pharm.* 222 (2001) 199-203.
- [119] J. Liaw and Y.C. Lin, Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl, *J. Control. Release* 68 (2000) 273-282.
- [120] J.J. Escobar-Chavez, D. Quintanar-Guerrero and A. Ganem-Quintanar, In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in P-F27 gels: effect of Azone and Transcutol, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31 (2005) 447-454.
- [121] V.Y. Erukova, O.O. Krylova, Y.N. Antonenko and N.S. Melik-Nubarov, Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer

- lipid membranes to small solutes including doxorubicin, *Biochim. Biophys. Acta* 1468 (2000) 73-86.
- [122] O. Pillai and R. Pachagnula, Transdermal delivery of insulin from poloxamer gel: ex vivo and in vivo skin permeation studies in rat using iontophoresis and chemical enhancers, *J. Control. Release* 89 (2003) 127-140.
- [123] V. Nair and R. Pachagnula, Poloxamer gel as a vehicle for transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin: evaluation of in vivo performance n rats, *Pharmacol Res* 47 (2003) 555-562.
- [124] L. Zhang, D.L. Parson, C. Navarre and U.B. Kompella, Development and in vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P07) gel formulations of ceftiofur, *J. Control. Release* 85 (2002) 73-81.
- [125] T. Kadar, E. Fishbeine, Y. Meshulam, R. Sahar, S. Chapman, S. Liani, I. Barnes and A. Amir, Treatment of skin injuries induced by sulfur mustard with calmodulin antagonists, using the pig model, *J. Appl. Toxicol. Suppl.* 1 (2000) 133-136.
- [126] E.B. Fowler, M.F. Cuenin, S.D. Hokett, M.E. Peacock, J.C. McPherson 3rd, T.R. harawy and M.A. Billman, Evaluation of Pluronic polyols as carriers for grafting materials: stdy in rat calvaria defects, *J. Periodontol.* 73 (2002) 191-197.
- [127] R. Nalbandian, R. Henry, K. Balko, D. Adams and N. Neuman, Pluronic F127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs, *J. Biomed. Mater. Res.* 21 (1987) 1135-1148.
- [128] M.D. Di Biase and C.T. Rhodes, Investigations of epidermal growth factor in semisolid formulations, *Pharm. Acta Helv.* 66 (1991) 165-169.
- [129] S.-C. Shin and J.Y. Kim, Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000).
- [130] M. Morishita, J.M. Barrichello, K. Takayama, Y. Chiba, S. Tokiwa and T. Nagai, Pluronic F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin, *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 289-293.
- [131] L. Bourre, S. Thibaut, S. Lajat, A. Briffaud and T. Patrice, Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid thermosetting gel formulation for use of photodynamic therapy of lesions of gastrointestinal tract, *Pharmacol. Res* 45 (2002) 159-165.

-
- [132] S. Miyazaki, S. Takeuchi, C. Yokouchi and M. Takada, Pluronic F-127 gels as vehicles for topical administration of anticancer agents, *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 4205-4208.
- [133] J. Gilbert, J. Hadgraft, A. Bye and L. Brookes, Drug release from Pluronic F-127 gels, *Int. J. Pharm.* 32 (1986) 223-228.
- [134] M. DiBiase and C. Rhodes, Formulation and evaluation of Epidermal growth factor in Pluronic F127 gels, *Drug. Develop. Ind. Pharm.* 22 (1996) 823-831.
- [135] F. Fawaz, A. Koffi, M. Guyot and P. Pillet, Comparative in vitro-in vivo study of two quinine rectal gel formulations, *Int. J. Pharm.* 280 (2004) 151-162.
- [136] S.D. Desai and J. Blanchard, Pluronic F-127 based ocular delivery system containing biodegradable polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules of pilocarpine, *Drug Deliv.* 7 (2000) 201-207.
- [137] P. Wuthrich, M. Martenet and P. Buri, Effect of formulation additives upon the intranasal bioavailability of a peptide drug, tetracosactide (ACTH1-24), *Pharm. Res.* 11 (1994) 278-282.
- [138] J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama and T. Nagai, Absorption of insulin from Pluronic F127 gels following subcutaneous administration in rats, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 189-198.
- [139] J.G. Wenzel, K.S. Balaji, K. Koushik, C. Navarre, S. Duran, C.H. Rahe and U.B. Kompella, Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle, *J. Contr. Release* 85 (2002) 51-59.
- [140] M.M. Amiji, P.K. Lai, D.B. Shenoy and M. Rao, Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation, *Pharm. Dev. Technol* 7 (2002) 195-202.
- [141] I. Paavola, J. Kilpelainen, P. Ylirussi and H. Rosenberg, Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesics, *Int. J. Pharm.* 199 (2000) 85-93.
- [142] P.W. Paustin, J.C. McPherson, R.R. Haase, R.R. Runner, K.M. Plowman, D.F. Ward, N. T.H and J.C. McPherson 3rd, Intravenous Pluronic F-127 in early burn wound treatment in rats, *Burns* 19 (1993) 187-191.
- [143] J. Raymond, A. Metcalfe, I. Salazkin and A. Schwartz, Temporary vascular occlusion with Poloxamer 407, *Biomaterials* 25 (2004) 3983-3989.

