

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTA' DI FARMACIA



Dottorato di Ricerca in Scienza del Farmaco XXII Ciclo

**Sviluppo di Sistemi Microparticellari Biodegradabili
nella Veicolazione di Farmaci**

Dott.ssa. Concetta Giovino

Tutor: Prof. M.I. La Rotonda

Coordinatore: Prof. M.V. D'Auria

Anno Accademico 2008-2009

Premessa

1 Introduzione generale

1.1 Rilascio modificato di farmaci

1.1.1 Sistemi microparticellari a base di di acido poli(lattico-co-glicolico) PLGA

1.1.2 Sistemi microparticellari a base di PLGA per la veicolazione di farmaci biotecnologici

1.2 Veicolazione polmonare di farmaci

1.2.1 Struttura dell'apparato respiratorio

1.2.2 Polveri secche per inalazione

1.2.2.1 Meccanismo di deposizione

1.3 Sistemi microparticellari per il rilascio modificato di farmaci al polmone

1.3.1 *Large Porous Particles* a base di PLGA

Capitolo I

Large Porous Particles contenenti ciclodestrine per la veicolazione polmonare di insulina

2 Introduzione

2.1 Insulina nel trattamento del diabete: funzione e caratteristiche

2.1.1 Instabilità fisica

2.1.2 Instabilità chimica

2.2 Insulina per via inalatoria

2.3 Impostazione della ricerca

2.4 Materiali e metodi

2.4.1 Materiali

2.4.2 Animali

2.4.3 Preparazione di *HP β CD/Insulina/PLGA LPP*

2.4.4 Caratterizzazione di *HP β CD/Insulina/PLGA LPP*

2.4.4.1 Morfologia e dimensioni

2.4.4.2 Tassi di incapsulazione

2.4.4.3 Proprietà aerodinamiche

2.4.4.4 Proprietà aerosolizzanti *in vitro*

2.4.4.5 Cinetiche di rilascio *in vitro*

2.4.4.6 Studi di diffusione *in vitro*

2.4.5 Studio di deposizione delle LPP

2.4.6 Studio di attività *in vivo* di *HP β CD/Insulina/PLGA LPP*

2.5 Risultati e discussione

2.5.1 Preparazione e caratterizzazione di *HP β CD/Insulina/PLGA LPP*

2.5.2 Proprietà aerosolizzanti *in vitro* di *HP β CD/Insulina/PLGA LPP*

2.5.3 Studi di rilascio *in vitro* dell'insulina da *HP β CD/Insulina/PLGA LPP*

2.5.4 Studio di diffusione *in vitro* dell'insulina da *HP β CD/Insulina/PLGA LPP*

2.5.5 Studio di deposizione *in vivo* delle LPP

2.5.6 Attività *in vitro* dell'insulina dalle LPP contenenti insulina

2.6 Conclusioni

Capitolo II

Progettazione e sviluppo di *Large Porous Particles* per il rilascio locale e prolungato di un oligonucleotide decoy al polmone in pazienti affetti

3 Introduzione

3.1 Fibrosi cistica: fisiopatologia

- 3.1.1 CFTR: (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*):
struttura e funzione
- 3.1.2 Aspetti clinici e diagnostici
- 3.2 Fibrosi cistica e coinvolgimento del tratto respiratorio
 - 3.2.1 Alterazione della *clearance* mucociliare
 - 3.2.2 Ruolo di NF- κ B nel processo infiammatorio
- 3.3 Strategie terapeutiche
 - 3.3.1 Terapia pneumologia
 - 3.3.2 Terapia generale non-pneumologica
 - 3.3.3 Terapia del difetto di base
 - 3.3.4 Terapia alternativa: somministrazione polmonare di un oligonucleotide
decoy diretto contro NF- κ B
- 3.4 Impostazione della ricerca
- 3.5 Materiali e metodi
 - 3.5.1 Materiali
 - 3.5.2 Analisi spettrofluorimetrica della Rodamina B isotiocianato destrano
 - 3.5.3 Analisi spettrofotometrica del dec-ODN
 - 3.5.4 Preparazione delle LPP
 - 3.5.5 Caratterizzazione delle LPP
 - 3.5.5.1 Analisi morfologica
 - 3.5.5.2 Osservazione al microscopio confocale
 - 3.5.5.3 Analisi dimensionale
 - 3.5.5.4 Proprietà di flusso delle polveri
 - 3.5.5.5 Tassi di incapsulazione
 - 3.5.5.6 Studi di rilascio *in vitro*

3.5.5.7 Proprietà aerosolizzanti *in vitro*

3.5.5.8 Studio di deposizione *in vivo* delle LPP

3.5.5.9 Attività delle dec-ODN LPP *in vitro*

3.6 Risultati e discussione

3.6.1 LPP non cariche: preparazione e caratterizzazione

3.6.2 LPP contenenti Rhod: preparazione e caratterizzazione

3.6.3 Preparazione e caratterizzazione delle LPP contenenti dec-ODN

3.6.3.1 Studio di deposizione *in vivo* delle LPP

3.6.3.2 Studio di attività delle dec-ODN LPP *in vitro*

3.6.3.2.1 *Effetto sull'attivazione del fattore NF- κ B*

3.6.3.2.2 *Effetto sull'espressione di geni IL-6 e IL-8*

3.7 Conclusioni

4 Lista delle abbreviazioni

5 Bibliografia

Premessa

Nel corso degli ultimi anni, un crescente interesse della ricerca scientifica nel settore tecnologico-formulativo è stato rivolto all'impiego della via polmonare per la somministrazione locale e sistemica di farmaci biotecnologici. I farmaci "biotecnologici" racchiudono peptidi, proteine, vaccini ricombinanti, anticorpi monoclonali (ad uso terapeutico), DNA ed oligonucleotidi (Cunningham, 2000). Questi farmaci sono sul mercato solo da pochi anni, ma l'evoluzione dei loro fatturati indica un enorme potenziale nell'immediato futuro. Attualmente sono stati identificati 220 nuovi prodotti biotecnologici per più di 100 patologie, incluse cancro, diabete, malattie infettive, malattie autoimmuni e condizioni correlate, che sono in fase di sperimentazione clinica avanzata (fase III) o sottoposti ad una revisione da parte della *Food and Drug Administration* (Tauzin, 2006). Tuttavia, il loro potenziale terapeutico, così come la loro applicazione clinica, è fortemente ostacolato dallo scarso profilo farmacocinetico che caratterizza tali macromolecole. Attualmente, la maggior parte delle proteine in campo terapeutico vengono somministrate attraverso la via iniettiva. Alla luce di tali problematiche, la via polmonare ha suscitato di recente enorme interesse quale via di somministrazione non invasiva di peptidi, proteine ed acidi nucleici.

L'efficacia sistemica di tale via è determinata da una serie di caratteristiche anatomiche-fisiologiche peculiari dei polmoni quali: un'ampia area superficiale (100m^2), un elevato flusso sanguigno, un epitelio sottile che permette un rapido assorbimento ed una scarsa attività enzimatica (Patton, 1996; Newman, 1994). La via inalatoria, inoltre, rappresenta una via di somministrazione poco o per nulla invasiva per i farmaci indirizzati direttamente ai polmoni garantendone una maggiore efficacia ed effetti collaterali ridotti. Per sfruttare al meglio le potenzialità applicative della via polmonare, tuttavia, si è reso necessario progettare dispositivi avanzati che consentono l'inalazione del farmaco in forma di polveri secche (DPI) in grado di risolvere problemi di solubilità, stabilità e biodisponibilità associati ai classici inalatori dosatori pressurizzati. L'impiego di un DPI esige una polvere con proprietà di massa ben definite che condizioneranno la capacità delle particelle di raggiungere specifiche regioni del polmone in funzione della finalità terapeutica cui il farmaco è destinato. In particolare,

l'attività sistemica del farmaco veicolato sarà condizionata al raggiungimento degli alveoli polmonari, mentre, per un'azione locale, può rendersi necessaria una più ampia distribuzione del farmaco lungo il tratto respiratorio.

In tale ambito, il lavoro di ricerca oggetto di questa tesi ha come obiettivo la progettazione, la realizzazione e l'applicazione di sistemi microparticellari per il rilascio modificato di biofarmaci al polmone. Tali sistemi sono stati progettati per essere somministrati per via inalatoria direttamente in forma di polvere secca. A tal fine, sono state sviluppate particelle porose di grandi dimensioni (20-40 μm) o *Large porous particles* (LPP) che rappresentano una valida strategia formulativa per l'ottenimento di polveri respirabili. L'impiego, poi, di materiali a base di polimeri d'uso consolidato, quali l'acido poli(lattico-co-glicolico), può essere di grande aiuto nella produzione di polveri che combinino l'abilità di raggiungere il sito bersaglio ad una attività terapeutica a lungo termine. In particolare, tali sistemi possono migliorare la stabilità *in vivo* del farmaco veicolato, diminuirne la tossicità, prolungarne il tempo di permanenza *in situ* e permettere la combinazione con altri principi attivi o eccipienti di supporto (e.g., promotori d'assorbimento). Il lavoro di tesi si è articolato in due fasi successive. Entrambe le fasi di ricerca hanno previsto uno studio approfondito di tipo tecnologico-formulativo confortato, poi, da studi farmacologici condotti in collaborazione con il Dipartimento di *Farmacologia Sperimentale* di questa Università. Nel corso della prima fase sono state studiate le potenzialità applicative di LPP a base di PLGA per il rilascio al polmone di insulina. Sulla base dell'esperienza maturata, in una seconda fase del lavoro, sono state sviluppate LPP a base di PLGA per il rilascio controllato al polmone di un decoy ODN (dec-ODN) diretto contro NF- κ B per il trattamento della fibrosi cistica.

INTRODUZIONE GENERALE

1 Introduzione generale

1.1 Rilascio modificato di farmaci

La grande quantità di tecnologie innovative, i nuovi materiali disponibili e l'alta specificità raggiunta dalle tecniche analitiche ha consentito la realizzazione di nuove forme di somministrazione per farmaci a basso ed alto peso molecolare con notevoli vantaggi terapeutici, quali i sistemi a rilascio modificato (*Controlled Release Systems-CRS*).

Il CRS ideale deve possedere alcuni requisiti fondamentali, come realizzare l'efficacia terapeutica con un'unica somministrazione per l'intera durata della terapia, rilasciare il principio attivo al sito d'azione, minimizzando gli effetti collaterali, e permettere il controllo delle concentrazioni del farmaco nello spazio e nel tempo.

Le formulazioni specificamente definite “a rilascio controllato”, sono caratterizzate dalla precisione con cui il farmaco viene rilasciato in modo che l'ottenimento della cinetica desiderata, generalmente, ma non necessariamente di ordine zero, non sia più un fatto occasionale, ma una prestazione rigidamente garantita. Nella FU XII Ed. sono più propriamente definite “forme farmaceutiche a rilascio modificato” quelle preparazioni in cui la velocità e/o il sito di rilascio del/dei principi attivi sono differenti da quella di una forma farmaceutica convenzionale somministrata per la stessa via. Questa deliberata modificazione si ottiene con uno speciale progetto di formulazione e/o metodo di produzione. In tal senso, le forme farmaceutiche a rilascio modificato possono essere a rilascio prolungato, ritardato o ripetuto (Figura 1). Le *forme farmaceutiche a rilascio prolungato* sono forme di dosaggio a rilascio modificato che mostrano un rilascio della/e sostanze attive più lento di quello di una forma di dosaggio convenzionale somministrata per la stessa via (Figura 1A). Le *forme farmaceutiche a rilascio ritardato*, invece, sono forme di dosaggio a rilascio modificato che mostrano un rilascio della/e sostanze attive che è ritardato (i.e., preparazioni gastroresistenti) (Figura 1B), mentre le *forme farmaceutiche a rilascio ripetuto*, o pulsante, sono

forme di dosaggio a rilascio modificato che mostrano un rilascio sequenziale ripetuto del/dei principi attivi (Figura 1C).

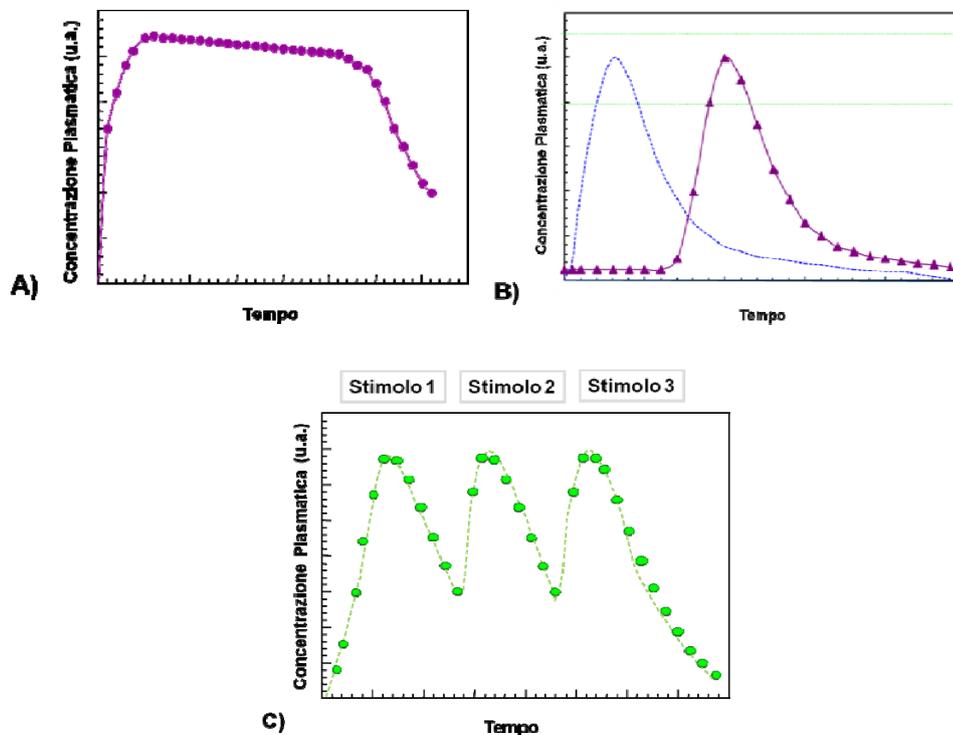


Figura 1 . Profili di rilascio del principio attivo incapsulato da forme farmaceutiche a rilascio modificato: (A) forme farmaceutiche a rilascio prolungato; (B) forme farmaceutiche a rilascio ritardato; (C) forme farmaceutiche a rilascio ripetuto.

In tutti i casi, il più importante vantaggio terapeutico è rappresentato da una medicazione efficace, protratta nel tempo e senza interruzioni per tutta la durata del ciclo programmato. Questo consente l'espressione ottimale del potenziale clinico della sostanza attiva non esponendo il paziente ai periodi di inefficacia, tipici delle forme farmaceutiche convenzionali, in prossimità dei periodi di assunzione. Questi prolungamenti di durata senza soluzione di continuità sono inoltre raggiunti con una dose giornaliera di farmaco generalmente inferiore a quella utilizzata nella terapia con le forme farmaceutiche tradizionali. Studi socio-economici hanno ampiamente dimostrato che il rapporto costo/beneficio è tutto a favore di queste forme di somministrazione. La possibilità di ridurre il numero delle assunzioni giornaliere è inoltre un fattore importantissimo dal punto di vista

della psicologia del paziente (aumento della *compliance*), della maggiore praticità d'uso e della più rigorosa osservanza del regime terapeutico.

I CRS sono costituiti, solitamente, da supporti polimerici di diversa natura chimica. Sfruttando le diverse proprietà fisico-chimiche del biomateriale e le numerose modalità con la quale esso può essere impiegato, è possibile ottenere un CRS capace di modificare il rilascio del farmaco mediante la cinetica desiderata, ottimizzando il profilo di attività. Il requisito fondamentale di un biomateriale da impiegare per la preparazione di un CRS, sia esso un materiale non biodegradabile o biodegradabile, è la **biocompatibilità**, ossia l'assenza di tossicità cellulare e tissutale (Biondi, 2007).

1.1.1 Sistemi microparticellari a base di acido poli(lattico-co-glicolico) PLGA

La possibilità di sviluppare nuove forme farmaceutiche a base di polimeri biocompatibili, in grado di proteggere e rilasciare il principio attivo in tempi prolungati, ha fatto crescere enormemente l'interesse nei confronti delle particelle biodegradabili quali veicoli per peptidi e proteine (Couvreur, 1997; Crofts, 1998; Walter, 2001). Tra i materiali biodegradabili più utilizzati nell'allestimento di CRS per proteine e peptidi, i poliesteri a base di acido lattico (PLA) e i loro copolimeri con acido glicolico (PLGA) rivestono un'importanza centrale in virtù della loro ormai accertata biocompatibilità e sicurezza d'uso (Jain, 2000) (Figura 2).

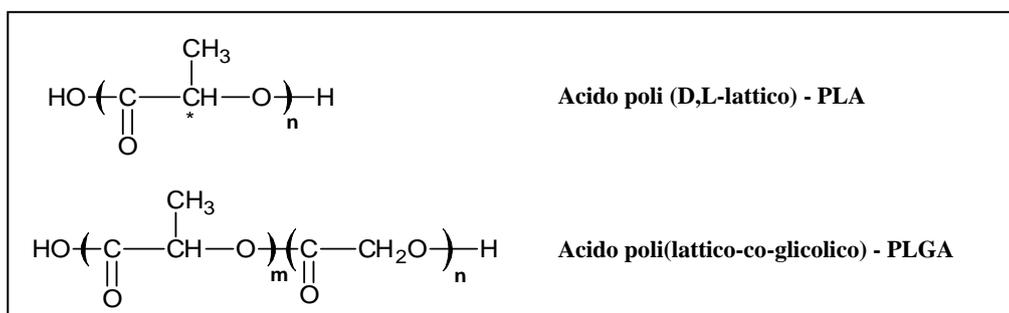


Figura 2. Struttura chimica dei polimeri dell'acido lattico e glicolico.

Si tratta di polimeri approvati per applicazioni cliniche dalla *Food and Drug Administration* (FDA), il cui principale vantaggio è legato alla loro completa biodegradazione *in vivo*. La bioerosione, infatti, provoca la demolizione dello scheletro polimerico per via chimica, con formazione di derivati idrosolubili a basso peso molecolare che entrano nei normali cicli metabolici dell'organismo, in particolare il ciclo di Krebs (Figura 3).

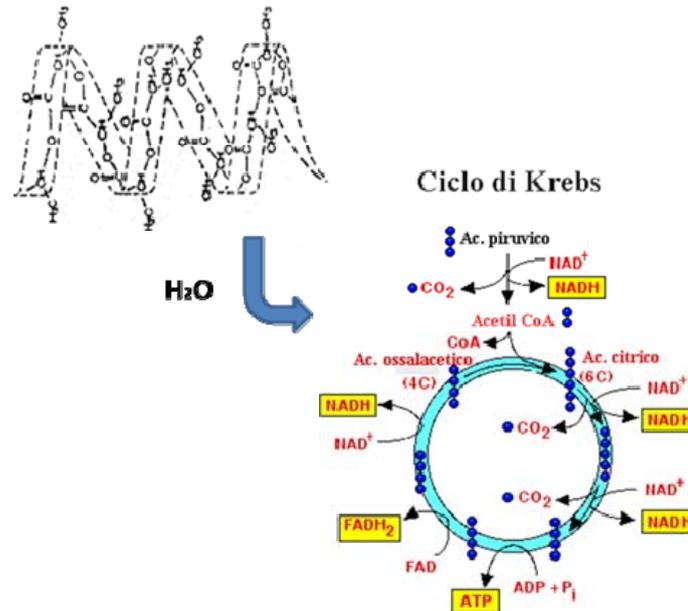


Figura 3. Schema metabolico dell'acido polilattico (PLA).

Tra i polimeri biodegradabili, inoltre, i PLGA sono stati oggetto di numerosi studi in ragione della loro elevata versatilità d'impiego. La velocità di rilascio del farmaco veicolato, infatti, può essere facilmente modulata variando la composizione del polimero (i.e. rapporto acido lattico/acido glicolico), peso molecolare e struttura chimica (i.e. estremità carbossi-terminale *capped* o *uncapped*) (Sharif, 1995; Anderson, 1997).

Le proprietà fisico-chimiche del polimero, come il peso molecolare e l'indice di polidispersità, influenzano la stabilità del polimero e le potenzialità d'impiego nella formulazione di CRS (Kitchell, 1985; Lewis, 1995; Wu, 1995), con particolare riferimento ai tempi di biodegradazione ed idrolisi (Kitchell, 1985; Wu, 1995; Rajeev, 2000). Il PLA presenta un'idrofobicità più spiccata rispetto al

PLGA, ed un aumento progressivo della componente idrofila (i.e., una riduzione del rapporto lattico/glicolico) determina un maggior richiamo d'acqua e una riduzione nei tempi di degradazione (Jalil, 1990; Cohen, 1994). Per questo motivo, PLGA caratterizzati da tempi di degradazione *in vivo* che possono variare da 3 settimane fino ad un massimo di un anno sono attualmente disponibili in commercio.

L'importanza dei copolimeri PLGA è notevolmente aumentata in conseguenza della possibilità di preparare da essi sistemi particellari per la veicolazione di farmaci. I vantaggi d'impiego dei sistemi particellari includono, infatti, la possibilità di somministrare il farmaco direttamente nel sito d'azione dove il sistema costituisce un deposito da cui il principio attivo può essere liberato ed agire per un periodo di tempo prolungato (Davis, 1988; Ravi, 2000).

I sistemi **microparticellari** sono particelle con dimensioni comprese tra 1 e 1000 μm , anche se le dimensioni delle microparticelle di maggior interesse sono generalmente comprese nell'intervallo 1-200 μm . Il principio attivo incapsulato in un sistema microparticellare può essere localizzato in cavità interne al sistema (i.e., *microcapsule*) o finemente disperso nella matrice polimerica (i.e. *microsfere*), a seconda della tecnica di produzione e/o della formulazione di partenza (Figura 4).