-
- [144] M. Varshney, T.E. Morey, D.O. Shah, J.A. Flint, B.M. Moudgil, C.N. Seubert and D.M. Dennis, Pluronic microemulsions as nanoreservoirs for extraction of bupivacaine from normal saline, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5108-5112.
- [145] S.D. Hokett, M.F. Cuenin, R.B. O'Neal, W.A. Brennan, S.L. Strong, R.R. Runner, J.C. McPherson 3rd and T.E. Van Dyke, Pluronic polyol effects on human gingival fibroblast attachment and growth, *J. Periodontol.* 71 (2000) 803-809.
- [146] S.M. Moghimi, Re-establishing the long circulatory behaviour of poloxamine-coated particles after repeated intravenous administration, applications in cancer drug delivery and imaging, *Biochim. Biophys. Acta* 1472 (1999) 399-403.
- [147] E. Dimitrova, S. Bogdanova, M. Mitcheva, I. Tanev and E. Minkov, Development of model aqueous ophtalmic solutions of indomethacin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 1297-1301.
- [148] E.J. Ricci, Lunardi, D.M. Nanclares and J.M. Marchetti, Sustained release of lidocaine from poloxamer 407 gels, *Int. J. Pharm.* 288 (2005) 235-244.
- [149] E.A. Pec, Z.G. Wout and T.P. Johnston, Biological activity of urease formulated on poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 626-630.
- [150] T.P. Johnston and W.K. Palmer, Effect of Poloxamer 407 on the activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29 (1997) 580-585.
- [151] T.P. Johnston and S.C. Miller, Inulin disposition following intramuscular administration of an inulin/poloxamer gel matrix, *J. Parenter. Sci. Tech.* 43 (1989) 279-286.
- [152] R.W. Johnston, E. Cretney and M.J. Smyth, P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase dependent, but not caspase independent, cell death, *Blood* 93 (1999) 1075-1085.
- [153] C. Li, W.K. Palmer and T.P. Johnston, Disposition of Poloxamer 407 in rats following a single intraperitoneal injection assessed using a simplified colorimetric assay, *J. Pharm. Biomed. anal* 14 (1996) 659-665.
- [154] T. Abe, M. Sasaki, H. Nakajima, M. Ogita, H. Naitou, A. Nagase, K. Taguchi and S. Miyazaki, Evaluation of Pluronic F127 as a base for gradual release of anticancer drug, *Gan To Kagaku Ryoho* 17 (1990) 1546-1550.

-
- [155] T.P. Johnston and S.C. Miller, Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intra-muscular use, *J. Parenter. Sci. Tech.* 39 (1985) 83-88.
- [156] S. Naito, A. Yokomizo and H. Koga, Mechanism of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma, *Int. J. Urol.* 6 (1999) 427-439.
- [157] N. Kroger, W. Achterrath, S. Hegewisch-Becker, K. Mross and A.R. Zander, Current options in treatment of anthracycline-resistant breast cancer, *Cancer Treat. Rev.* 25 (1999) 279-291.
- [158] J.P. Marie and O. Legrand, MDR1/PGP expression as a prognostic factor in acute leukemias, *Adv. Exp. Med. Biol.* 457 (1999) 1-9.
- [159] S.B. Kaye, Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumours and strategies for circumvention, *Curr. Opin. Oncol. Suppl.* 1 (1998) S15-S19.
- [160] A. Venne, S. Li, R. Mandeville, A.V. Kabanov and V.Y. Alakhov, Hypersensitizing effect of Pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells, *Cancer Res.* 56 (1996) 3626-3629.
- [161] A. Krishan, C.M. Fitz and I. Andritsch, Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells, *Cytometry* 29 (1997) 279-285.
- [162] H.W. van Veen and W.N. Konings, Multidrug transport from bacteria to man: similarities in structure and function, *Semin. Cancer Biol.* 8 (1997) 183-191.
- [163] M. Kuwano, S. Toh, T. Uchiumi, H. Takano, K. Kohono and M. Wada, Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance, *Anticancer Drug Des.* 14 (1999) 123-131.
- [164] P. Borst, R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds, The multidrug resistance protein family, *Biochim. Biophys. Acta* 1461 (1999) 347-357.
- [165] B.L. Lum, M.P. Gosland, S. Kaubisch and S. B.I, Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene, *Pharmacotherapy* 13 (1993) 88-109.
- [166] G.J. Zaman, Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7690-7694.
- [167] P.R. Twentyman, Transport proteins in drug resistance: biology and approaches to circumvention, *J. Intern. Med.* (1997) 133-137.