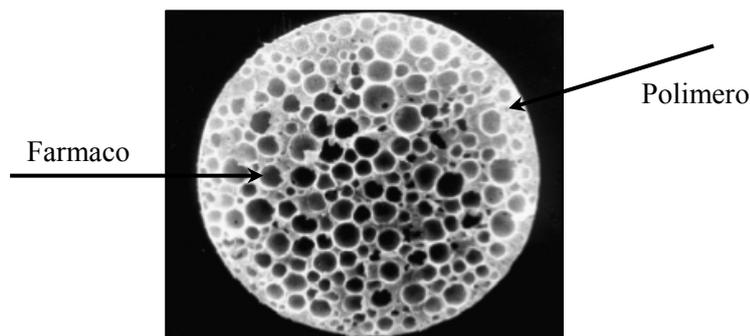


Figura 4. Microsfere biodegradabili: tipico sistema *multi-reservoir*.

Il rilascio del principio attivo da microsfere a base di polimeri biodegradabili è regolato principalmente dalla diffusione del principio attivo incapsulato attraverso la matrice polimerica e dalla biodegradazione del polimero (Washington, 1996). Nel meccanismo accoppiato diffusione-erosione un ruolo importante è svolto

dall'attività dell'acqua nell'ambiente di rilascio. La microsfera, a contatto con l'ambiente acquoso, si idrata (fase di idratazione) e l'acqua che penetra all'interno solubilizza il farmaco, che inizia a diffondere attraverso i micropori propri del PLGA, che hanno dimensioni comprese tra angstrom e nanometri, e attraverso la struttura macroporosa delle particelle, che è conseguenza del processo di preparazione (i.e., tecnica dell'emulsione multipla). Nel caso di macromolecole, il rilascio del farmaco, quindi, è impedito dalla microporosità del sistema fino al crescere delle dimensioni dei micropori. In seguito alla degradazione del polimero, infatti, si sviluppa un graduale aumento delle dimensioni dei micropori, che evolvono in mesopori e, quindi, macropori con una conseguente diminuzione della resistenza della matrice polimerica alla diffusione del farmaco (Batycky, 1997) (Figura 5).

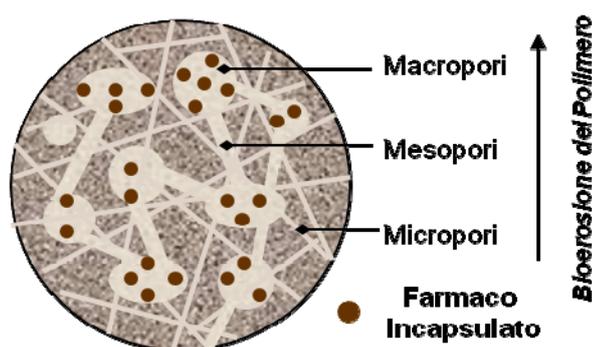


Figura 5. Architettura interna delle microparticelle a base di PLGA.

Alla luce degli innumerevoli vantaggi che li caratterizzano, i sistemi a base di PLGA sono stati ampiamente impiegati per lo sviluppo di *carrier* per macromolecole di natura instabile, in particolar modo per proteine, peptidi, vaccini, antigeni, fattori di crescita ed acidi nucleici. Nella tabella 1 è riportata la lista dei sistemi CRS a base di PLGA approvati dalla US FDA.

Tabella 1: Microparticelle a base di PLGA presenti in commercio (Mundargi, 2008).

Nome del prodotto	Principio attivo	Company	Applicazione
Lupron Depot®	Leuprolide acetato	TAP	Cancro della prostata
Nutropin Depot®	Ormone di crescita	Genetech	Deficienza del fattore di crescita
Suprecur ® MP	Buserelina acetato	Aventis	Cancro della prostata
Decapeptyl ®	Triptorelina pamoato	Ferring	Cancro della prostata
Sandostatin LAR ® Depot	Octreotide acetato	Novartis	Acromegalia
Somatuline ® LA	Lanreotide	Ipsen	Acromegalia
Trelstar™ Depot	Triptorelina pamoato	Pfizer	Cancro della prostata
Arestin®	Minociclina	Orapharma	Parodontite
Risperidal ® Consta™	Risperidone	Jhonson & Jhonson	Antipsicotico

1.1.2 Sistemi microparticellari a base di PLGA per la veicolazione di farmaci biotecnologici

Ad oggi numerose macromolecole di origine biotecnologica, quali proteine, peptidi, oligonucleotidi, vaccini, antigeni e fattori di crescita, sono stati incorporati con successo in sistemi microparticellari a base di PLGA (Tabella 2).

Tabella 2: Microsfere a base di PLGA per il rilascio modificato di farmaci biotecnologici.

Fattore di crescita	Vaccini	Proteine	Oligonucleotide	Riferimento
VEGF-165	-	-	-	Richardson, 2001
-	-	BSA	-	Carrasquillo, 2001
bFGF	-	-	-	Perets, 2003
-	β -galattoside	-	-	Stivaktakis, 2004
-	-	insulina	-	Jiang , 2005
-	-	-	ODN decoy	De Rosa, 2005
-	TT	-	-	Waeckerle-Men 2005
-	-	Insulina	-	Ungaro,2006
-	-	LMWH	-	Javot , 2009
IGF-I	-	-	-	Wenk , 2009
OVA	-	-	CpG-ODN	Beatriz, 2009
-	-	-	Pt-ODN	Ahmed, 2009

VEGF=*Vascular endothelial growth factor*; BSA= siero albumina bovina; FGF= *basic Fibroblast growth factor*; TT= Tossoide Tetanico; LMWH= *low molecular weight heparin*; IGF= *Insulin-like growth factor*; OVA= ovalbumina.

La preparazione di sistemi microparticellari a base di PLGA per la veicolazione di farmaci può essere realizzata utilizzando diverse tecnologie (Jain 1999; Freitas, 2005). Tra esse la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente è quella maggiormente impiegata nel caso di farmaci di natura macromolecolare (Freitas, 2005; Ahmed 2009). Tale tecnica prevede la formazione di un'emulsione primaria acqua in olio (A_i/O), preparata emulsionando una fase acquosa interna (A_i) con una fase organica (O) contenente una quantità nota di polimero. L'emulsione primaria (A_i/O) è poi aggiunta alla fase acquosa esterna (A_e) contenente una quantità nota di stabilizzante, con formazione di un'emulsione multipla ($A_i/O/A_e$). L'emulsione finale è posta sotto agitazione elettromagnetica al fine di allontanare per evaporazione il solvente organico e precipitare il polimero in forma di microparticelle (Figura 6). L'aggiunta del farmaco alle fasi (A_i o O)

della doppia emulsione dipende essenzialmente dalla natura del farmaco da incapsulare. Nel caso di macromolecole idrofile, come la maggior parte dei farmaci da biotecnologie, il farmaco da veicolare viene aggiunto alla fase acquosa interna della doppia emulsione.

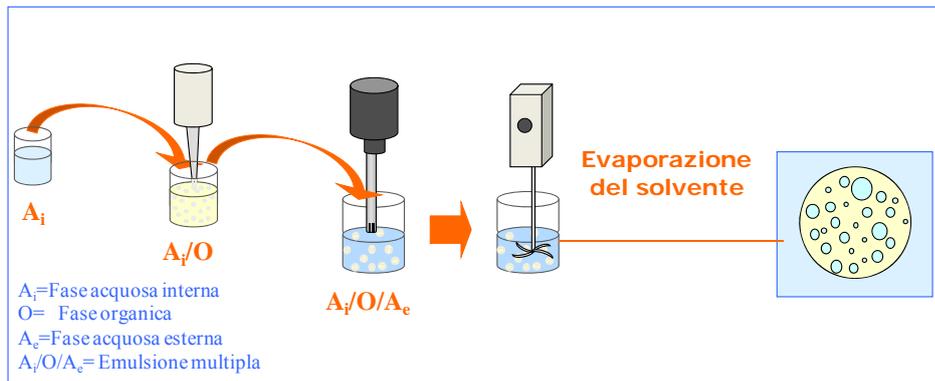


Figura 6. Preparazione di sistemi microparticellari mediante la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente.

E' noto che parametri formulativi, quali composizione e concentrazione del polimero, grado di diffusione del solvente organico, caricamento del farmaco, stabilità dell'emulsione, rapporti volumetrici tra la fase acquosa interna e la fase acquosa esterna, la tecnica di omogeneizzazione e la temperatura, influenzano in maniera significativa le caratteristiche morfologiche e tecnologiche del prodotto finale (Giteau, 2008). Tuttavia, quando tale tecnica viene impiegata per la realizzazione di sistemi microparticellari contenenti farmaci biotecnologici, un aspetto cruciale da considerare è la necessità di conservare l'integrità strutturale della macromolecola incapsulata e, quindi, la sua attività biologica sia nella fase di preparazione delle particelle che nella fase di rilascio.

Durante la microincapsulazione, infatti, proteine possono subire fenomeni di denaturazione, aggregazione ed ossidazione che determinano perdita della sua attività biologica. Numerose sono, inoltre, le possibili fonti di inattivazione della macromolecola anche nelle fasi successive all'incapsulazione. La bioerosione del PLGA, ad esempio, porta alla scissione dei legami chimici con liberazione di gruppi acidi e diminuzione del pH interno alla matrice. La riduzione del pH, ad esempio, può causare l'*unfolding* della proteina o, spesso, la sua inattivazione via

degradazione chimica (Burke, 2000). Diversi approcci di stabilizzazione di farmaci biotecnologici durante l'incapsulazione e il rilascio da particelle biodegradabili sono riportati in letteratura (De Rosa, 2008). Innanzitutto l'utilizzo di lioprotettori (mannitolo, trealosio) può aumentare la stabilità delle proteine durante la fase di rilascio. D'altra parte, l'aggiunta alla formulazione iniziale di composti basici dalle proprietà tampone, quali alcuni sali inorganici solubili in acqua (e.g. bicarbonato di sodio, idrossido di magnesio) può evitare la degradazione della proteina causata dal microclima acido generato dalla degradazione del polimero.

Va sottolineato che il metodo di stabilizzazione sarà sempre condizionato alla particolare proteina, la cui storia personale, in termini di proprietà chimico-fisiche (quali peso molecolare, composizione e/o comportamento in soluzione) va sempre tenuta in debita considerazione. Nel caso dell'insulina, ad esempio, l'impiego di sali potrebbe causare precipitazione/agggregazione/inattivazione in funzione del tipo di sale e della sua concentrazione (Brange 1997; Perez 2003). Al contrario, è stato recentemente dimostrato che nell'allestimento di sistemi microparticellari per il rilascio modificato di insulina, l'aggiunta alla formulazione iniziale di idrossi propil- β -ciclodestrina (HP β CD) rappresenta una valida strategia al fine di preservare l'integrità strutturale della proteina sia durante la fase di preparazione che di rilascio (De Rosa, 2003).

Per quanto riguarda l'impiego terapeutico degli ODNs è stato ampiamente dimostrato che la scarsa penetrazione cellulare e la scarsa stabilità biologica che li caratterizza, associata con la loro rapida eliminazione, rendono necessarie ripetute somministrazioni per ottenere un effetto farmacologico prolungato, specialmente per cellule bersaglio con un lento *turnover*. Il sistema di veicolazione, pertanto, deve consentire innanzitutto un'efficiente penetrazione cellulare del ODN e un rilascio prolungato nel tempo nella sua forma bioattiva. Recentemente è stato dimostrato che sistemi microparticellari biodegradabili a base di PLGA hanno la capacità di migliorare la penetrazione cellulare del ODN incapsulato, consentendo un rilascio sostenuto nella sua forma bioattiva aumentandone così la stabilità biologica (De Rosa, 2005).

all'interno incontriamo la tonaca fibrosa, la tonaca sottomucosa e la tonaca mucosa. I bronchi si formano direttamente dalla trachea, di cui continuano la struttura dirigendosi verso destra e sinistra e poi ramificandosi fino a costituire il parenchima polmonare. La loro struttura inizialmente è molto simile a quella della trachea, col progredire delle ramificazioni muta profondamente, il calibro diminuisce naturalmente e le pareti si assottigliano portando alla formazione dei bronchioli.

I polmoni rappresentano gli organi della respirazione e la stazione finale del percorso che l'aria compie provenendo dalle cavità nasali. L'unità anatomico-funzionale dei polmoni è l'alveolo. L'epitelio alveolare presenta un'ampia area superficiale di assorbimento di circa 100 m² (Patton, 1996). Esso è composto da circa 500 milioni di alveoli, con un diametro di 30 µm, ricoperti da una fitta rete capillare lungo la quale si verificano gli scambi gassosi e la transitorietà di molecole di piccola e grande dimensione. L'epitelio alveolare è costituito da due tipi di cellule non-ciliate note come Pneumociti di tipo I e Pneumociti di tipo II. Quest'ultimi sono la fonte principale di surfattanti e, a differenza di quelle di tipo I, sono cellule che vanno incontro all'apoptosi dopo circa 120 giorni. La superficie dell'epitelio alveolare è rivestita da cellule ad azione fagocitaria, i macrofagi (in genere circa 15 macrofagi circondano ciascun alveolo). Essi hanno il compito di rimuovere particelle estranee sia esse di natura microbiologica o meno, mantenendo la "sterilità" della superficie alveolare. I macrofagi rappresentano, pertanto, la prima linea di difesa immunitaria contro l'inalazione di microrganismi.

1.2.2 Polveri secche per inalazione

Nel corso degli ultimi dieci anni un crescente interesse della ricerca scientifica è stato rivolto alla via polmonare per la somministrazione sistemica/locale di principi attivi in forma di polveri secche. L'efficacia di tale terapia è fortemente influenzata dai seguenti fattori: I) meccanismo di deposizione della polvere; II) dispositivo di somministrazione; III) caratteristiche tecnologiche delle particelle che compongono la polvere.

1.2.2.1 Meccanismo di deposizione

La deposizione di particelle nelle vie aeree è un processo molto complesso. Per deposizione si intende quel meccanismo che determina la frazione di particelle catturate nel tratto respiratorio. I meccanismi che permettono il movimento delle particelle sospese nell'aria inspirata sono: inerzia, sedimentazione e diffusione Browniana (Joseph, 2007; Patton, 2007). L'efficacia di questi meccanismi dipende da vari fattori quali: I) anatomia del tratto respiratorio; II) meccanismi "naturali" di assorbimento; III) presenza di barriere anatomiche, ossia *clereance* mucociliare e meccanismi degradativi; IV) diametro aerodinamico effettivo delle particelle inspirate; V) condizioni respiratorie del paziente.

L'anatomia del tratto respiratorio, ovvero il tipo di cellule, la morfologia ed il differente calibro delle vie aeree, influenzano in maniera significativa la deposizione di farmaci inalati. In particolare, nelle vie aeree superiori l'inerzia di particelle di grandi dimensioni determina deposizione mediante un fenomeno di impatto. Le particelle più piccole, invece, vengono filtrate lungo le vie aeree superiori e raggiungono le regioni centrali del polmone dove depositano per sedimentazione gravitazionale. Infine, per particelle molto piccole, il movimento è determinato dalla diffusione *browniana* che determina principalmente una deposizione alveolare (Weibel, 1963; Hogg, 1985; Newman, 1982; Gonda, 1990) (Figura 8).

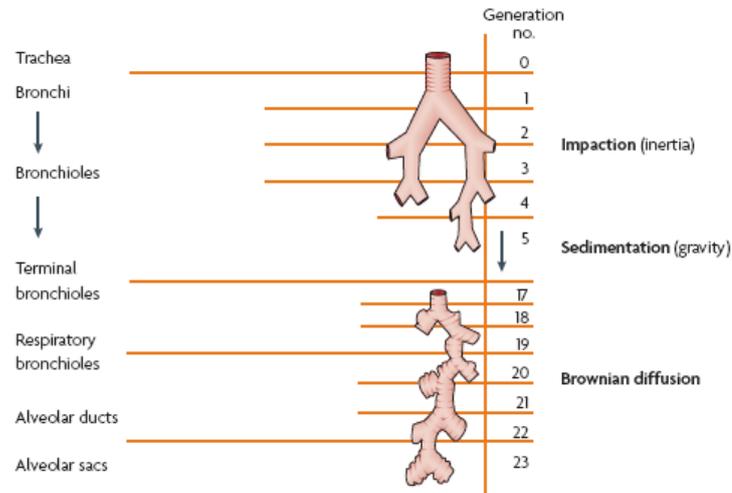


Figura 8. Fattori che determinano la deposizione delle particelle inalate (Patton, 2007).

Nel momento in cui si vuole sfruttare la via polmonare per l'assorbimento sistemico di un farmaco anche il “*meccanismo naturale*” di assorbimento riveste un ruolo importante ai fini della deposizione. L'epitelio alveolare possiede un'elevata permeabilità alle macromolecole, il cui assorbimento avviene attraverso un meccanismo noto come transcitosi (Figura 9). La transcitosi determina il passaggio di molecole di farmaco mediante una invaginazione della membrana cellulare. Il risultato di tale processo è il rapido passaggio dall'alveolo al sangue di piccoli volumi di fluido alveolare contenenti proteine dissolte. Piccole molecole e peptidi possono essere assorbiti attraverso l'epitelio alveolare anche sfruttando un meccanismo di trasporto paracellulare, attraverso le *tigh junctions* che connettono una cellula all'altra. Tuttavia, mentre la transcitosi è un meccanismo rapido ed efficiente, il trasporto paracellulare è lento ed inefficiente.

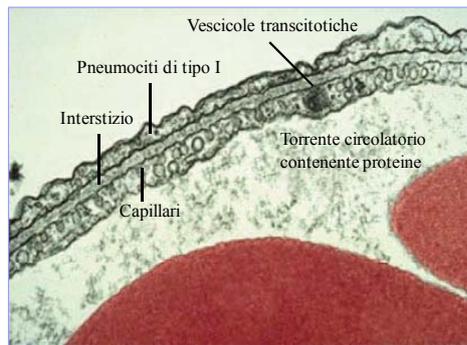


Figura 9. Meccanismo naturale di assorbimento di peptidi e proteine.

L'assorbimento di molecole di natura proteica attraverso l'epitelio alveolare, tuttavia, è fortemente influenzato dalle caratteristiche chimico-fisiche della macromolecola da inalare. La solubilità rappresenta il primo parametro che regola l'assorbimento. Il farmaco, una volta depositato sulla superficie epiteliale, deve solubilizzarsi nei fluidi polmonari per poter essere assorbito. Il grado di assorbimento di un farmaco dipende, inoltre, sia dalle sue dimensioni che dalla sua permeabilità attraverso la membrana cellulare. I peptidi sono generalmente assorbiti in tempi molto rapidi sia per le loro dimensioni ridotte (1-3 KDa) che per l'elevata sensibilità all'azione delle peptidasi (proteine ubiquitarie). Per le proteine, tenendo conto che si annulla l'effetto della idrolisi enzimatica ad opera delle peptidasi (Adjei, 1992), il grado di assorbimento è dettato principalmente dalle dimensioni; quanto più grande è il farmaco minore è l'assorbimento e quindi maggiore è la permanenza del farmaco *in situ*. Molecole come insulina, fattori di crescita (human growth hormone o hGH) e citochine, se somministrate per inalazione hanno un emivita di 30-90 minuti (Bukar, 2004).

La clearance è un processo dinamico che rimuove le particelle estranee dal tratto respiratorio, in ragione della loro solubilità nei fluidi polmonari. Particelle altamente solubili, infatti, dissolvono rapidamente e quindi sono facilmente assorbite a livello sistemico. In questo caso il loro metabolismo e la loro escrezione è bassa. Al contrario, particelle insolubili che raggiungono le vie aeree superiori, hanno un emivita di ~ 24 ore, in quanto vengono intrappolate nel muco e rapidamente allontanate (Newman, 1982). Il muco si stratifica al di sopra del

liquido peri-ciliare, nel quale sono immerse le ciglia vibratili delle cellule dell'epitelio. Queste ciglia battono sempre in direzione della faringe e così il muco e le particelle intrappolate potranno essere deglutiti o espettorati. La quantità, la qualità e le caratteristiche reologiche del muco, che sono responsabili della velocità di eliminazione di particelle estranee, sono strettamente legate alla eventuale presenza di patologie. Ad esempio, nella bronchite cronica, l'irritazione induce un aumento del numero di cellule ciliate ed una riduzione del numero di cellule secernenti muco.

Le particelle che si depositano nelle regioni profonde del polmone, invece, se insolubili permangono *in situ* per molti giorni e quindi possono essere maggiormente attaccate dai macrofagi alveolari. Tali cellule in ragione delle loro dimensioni (diametro di $\sim 15-22 \mu\text{m}$) hanno la capacità di fagocitare particolarmente quelle particelle che presentano un diametro di $1-2 \mu\text{m}$ (Chono, 2006). Tuttavia ancora oggi si conosce poco rispetto al meccanismo con cui i macrofagi degradano le proteine che si depositano sulla superficie alveolare (Joseph, 2007).

Il diametro aerodinamico effettivo delle particelle influenza il sito di deposizione e l'intensità delle forze che agiscono su di esse quando attraversano il tratto respiratorio.

La capacità inspiratoria del paziente, infine, regola il tempo di permanenza delle particelle a livello polmonare e quindi anche la probabilità di deposizione per effetto gravitazionale o per diffusione. La ventilazione polmonare, a seconda delle esigenze metaboliche dell'organismo, è regolata autonomamente dal sistema nervoso. Il centro della respirazione, situato nel bulbo e nel ponte encefalico, controlla tutte le attività respiratorie. Tuttavia esiste una variabilità individuale nella frequenza respiratoria, la quale può modificare sia il volume polmonare che le dimensioni delle vie aeree e del parenchima, alterando pertanto il processo di deposizione (Joseph, 2007).