- [168] N. Altan, Y. Chen, M. Schindler and S.M. Simon, Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy, *J.Exp. Med.* 187 (1998) 1583-1598.
- [169] Z. Ouar, R. Lacave, M. Bens and A. Vandewalle, Mechanisms of altered sequestration and efflux of chemotherapeutic drugs by multidrug-resistance cells, *Cell. Bio. Toxicol.* 15 (1999) 91-100.
- [170] R.L. Schechter, M.A. Alaoui-Jamali and G. Batist, Gluthathione S-transferase in chemotherapy resistance and in carcinogenesis, *Biochem. Cell. Biol.* 70 (1992) 349-353.
- [171] S.L. Gerson and J.K. Willson, O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. A target for the modulation of drug resistance, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9 (1995) 431-450.
- [172] L.C. Erickson, The role of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) in drug resistance and strategies for inhibition, *Semin. Cancer Biol.* 2 (1991) 257-265.
- [173] R. Haq and B. Zanke, Inhibition of apoptotic signaling pathways in cancer cells as a mechanism of chemotherapy resistance, *Cancer Metastasis Rev.* 17 (1998) 233-239.
- [174] E.V. Batrakova, Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity, *Br. J. Cancer.* 74 (1996) 1545-1552.
- [175] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova and V.Y. Alakhov, Pluronic block copolymer for overcoming drug resistance in cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 759-779.
- [176] E.V. Batrakova, D. Miller, S. Li, V.Y. Alakhov, A.V. Kabanov and W.F. Elmquist, Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: in vitro and in vivo studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296 (2001) 551-557.
- [177] G. Szakacs, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe and M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 219-234.
- [178] R. Regev, H. Katzir, D. Yeheskely-Hayton and G.D. Eytan, Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by acceleration of passive drug permeation across the plasma membrane, *FEBS J.* (2007) 6204-6214.
- [179] E.V. Batrakova, V.Y. Alakhov, D. Miller and A.V. Kabanov, Optimal structure requirements for Pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 (2003) 845-854.

- [180] T. Minko, E.V. Batrakova, S. Li, Y. Li, R.I. Pakunlu, V.Y. Alakhov and A.V. Kabanov, Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug resistance cancer cells, *J. Contr. Release* 105 (2005) 269-278.
- [181] E.V. Batrakova, S. Li, V.Y. Alakhov, W.F. Elmquist, D. Miller and A.V. Kabanov, Sensitization of cells overexpressing multidrug-resistant proteins by Pluronic P85, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1581-1590.
- [182] E.V. Batrakova, D.L. Kelly, S. Li, Y. Li, Z. Yang, L. Xiao, D.Y. Alakhova, S. Sherman, V.Y. Alakhov and A.V. Kabanov, Alteration of genomic responses to doxorubicin and prevention of MDR in breast cancer cells by a polymer excipient: pluronic P85, *Mol. Pharm.* 3 (2006) 113-123.
- [183] P. Lemieux, N. Guerin, G. Paradis, R. Proulx, L. Chistyakova, A.V. Kabanov and V.Y. Alakhov, A combination of polxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle, *Gene Ther.* 7 (2000) 986-991.
- [184] J. Madara and J. Trier. in (Johnson, L.R., ed.) *Physiology of the gastrointestinal tract*, Raven Press, New York 1986, pp. 1209-1250.
- [185] P. Shah, V. Jogani, T. Bagchi and A. Misra, Role of Caco-2 cells monolayers in prediction of intestinal drug absorption, *Review, Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 186-198.
- [186] P. Artrusson and J. Karlsson, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (1991) 880-885.
- [187] <http://www.uclouvain.be/en-33281.html> (Luglio 2007)
- [188] M.-C. Gres, B. Julian, M. Bourrie, V. Meunier, C. Roques, M. Berger, B. X, Y. Berger and G. Fabre, Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-/ cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line, *Pharm. Res.* 15 (1998) 726-733.
- [189] P. Artrusson, K. Palm and K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 27-43.
- [190] Y. Sambuy, I. De angelis, G. Ranaldi, M.-L. Scarino, A. Stammati and F. Zucco, The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on caco-2 cell functional characteristics, *Cell. Biol. Toxicol.* 21 (2005) 1-26.