1.2.2.2 Dispositivi di inalazione: gli inalatori di polveri secche

I dispositivi di inalazione giocano un ruolo importante nel determinare l'efficienza della somministrazione di peptidi/proteine al polmone. I moderni dispositivi sono il frutto di anni di studi tecnologici ispirati alle esigenze del paziente e si basano su sperimentazioni cliniche che ne hanno ampiamente testato la loro efficacia e sicurezza. In teoria tutti i dispositivi più comunemente usati nella somministrazione di farmaci nel tratto respiratorio, quali i nebulizzatori, gli inalatori pressurizzati dosatori (MDI) e gli inalatori di polvere secca (DPI), possono essere adatti per farmaci di natura proteica. Tuttavia, l'impiego dei DPI offre notevoli vantaggi rispetto ai comuni MDI. Quest'ultimi sistemi, infatti, presentano una scarsa efficienza legata non solo ad una ridotta e poco riproducibile quantità di farmaco erogata per inalazione, ma anche alla potenziale instabilità strutturale della macromolecola in sospensione. Un MDI, infatti, prevede una formulazione "bifasica" o "trifasica" del farmaco che è, rispettivamente, "solubilizzato" o "sospeso" nel gas propellente in equilibrio con i suoi vapori.

I DPI, al contrario, sono dispositivi che consentono l'inalazione del farmaco in forma di polvere secca. Esistono due diverse tipologie di inalatori di polveri secca I) monodose, in cui una dose unica di farmaco è contenuta in una capsula di gelatina); II) multidose, che contengono un numero di dosi variabile (da 50 a 100 o più).



Figura 10. Esempi di DPIs a singola dose (I-II); a dose multipla (III-IV).

La dispersione della polvere è determinata dalla semplice inspirazione del paziente. Tuttavia, alcuni DPI richiedono un flusso di aria ≥ 60 l/min per disaggregare la polvere, di conseguenza possono essere difficili da usare soprattutto in pazienti asmatici e nei bambini (Paul, 2005). In ogni caso i DPI sono compatti, maneggevoli, facili da usare, non richiedono un coordinamento da parte del paziente (e.g. DPI respiro-attivati) e sono relativamente economici.

Generalmente, la *performance* di un DPI è legata:

- *alla formulazione*; ossia alle proprietà di flusso ed alla capacità di dispersione della polvere.
- *alla geometria del flusso di aria all'interno del sistema*.
- *ai fattori ambientali*; in particolare temperatura ed umidità possono modificare la stabilità della formulazione, e quindi, la *performance* di erogazione. E' stato dimostrato, infatti, che l'umidità rende la polvere meno coesiva e per questo più difficile da disperdere.

Nel 1970 Bell e collaboratori svilupparono il primo DPI (Sphinaler) (Figura 10) a dose singola per la somministrazione di sodio cromoglicato (Bell, 1971). Un simile DPI (Rotahaler) è stato impiegato per molti anni per il rilascio di albuterolo. L'unico limite dei dispositivi a dose singola è rappresentato dal caricamento della capsula, che potrebbe rappresentare un problema serio nel caso di somministrazione del farmaco in acuto (e.g., asma). Al fine di superare tali problematiche, sono stati ideati i DPI multidose, quali il Turbohaler, sviluppato dalla AB Draco Company (questo dispositivo è utilizzato principalmente per la terapia aerosolica di β agonisti, quali formeterolo e terbutalina) ed associazioni (formeterolo e budesonide)) (Figura 10). Se questo primo DPI poteva ancora presentare problematiche annesse al fatto che la quantità di farmaco rilasciata al polmone è funzione del flusso dell'aria (Sumbly, 1997), oggi dispositivi come il Diskus, contengono 60 dosi di farmaco atte a coprire un mese di terapia. I nuovi dispositivi presentano una buona *performance*, una buona accettabilità da parte del paziente, la possibilità di somministrare due farmaci in associazione e una buona riproducibilità delle dosi erogate (Islam, 2008; Kesser, 2009).

Da un punto di vista tecnologico-formulativo, il principale ostacolo allo sviluppo di una formulazione DPI efficace è rappresentato dalla produzione di una polvere caratterizzata da buone proprietà di flusso e disperdibilità.

1.2.2.3 Caratteristiche delle particelle inalate

Le proprietà tecnologiche della formulazione, quali dimensioni, densità e forma, rappresentano un punto cruciale nello sviluppo di polveri secche per inalazione. Tali parametri sono determinanti per la definizione del diametro aerodinamico (d_{ae}) di una polvere. Il diametro aerodinamico di una polvere descrive il comportamento della polvere quando è sottoposta ad un flusso d'aria imposto dalla respirazione, da cui dipende la deposizione delle particelle inalate nelle regioni desiderate del polmone (Brain, 1979). Per definizione:

$$d_{ae} = d_v (\rho/\rho_o X)^{1/2} \quad (1)$$

dove d_v è il diametro volume geometrico, ρ è la densità, ρ_o è una densità di riferimento di 1 g/ml e, infine, X è un fattore dinamico legato alla morfologia, pari ad 1 per particelle sferiche. Nel caso di particelle di forma approssimativamente sferica si assume che:

$$\rho = \rho_s (1 - \varepsilon) \quad (2)$$

dove ρ_s è la densità vera misurata mediante picnometro, e ε è la porosità particellare. Una misura approssimativa di ρ come definita dall'equazione (2) si ottiene dalla densità apparente (Vanbever, 1999). La densità apparente della polvere dopo impaccamento può essere stimata sperimentalmente seguendo un saggio riportato in Farmacopea Ufficiale XII Ed.

Tra i parametri elencati le dimensioni geometriche sono sicuramente il fattore che maggiormente influenza il d_{ae} . Anche se tutte le particelle inalate generalmente si depositano sia nelle vie superiori che nelle regioni profonde del polmone, (Gonda, 1990) operando sulle dimensioni è possibile condurre le particelle ad un determinato sito. Particelle più grandi di 10 μm si depositano preferenzialmente

nelle vie aeree superiori, mentre particelle piccole possono attraversare le vie aeree superiori e depositarsi nelle inferiori (Figura 11).

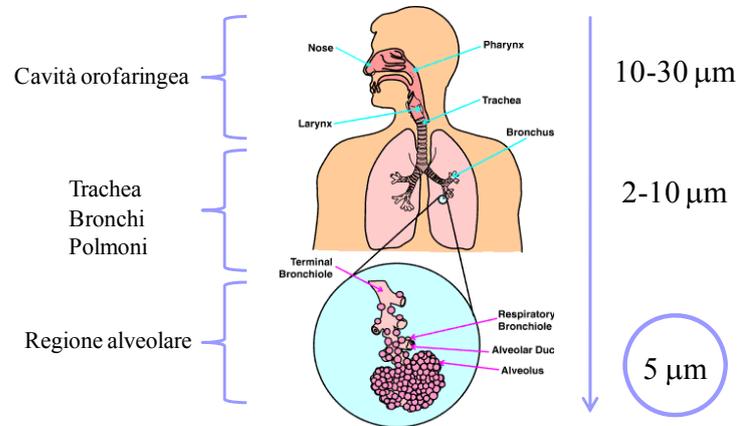


Figura 11. Effetto del d_{ae} della polvere sul sito di deposizione ai polmoni.

Un altro parametro importante nella determinazione del d_{ae} , come si evince dall'equazione (1), è la densità apparente della polvere. Due particelle, infatti, con uguale forma e diametro geometrico, ma con diversa densità, possono presentare due diametri aerodinamici molto differenti.

La forma delle particelle, infine, è molto importante nella manipolazione e nella scorrevolezza delle polveri. Ad esempio cristalli, dotati di forma irregolare, sono spesso coesivi mentre le sfere sono più scorrevoli. E' noto, inoltre, che a parità di diametro geometrico e densità il d_{ae} di una fibra è 2-3 volte maggiore di quello di una sfera (Figura. 12).

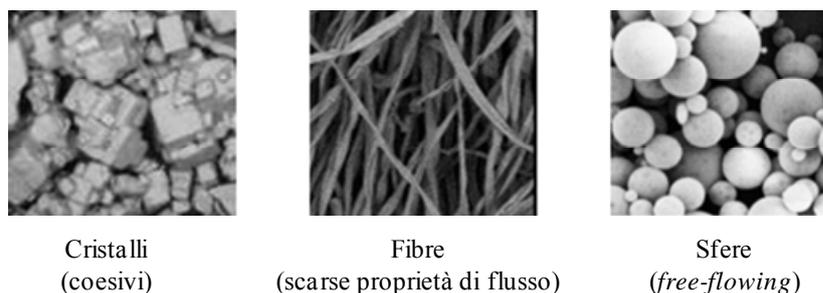


Figura 12. Effetto della forma delle particelle sulle proprietà di flusso di una polvere.

Il comportamento aerodinamico di una polvere, si può valutare sperimentalmente mediante studi di deposizione *in vitro*. Tali studi non sono finalizzati a definire come la polvere si distribuisce lungo il tratto respiratorio, ma permettono essenzialmente di avere una stima predittiva del diametro aerodinamico delle particelle che compongono la polvere. La complessità del tratto respiratorio, infatti, richiede che i risultati ottenuti da questi studi siano in ogni caso confortati da studi *in vivo* appropriati.

In Farmacopea Ufficiale Italiana XII Ed. sono riportati quattro diversi strumenti quale il Separatore ad urto in vetro (Twin-stage Impinger), il Separatore ad urto multistadio liquido (Multi-stage Liquid Impinger) il Campionatore di classificazione granulometrica “Andersen” (Andersen Cascade Impactor) (ACI), il Campinatore ad inerzia (Next Generation Impactor) (NGI).

Gli studi di deposizione *in vitro* riportati nel presente lavoro di tesi sono stati eseguiti mediante l’impiego del MSLI.



Figura 13. Separatore ad urto multistadio liquido (Multi-stage Liquid Impinger).

Tale apparecchio è costituito da un “*impactor*” formato da cinque stadi di separazione connessi tra loro in modo da costituire cinque camere di deposizione delle polveri. Ogni stadio presenta una piastra di separazione in vetro sinterizzato a diversa porosità andando dal primo all’ultimo stadio. Sono presenti, inoltre, una porta d’immissione che ospita il dispositivo contenente la polvere da testare ed un filtro di raccolta alla base dell’*impactor*. Il sistema è collegato con una pompa da vuoto ed un regolatore di flusso che consente di impostare il flusso dell’aria a 60 ± 5 l/min, mimando in questo modo la capacità polmonare.

Il procedimento di impiego del MSLI, come di tutte le altre apparecchiature, è riportato dettagliatamente in Farmacopea, e può variare a seconda del dispositivo di somministrazione utilizzato (nebulizzatore, inalatore pressurizzato o inalatore di polvere).

All’atto dell’erogazione, la diversa forma e dimensione delle particelle della polvere, nonché il flusso d’aria, consentono una deposizione delle stesse, in funzione del loro diametro aerodinamico, in una delle camere di deposizione.

1.3 Sistemi microparticellari per il rilascio modificato di farmaci al polmone

Attualmente, diverse strategie basate sull'impiego di *carrier* sono state studiate al fine di controllare il rilascio di farmaci nella terapia inalatoria (Cryan, 2005). Tali sistemi possono svolgere un ruolo fondamentale nella somministrazione polmonare di farmaci biotecnologici, in quanto potenzialmente in grado di migliorarne il profilo terapeutico in diversi modi:

- migliorando il trasporto del farmaco al relativo sito d'azione (intracellulare/extracellulare);
- permettendo il rilascio contemporaneo deposito di più proteine e/o peptidi;
- migliorando la stabilità della macromolecola *in vivo*;
- prolungando il tempo di permanenza della macromolecola al sito d'azione riducendone la *clearance*;
- diminuendo la distribuzione aspecifica del farmaco ai tessuti non bersaglio;
- diminuendo la tossicità del farmaco dovuta alle alte dosi iniziali;
- alterando l'immunogenicità della macromolecola;

Oggi vi è una maggiore conoscenza della fisiopatologia polmonare, delle basi molecolari delle malattie e delle barriere fisiologiche alla somministrazione di farmaci. Queste conoscenze, con i recenti miglioramenti nei dispositivi di somministrazione, hanno permesso lo sviluppo di sistemi di veicolazione avanzati e altamente specifici.

Nella terapia inalatoria, ad oggi, spiccano due differenti tipi di *carrier*: microparticelle di **natura lipidica** e microparticelle di **natura polimerica**.

Nell'ambito delle particelle di natura lipidica distinguiamo liposomi e particelle lipidiche.

I liposomi sono vescicole di natura fosfolipidica le cui dimensioni possono variare da 20 nm fino a pochi μm . La dimensione, la presenza di cariche superficiali, il numero di strati lipidici ed il metodo di preparazione dei liposomi possono modulare sia la quantità di farmaco incapsulato che la velocità di rilascio dal sistema. Al contrario, l'assorbimento dipende sia dalla composizione che dalle

dimensioni (Abra, 1990). In particolare, un diametro compreso in un *range* di 50-200 nm rappresenta una condizione ottimale per evitare la fagocitosi da parte dei macrofagi alveolari (Allen, 1998). In letteratura, sono riportati molti lavori il cui scopo è quello di arricchire la conoscenza di questo tipo di *carrier*. Stark e collaboratori hanno sviluppato un sistema liposomiale per la veicolazione polmonare di un peptide vasoattivo, dimostrando che tale *carrier* ha la capacità di preservare l'integrità strutturale del peptide proteggendolo dall'azione metabolica degli enzimi presenti a livello polmonare, migliorandone quindi l'emivita e l'attività biologica (Stark, 2008). Nonostante le continue ricerche in quest'ambito, ai sistemi liposomiali è tuttora associato un elevato costo di produzione, una elevata instabilità del farmaco ed una perdita di farmaco durante la preparazione e la nebulizzazione (Salama, 2009).

Le particelle di natura lipidica offrono una serie di vantaggi rispetto ai sistemi liposomiali propriamente detti. Esse, infatti, presentano una maggiore stabilità chimico-fisica, sono prodotte a costi ridotti e, quando allestite mediante tecniche specifiche di evaporazione del solvente, evitano la tossicità legata ai residui di solventi (Cortesi, 2002). Microparticelle a base lipidica sono state esaminate come *carrier* per la somministrazione polmonare di peptidi e proteine. In tal senso sono ad oggi oggetto di studio microparticelle porose a base lipidica (*Pulmosphere*), che hanno dimostrato risultati incoraggianti nella veicolazione polmonare di immunoglobulina umana (IgG) dopo instillazione nel topo (Bot, 2000) e, più recentemente, della tobramicina dopo somministrazione mediante DPI su 14 volontari sani (Newhouse, 2003). Cook e collaboratori, invece, hanno messo a punto un sistema costituito da nanoparticelle contenenti un farmaco idrofilo (terbutalina solfato) intrappolate, in uno step successivo, in microparticelle lipidiche (a base di DPPC), preparate mediante la tecnica dello spray-drying. Da tale studio è emerso che la presenza del *carrier* lipidico da un lato consente un controllo della velocità di rilascio del farmaco, in particolare nei primi 30 minuti di incubazione (non è stato osservato un'effetto *burst*), dall'altro il raggiungimento del sito *target* (e.g., regione alveolare) (Cook, 2005). È interessante notare che, nello sviluppo di un *carrier* per la veicolazione polmonare di farmaci, l'impiego della DPPC svolge un ruolo fondamentale non

solo come eccipiente in grado di modulare le caratteristiche tecnologiche del sistema, ma di ridurre anche i fenomeni di degradazione *in situ*. E' stato dimostrato, infatti, che la fagocitosi di microparticelle a base di PLGA da parte dei macrofagi alveolari è significativamente ridotta se alla formulazione iniziale si aggiunge la DPPC (Evora, 1998).

Un altro tipo di *carrier* per la somministrazione polmonare di peptidi e proteine che sta guadagnando popolarità è rappresentato da microparticelle polimeriche. Tali sistemi sono fisicamente e chimicamente più stabili dei liposomi e delle particelle lipidiche, permettono un carico maggiore del farmaco e sono, quindi, un sistema di trasporto utile per macromolecole (Ehrardt, 2002).

Un primo studio è stato condotto da Lai e collaboratori, i quali hanno sviluppato microsfele biodegradabili a base di PLGA per il rilascio modificato di β_2 agonisti, quale l'isoprenalina, per il trattamento dell'asma e dell'ostruzione polmonare cronica (COPD) (Lai, 1993). Al fine di valutare l'efficacia terapeutica di tali sistemi, è stato condotto uno studio *in vivo*, su cinque gruppi di ratti (n=8), a ciascun gruppo, mediante instillazione intratracheale, è stato somministrato: I) una dose di 0,1 mg/kg di microsfele contenenti isoprotenerolo (Iso-PGL); II) isoprotenerolo in forma libera (Iso); III) microsfele non cariche; IV) microsfele non cariche in associazione con isoprotenerolo (Iso); V) controllo. In seguito alla somministrazione è stato, quindi, valutato il flusso espiratorio al 50% della capacità polmonare ($V^0_{\max 50}$). Come mostrato in figura 14, somministrando isoprotenerolo in forma libera, microsfele non cariche ed un' associazione di microsfele non cariche con Iso (gruppo II, III e IV), il farmaco ha un effetto rapido e dopo solo 3 ore si ha un fenomeno di broncocostrizione paragonabile al gruppo controllo. Al contrario nel caso del gruppo I, ovvero somministrando microsfele contenenti Iso, l'azione del farmaco si protrae per un circa 12 ore, a conferma dell' ottima capacità del PLGA di controllare la velocità di rilascio del farmaco al polmone, e soprattutto di proteggere il farmaco dall'azione degli enzimi presenti *in situ* (Lai, 1993).

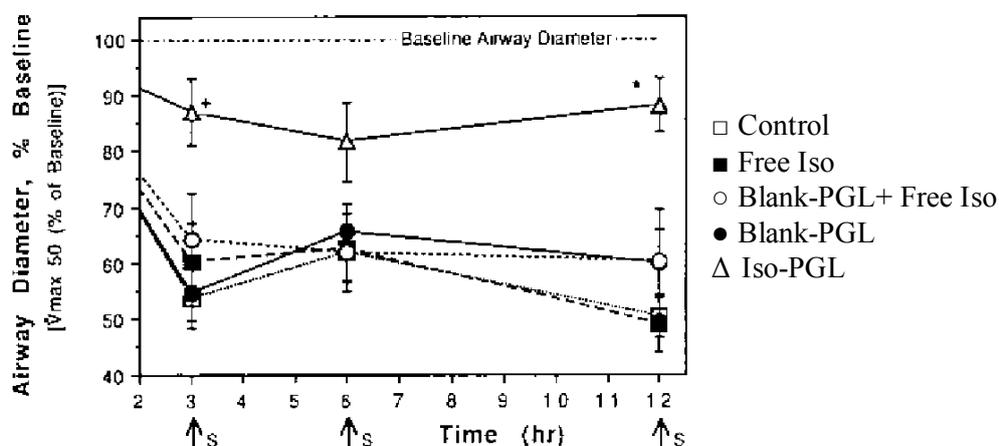


Figura 14. Studio *in vivo* con valutazione del flusso espiratorio al 50 % della capacità polmonare ($V_{\max 50}^0$) su cinque gruppi di animali.

Alcuni esempi di microparticelle a base di PLGA per il rilascio controllato di farmaci nel *delivery* polmonare sono documentati in letteratura (Suarez, 2001; Tomoda, 2005 Ungaro 2006).

Per tutti i *carrier* descritti un punto cruciale da tenere in debita considerazione è la sicurezza di impiego. I *carrier* (liposomi, particelle lipidiche, particelle polimeriche) possono essere incompatibili con il tessuto polmonare. I liposomi cationici, per esempio, che hanno guadagnato successo per la somministrazione di materiale genico, inducono tossicità polmonare mediata da radicali dell'ossigeno (Dokka, 2000). E' stato, inoltre, osservato che l'inalazione prolungata delle particelle di *carrier* determina il reclutamento di cellule fagocitarie (e.g. macrofagi alveolari), annullando di conseguenza l'effetto del *carrier*. Al fine di superare questa limitazione è stato progettato e sviluppato un sistema *carrier* caratterizzato dalla presenza di microparticelle polimeriche porose di grandi dimensioni, meglio conosciute come *Large Porous Particles* (LPP), che in ragione delle loro grandi dimensioni sfuggono all'azione fagocitaria dei macrofagi alveolari determinando un aumento della biodisponibilità (Edwards, 1997).

1.3.1 Large Porous Particles a base di PLGA

Le LPP sono particelle di natura polimerica, la cui peculiarità è la elevata porosità che consente di modularne le caratteristiche tecnologiche/aerodinamiche. Esse pur essendo molto grandi (i.e. elevato d_v), in ragione della loro porosità presentano una bassa densità ($\leq 0,04$ g/ml), e di conseguenza un diametro aerodinamico (d_{ae}) in un *range* di 5-10 μm (Figura 15) (Edwards, 1998).

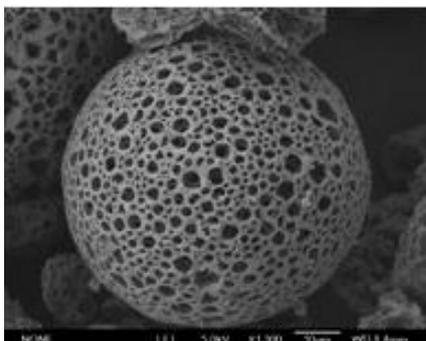


Figura 15. Large Porous Particles con bassa densità ($\rho=0,04$ g/ml), elevato diametro geometrico ($d_v= 5-30$ μm), e un diametro aerodinamico (d_{ae}) di 5-10 μm .