-
- [191] C. Lipinski, F. Lombardo, B. Dominy and P. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 3-26.
- [192] T. Oprea, A. Davis, S. Teague and P. Leeson, Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41 (2001) 1308-1315.
- [193] A. Ghose, V. Viswanadhan and J. Wendoloski, A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery, *J. Combin. Chem.* 1 (1999) 55-68.
- [194] V. Snoeck, B. Goddeeris and E. Cox, The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake, Review, *Microbes Infect.* (2005) 997-1004.
- [195] K. Matter and M. Malda, Signalling to and from tight junctions, *Nature Reviews* (2003) 225-237.
- [196] N. Salama, N. Eddington and A. Fasano, Tight junction modulation and its relationship to drug delivery, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 15-28.
- [197] J. Pappenheimer, C. Dahl, M. Karnovsky and J. Maggio, Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 1942-1945.
- [198] A. Aderem and D. Underhill, Mechanism of phagocytosis in macrophages, *Annu. Rev Immunol.* 17 (1999) 593-623.
- [199] D. Tyteca. 2001.
- [200] L. Johannes and C. Lamaze, Clathrin-dependent or not: is it still a question? Review, *Traffic* 3 (2002) 443-451.
- [201] C. Lamaze and S. Schmidt, The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 573-580.
- [202] I. Sanderson and W. Walker, Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorder (An update), *Gastroenterology* 104 (1993) 622-629.
- [203] F. Brodsky, Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic, *Science* 242 (1988) 1396-1402.
- [204] R. Anderson, The caveolae membrane system, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 199-225.
- [205] S. Ahmed, D. Brown and E. London, On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent insoluble cell membrane: physiological concentrations of cholesterol and

-
- sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes, *Biochemistry* 36 (1997) 10944-10953.
- [206] P. Thomsen, K. Roepstorff, M. Stahlhut and B. Deurs, Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking, *Mol. Biol. Cell.* 13 (2002) 238-250.
- [207] B. Alberts, K. Roberts, J. Lewis, M. Raff, P. Walter and A. Johnson, *Molecular biology of the cell*, 4th ed. 2002.
- [208] D. O'Hagan, K. Palin and S. Davis, Intestinal absorption of proteins and macromolecules and the immunological response, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 4 (1988) 197-220.
- [209] J. Taipalensuu, Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers, *J. Pharm. Exp. Ther.* 299 (2001) 164-170.
- [210] G. Lehne, P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer, *Curr. Drug Targets* 1 (2000) 85-99.
- [211] G. Englund, F. Rorsman, A. Ronnblom, U. Karlbom, L. Lazorova, J. Grasjo, A. Kindmark and P. Artrusson, Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 29 (2006) 269-277.
- [212] A. Kobayashi, Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 1791-1802.
- [213] N. D'hahan, H. Jacquet, C. Moreau, P. Catty and M. Vivaudou, A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K⁺ channels by K⁺ channel openers, *Mol. Pharmacol.* 56 (1999) 308-315.
- [214] C. Lee, HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter, *Biochemistry* 37 (1998) 3594-3601.
- [215] K. Yoh, Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 1691-1697.
- [216] J. Koch and R. Tampé, The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation, *Review, Cell. Mol. Life sci.* 63 (2006) 653-662.