E' noto che particelle con un diametro geometrico ≤ 5 μm non solo presentano scarse proprietà di flusso (Hunter, 2002), in quanto tendono a dare fenomeni di aggregazione (Edwards, 1998) dovute alle forze elettrostatiche ed alle forze di Van der Waals, ma sono anche preferenzialmente fagocitate dai macrofagi alveolari (Jones, 2002). Sono due, pertanto, i vantaggi derivanti dall'impiego di LPP nella veicolazione polmonare di farmaci: i) una riduzione dei fenomeni di aggregazione durante l'aerosolizzazione della polvere; ii) una ridotta *clearance* in vivo mediata dai macrofagi alveolari (Rudt, 1993; Tabata, 1988, Edwards, 1998).

Le LPP possono essere prodotte mediante l'impiego di diverse tecniche. La tecnica più opportuna viene solitamente selezionata in base alle proprietà chimico-fisiche della molecola da incapsulare nonché all'impiego cui le particelle sono destinate (Benoit, 1996). Tra le tecniche più utilizzate sono d'annoverarsi

l'essiccamento per nebulizzazione o spray-drying e l'emulsione multipla-evaporazione del solvente.

La produzione di LPP mediante la tecnica dello spray-drying prevede l'utilizzo di diversi eccipienti, quali la DPPC o l'albumina, che presentano ottime proprietà aerodinamiche (Ben-Jebria,1999; Vanveber, 1999). Ben-Jebria e collaboratori, ad esempio, hanno sviluppato un sistema poroso contenente una combinazione di albumina sierobovina (18 % in peso), lattosio (18%), DPPC (60%) ed albuterolo solfato (4%). Gli studi *in vivo* hanno dimostrato che tali sistemi, rispetto al farmaco in forma libera, hanno la capacità di prevenire la broncocostrizione per un tempo maggiore (circa 16 ore), per questo motivo rappresentano un valido approccio terapeutico nel trattamento dell'asma.

Le limitazioni associate a questa metodica di preparazione sono ad oggi ancora molte, pur consentendo l'ottenimento di particelle con caratteristiche aerodinamiche favorevoli per l'inalazione. Particelle preparate per spray-drying, composte da una miscela di farmaco, zuccheri, proteine ed eccipienti, infatti, non consentono un rilascio controllato nel tempo. La dissoluzione di zuccheri e proteine in un ambiente acquoso potrebbe essere responsabile di un rilascio immediato del farmaco (Yang, 2009).

Tale problematica può essere superata mediante LPP di natura polimerica che possono essere agevolmente preparate mediante la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente ($A_i/O/A_e$). In questo caso, al fine di ottenere microparticelle polimeriche porose è richiesta l'aggiunta alla formulazione iniziale di un agente porosigeno.

Numerosi sono gli agenti, che aggiunti alla preparazione, garantiscono la formazione di pori superficiali, ad esempio oli (Arnold, 2007), zuccheri, e agenti osmoticamente attivi (sali, ciclodestrine) (Lee, 2007; Kwon, 2007).

Gli oli, addizionati alla fase organica (O) della doppia emulsione, danno strutture particellari porose. Arnold e collaboratori, nello specifico, hanno studiato l'effetto di due tipi di oli, olio di silicone e olio di canola, sulle caratteristiche morfologiche e tecnologiche delle LPP. Da questo studio è risultato che il tipo di olio impiegato determina una differente morfologia delle particelle. L'olio di canola, infatti, porta alla formazione di particelle poco porose, con pori

superficiali leggermente incavati (Figura 16 A). L'impiego dell'olio di silicone, invece, determina la formazione di particelle con pori ben distribuiti lungo l'intera superficie (Figura 16 B). In entrambi i casi, le LPP sviluppate presentavano proprietà aerodinamiche ottimali per la somministrazione polmonare di farmaci (Arnold 2007). Gli aspetti tossicologici, tuttavia, connessi a queste formulazioni meriterebbero un approfondimento, trattandosi di eccipienti oleosi ad oggi approvati solo per uso esterno.

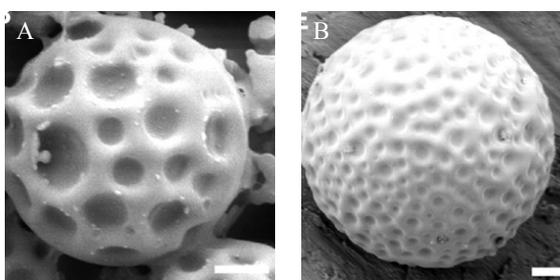


Figura 16. Immagine SEM di LPP preparate mediante la tecnica dell'emulsione multipla evaporazione del solvente mediante l'aggiunta in O di: A) olio di canola; B) olio di silicone. (Arnold, 2007).

Una strategia alternativa per ottenere LPP è quella di impiegare agenti osmoticamente attivi che addizionati alla fase acquosa interna della doppia emulsione, generano un gradiente osmotico tra le due fasi acquose dell'emulsione multipla. Sotto l'influenza di tale gradiente, la fase organica della doppia emulsione $A_i/O/A_e$ agisce come una membrana semipermeabile, permettendo il passaggio dell'acqua dalla fase acquosa esterna a quella interna (Figura 17). Quest'influsso di acqua avviene più velocemente rispetto alla coacervazione, pertanto l'acqua rimane ancora nelle microparticelle, causando la formazione di pori superficiali. Allo stato solido, poi, le catene polimeriche non sono libere di muoversi e ricostruire una struttura compatta, pertanto, i pori persistono anche dopo l'essiccamento (Pistel, 2000).

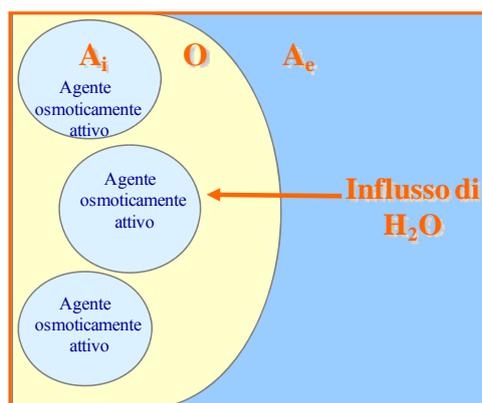


Figura 17. Rappresentazione schematica dell'aggiunta di un agente osmoticamente attivo nella fase acquosa interna della doppia emulsione. (A_i =fase acquosa interna; O =fase organica; A_e = fase acquosa esterna).

Tra gli agenti osmoticamente attivi, il cloruro di sodio (CS) è stato utilizzato per ottenere LPP. Quando tali sistemi erano intesi per la veicolazione di peptidi e proteine, è stato necessario tenere in debita considerazione che l'aggiunta di CS poteva causare destabilizzazione del farmaco di natura proteica. La presenza di sale determina, inoltre, un aumento delle dimensioni e della porosità delle particelle, mentre l'efficienza di incapsulazione e la densità apparente diminuisce. In queste condizioni, infine, il profilo di rilascio è caratterizzato da una fase iniziale in cui parte del farmaco è rilasciato a causa della elevata porosità delle particelle (Pistel, 2000). È stato evidenziato da Pistel e collaboratori che per superare tali problematiche, è necessario l'aggiunta di una opportuna quantità di sale nella fase acquosa esterna (Pistel, 2000).

Le potenzialità delle LPP sono state ampiamente valutate nella terapia inalatoria, come riportato nella tabella 3.

Tabella 3: LPP sviluppate per la terapia inalatoria.

Tipo di polimero	Tecnica di preparazione	Agente Porosigeno	Farmaco Caricato	Diametro aerodinamico (μm)	Principali Autori
PLA	Wi/O/We ^a	NaCl	Albumina siero bovina	-	Pistel, 2000
PLGA	CO ₂ SC ^b	HP β CD	Deslorelina	-	Koushik, 2004
Polossamero 188	Spray-drying	CaCl ₂	Salbutamolo solfato	-	Stekel, 2004
PLGA	W/O	Pluronic F127	Ormone Umano della crescita (rhGH)	-	Kim, 2006
PLGA	Wi/O/We ^a	HP β CD	Insulina	5-14	Ungaro, 2006
PLGA	Wi/O/We ^a	-	Capreomicina solfato	8-10	Giovagnoli, 2007 *
PLGA	Spray-drying	Olii	Ciprofloxacina	10-15	Arnold, 2007
PLGA	Wi/O/We ^a	SBE-CD	Albumina siero bovina	5-15	Know, 2007
-	Spray-drying	-	Capreomicina solfato	4-5	Contreras, 2007**
PLGA	Wi/O/We ^a	Span 60/ PEI	Eparina a basso peso molecolare	3-7	Rawat, 2008
PLGA	Wi/O/We ^a	NH ₄ HCO ₃	Lisozima /Doxorubicina HCl	4-5	Yang, 2009

^a = Tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente.

^b = Tecnica dei fluidi supercritici.

** = In questo caso la formazione dei pori è stata attribuita alla rapida evaporazione del solvente.

** = In questo caso le LPP sono state preparate con l'80% di farmaco ed il 20% di L-leucina in etanolo.

In tutti i casi descritti, il polimero di elezione è il PLGA, in ragione della sua approvata biocompatibilità e biodegradabilità, che ne ha determinato ad oggi il suo impiego clinico nelle formulazioni iniettabili. Risultati preliminari sulla tossicità polmonare del PLGA, risultano ad oggi, molto promettenti (Dailey, 2006; Suarez, 2001), tuttavia sono necessari studi approfonditi in grado di chiarire i fenomeni di tossicità fisiologica e/o immunologica ad essi associati (Hunter, 2002).

CAPITOLO I

***Large Porous Particles* contenenti ciclodestrine per
la veicolazione polmonare di insulina**

2. Introduzione

Nel corso degli ultimi anni, un crescente interesse della ricerca è stato rivolto alla via polmonare, quale via di somministrazione non invasiva per l'assorbimento sistemico dell'insulina nel trattamento del diabete (Brain, 2004; Cefalu, 2004).

Sia nel diabete di tipo 1 che di tipo 2 una terapia ideale sarebbe quella di eseguire un'unica somministrazione di insulina in modo da mantenere il glucosio a livello basale nell'arco di 24 ore.

Lo sviluppo di un sistema di veicolazione (*carrier*) in grado proteggere e trasportare l'insulina al polmone permettendo, poi, un assorbimento sistemico della proteina costituisce per i ricercatori ben più di una sfida. La maggior parte dei sistemi *carrier* non sono autorizzati per l'impiego su esseri umani e molti sono soltanto nelle fasi iniziali di sviluppo. Considerando che il sistema *carrier* da sviluppare deve essere inteso per la somministrazione di insulina in forma di polvere secca, diventa cruciale la scelta del tipo di dispositivo DPI e l'individuazione delle opportune condizioni formulative (che modulano le caratteristiche tecnologico-aerodinamiche del sistema). Tra i sistemi *carrier* a base di polimeri sintetici in grado di veicolare molecole di natura proteica, le *Large Porous Particles* rappresentano una promettente strategia formulativa. L'abilità delle LPP di raggiungere le regioni profonde del polmone, dove avviene l'assorbimento sistemico dell'insulina, consentirebbe di migliorarne il profilo terapeutico, conferendole un'attività ipoglicemica a lungo termine (Malik, 2007; Kumar, 2006). Le LPP, inoltre, rilasciando la proteina direttamente nel sito d'azione (i.e regione alveolare), diminuiscono la distribuzione aspecifica del farmaco nei tessuti non bersaglio.