- [217] G. Ponchel, F. Touchard, D. Duchene and N.A. Peppas, Bioadhesive analysis of controlled release systems. I. Fracture and interpenetration analysis in poly(acrylic acid)-containing systems, *J. Contr. Release* 5 (1987) 129-141.
- [218] M.J. Toby, J.R. Johnson and P.W. Dettmar, Factors affecting in vitro gastric mucoadhesion. I. Test conditions and instrumental parameters., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 235-241.
- [219] Y. Jacques and P. Buri, Optimization of ex-vivo method for bioadhesion quantification, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38 (1992) 195-198.
- [220] N. Thirawong, J. Ninthanid, S. Puttipipatkachorn and P. Sriamornsak, Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: an in vitro evaluation using texture analyzer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (in press).
- [221] D.E. Chickering and E. Mathiowitz, Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa, *Journal of Controlled Release* 34 (1995) 251-262.
- [222] H. Hagerstrom and K. Edsman, Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method., *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1589-1599.
- [223] J.S. Pedersen and M.C. Gerstenberg, The structure of Pluronic block copolymer micelles determined by small-angle neutron scattering, *Coll. Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 213 (2003) 175-187.
- [224] Y.M. Lam, N. Grigorieff and G. Goldbeck-Wood, Direct visualisation of micelles of Pluronic block copolymers in aqueous solution by cryo-TEM, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1 (1999) 3331-3334.
- [225] I.J. Hidalgo, T.J. Raub and R.T. Borchardt, Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology* 96 (1989) 736-749.
- [226] G. Wilson, I.F. Hassan, C.J. Dix, I. Williamson, R. Shah, M. Mackey and P. Artrusson, Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model for the intestinal epithelial cell barrier, *J. Control. Release* 11 (1990) 25-40.
- [227] J.L. Madara, Loosening tight junctions. Lessons from the intestine, *J. Clin. Invest.* 83 (1989) 1089-1094.

- [228] I.J. Hidalgo. in (Borchardt, R.T., Smith, P.L. and Wilson, G., eds.) Models for assessing drug absorption and metabolism, Plenum Press, New York and London 1996, pp. 35-50.
- [229] T. Mukherjee, E. Squillante, M. Gillespie and J. Shao, Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the Caco-2 monolayer integrity in Transwell, *Drug Deliv.* 11 (2004) 11-18.
- [230] J. Xu, M.L. Go and L.-Y. Lim, Modulation of digoxin transport across Caco-2 cell monolayers by citrus fruit juice: lime, lemon, grapefruit and pummelo, *Pharm. Res.* 20 (2003) 169-176.
- [231] S. Miret, L. Abrahamse and E. de Groene, Comparison of in vitro models for the prediction of compound absorption across the human intestinal mucosa, *Journal of Biomolecular Screening* 9 (2004) 598-606.
- [232] V. Pade and S. Stavchansky, Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1210-1215.
- [233] V. Pade and S. Stavchansky, Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1604-1607.
- [234] J. Ni, H. Ouyang, M. Aiello, C. Seto, L. Borbridge, T. Sakuma, R. Ellis, D. Welty and A. Acheampong, Microdosing assessment to evaluate pharmacokinetics and drug metabolism in rats using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Pharm. Res.* 25 (2008) 1572-1582.
- [235] J.M. Landry, D.G. Marangoni, M.D. Lumsden, D. Michael and R. Berno, 1D and 2D NMR investigations of the micelle-formation process in 8-phenyloctanoate micelles, *Canadian Journal of Chemistry* 85 (2007) 202-207(6).
- [236] A. Dike and S.M. Cowsik, Three-dimensional structure of neuropeptide k bound to dodecylphosphocholine micelles, *Biochemistry* 45 (2006) 2994-3004.
- [237] S. Pizzanelli, C. Forte, S. Monti and R. Schweitzer-Stenner, Interaction of a tripeptide with cesium perfluorooctanoate micelles, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 1251-1261.
- [238] V.E. Yushmanov, J.R. Perussi, H. Iamasato, A.C. Ruggiero and M. Tabak, Ionization and binding equilibria of papaverine in ionic micelles studied by ¹H NMR and optical absorption spectroscopy, *Biophysical Chemistry* 52 (1994) 157-163(7).

-
- [239] M.G. Casarotto and D.J. Craik. in Rochester symposium on charge transfer in restricted geometries (American Chemical Society, W.D., ed.), Vol. 96, pp. 2795-2800, Rochester, USA 1991.
- [240] J.D. Smart, The basics and underlying mechanisms of mucadhesion, *Adv .Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1556-1568.
- [241] J. N'Dow, N. Jordan, C. Ronbson, D. Neal and J. Pearson, The bladder does not appear to have a dynamic secreted continuous mucus gel layer, *J. Urol.* 173 (2005) 2025-2031.
- [242] C.-M. Lehr, J.A. Bouwstra, E.H. Schacht and H.E. Junginger, In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 78 (1992) 43-48.