2.1. *Insulina nel trattamento del diabete: funzione e caratteristiche*

Ad oggi risulta che circa 194 milioni di persone, nel mondo, sono affetti dal diabete, ed è stato stimato che il numero di persone con il diabete raddoppierà nel 2030 (International Diabetes Federation).

Il diabete è una patologia legata ad un *deficit* nella produzione e nella attività di insulina. L'insulina è un ormone pancreatico prodotto dalle cellule β delle isole di Langerhans, che regola il metabolismo del glucosio. Nel diabete di tipo I, che è caratterizzato da una ridotta produzione di insulina da parte delle cellule β del pancreas, l'iniezione di insulina rappresenta la terapia primaria (Leahy, 2002). L'iniezione di insulina è fondamentale anche nel trattamento terapeutico del diabete di tipo II, il quale vede sia una disfunzione periferica dell'insulina che un difetto nella sua produzione (Leahy, 2002).

L'insulina è una macromolecola con un peso molecolare di circa 6000 daltons, e consiste di 51 residui aminoacidici distribuiti in due catene polipeptidiche legate da due ponti disolfuro (Figura 18).

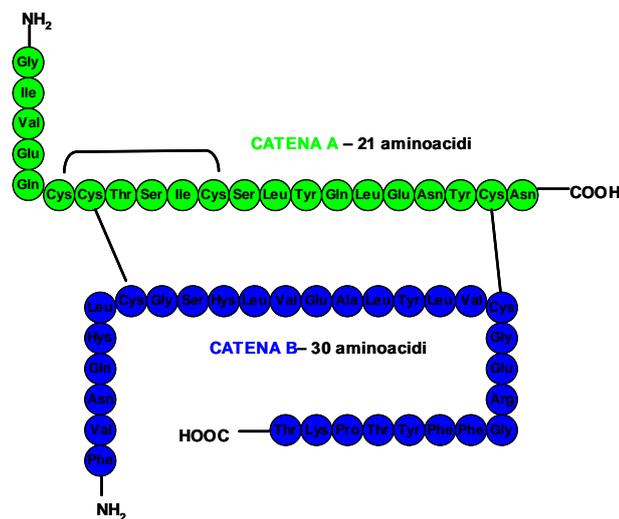


Figura 18. Struttura primaria dell'insulina umana.

E' stato ampiamente evidenziato che il controllo dell'iperglicemia associata al diabete di tipo I e di tipo II, diventa cruciale per l'attenuazione di tutte le complicazioni macrovascolari e microvascolari associati a tale patologia, che includono danno nervoso, perdita della funzionalità renale ed accelerazione cardiovascolare (Owens, 2002; Leahy, 2002). A partire dalla prima insulina iniettabile, scoperta circa 80 anni fa, lo scopo era quello di superare principalmente tali complicazioni.

L'insulina iniettabile è presente in commercio in diverse formulazioni che variano per insorgenza e durata d'azione (Tabella 4).

Tabella 4. Effetto della formulazione dell'insulina sulla sua farmacocinetica a seguito d'iniezione sottocutanea (Florence, 2002).

Prodotto^a	Formulazione	Farmacocinetica^b
Humulin [®] R Novolin [®] R	Sospensione acida di Zn-Insulina cristallina (<i>regular</i>)	Rapido onset, breve durata Inizio: 0,5h; picco: 2,5-5h; fine: 8h
Humulin [®] R Novolin [®] R	Sospensione di protamine, Zn-Insulina cristallina (<i>isophane</i>) (tampone acquoso per l'iniezione)	Azione intermedia, onset più lento, più lunga durata d'azione dell'ins. normale Inizio: 1,5h; picco: 4-12h; fine: fino a 24h
Humulin [®] 70/30 Novolin [®] 70/30	Sospensione (70%) Zn cristallina (30%)	Azione intermedia, onset più rapido, durata d'azione più lunga Inizio: 0,5h; picco: 2-12h; fine: fino a 24h
Humulin [®] U	Sospensione Zn-insulina - (<i>extended</i>) tutta cristallina	Azione lenta, onset lento, durata d'azione più lunga e meno intensa rispetto alle forme R o N
Humulin [®] L Novolin [®] L	Sospensione cristallina di Zn-insulina (70%), insulina amorfa (30%) (sospensione torbida)	Azione intermedia, onset più lento, durata d'azione più lunga Inizio: 2,5h; picco: 7-15h; fine: 22h
Humolin [®] BR	Zn-insulina cristallina dissolta in tampone difosfato sodico	Rapido onset, breve durata Uso solo in pompe

^aLe specialità contengono insulina umana ricombinante

^bL'onset dei livelli terapeutici di insulina si riferisce all'inizio dell'effetto; il massimo livello d'insulina nel siero è riferito al picco plasmatico e la fine dell'effetto terapeutico è considerato il tempo al quale i livelli d'insulina sono sotto i livelli terapeutici.

Negli anni passati sono stati sviluppati diversi sistemi per il rilascio controllato e/o sostenuto dell'insulina, tra cui vanno citati gli iniettabili a lunga durata d'azione, ottenuti mediante complessazione dell'insulina con zinco e proteine basiche (protamina, isofano o globina), o cristallizzazione del complesso Zn-insulina in

particolari condizioni di pH. Anche se queste formulazioni hanno in qualche modo sortito un effetto positivo sulla farmacocinetica della proteina, che comunque può variare fortemente da individuo a individuo, nessuno di questi sistemi riesce a superare le 24 h per durata d'azione (Tabella 4). Lo sviluppo di nuove formulazioni d'insulina è al momento fortemente ostacolato dalla sua scarsissima stabilità intrinseca sia essa di natura fisica (i.e aggregazione, adsorbimento) (Brange, 1997) che chimica (i.e idrolisi del legame ammidico, reazioni di ossidazione, polimerizzazione).

2.1.1. Instabilità fisica

Molte proteine si auto-associano in soluzione acquosa per formare oligomeri. L'insulina esiste in soluzione come una miscela di monomero, dimero, tetramero, esamero, e probabilmente stati di associazione di grado maggiore, che si trovano in equilibrio dinamico. Diversi fattori, quali concentrazione dell'insulina, pH e tipo di solvente, possono intervenire sull'equilibrio modificandolo (Pocker, 1980). L'insulina umana è comunemente formulata quale complesso di coordinazione con lo zinco, in forma esamerica. L'esamero si forma per associazione di tre dimeri ed è stabilizzato da 2-4 ioni zinco. L'esamero zinco-insulina, a seguito di somministrazione sottocutanea, si dissocia lentamente in dimero, e quindi in monomero, la forma prontamente assorbibile in vivo (Kang, 1991) (Figura 19).

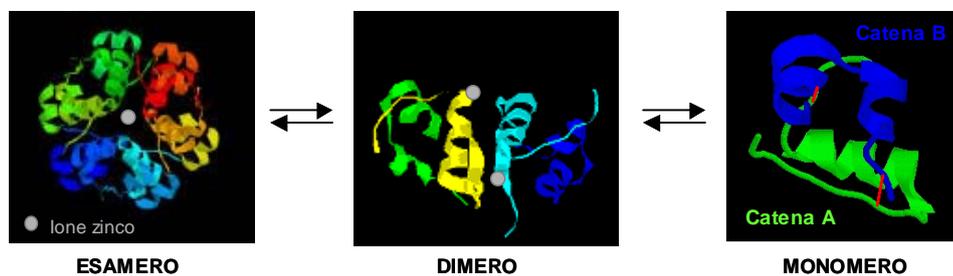


Figura 19. I diversi stati di auto-associazione dell'insulina in soluzione.

In molti casi è preferibile prevenire l'associazione in modo da avere nella formulazione solo monomeri e dimeri e quindi ottenere un assorbimento più rapido. Qualora non coordinata con zinco, l'insulina è prevalentemente dimerica a basse concentrazioni in un intervallo di pH 2-8 e si associa in tetramero a concentrazioni più elevate (>1,5 mg/mL). Il peptide è conformazionalmente stabile a pH acido ed ad elevate temperature; in acido acetico al 30% (v/v) è prevalentemente in forma monomerica (Nielsen, 2001).

L'auto-associazione delle proteine in generale, e quindi dell'insulina, è un processo reversibile, nel senso che una modifica delle proprietà del solvente può ricostituire in soluzione la forma monomerica nativa. È importante distinguere il caso in cui il processo è reversibile ed il caso in cui il processo di aggregazione prevede la formazione irreversibile di aggregati in soluzione. La produzione di precipitati "amorfi" o "cristallini" può essere evitata adottando opportune precauzioni. Più difficile, invece, è limitare la tendenza dell'insulina a formare fibrille, aggregati lineari biologicamente inattivi. La fibrillazione dell'insulina può essere causata dall'esposizione dell'insulina a temperature elevate, bassi pH, solventi organici ed agitazione meccanica (Schwendeman, 1996). È stato recentemente descritto in letteratura il meccanismo molecolare attraverso cui ha luogo la formazione di fibrille d'insulina (Figure 20). In particolare sembra che le interazioni che portano alla formazione di fibrille siano dovute alla forma monomerica. La fibrillazione passerebbe attraverso la formazione di un monomero d'insulina trasformato conformazionalmente, in cui le zone idrofobiche, comunemente nascoste nel dimero e nell'esamero, sono esposte al solvente (Nielsen, 2001).

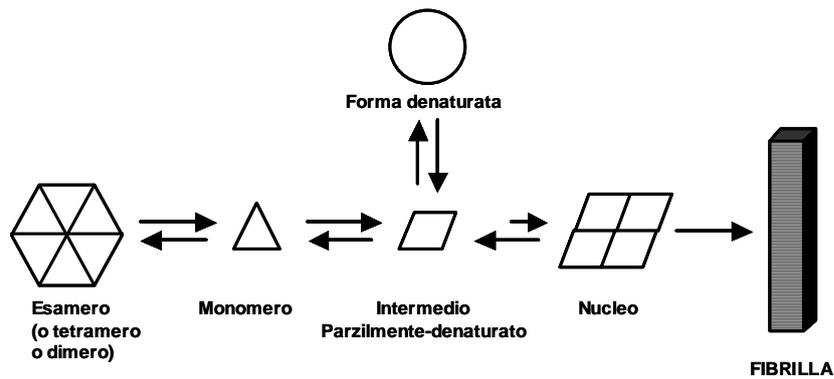


Figura 20. Meccanismo molecolare proposto per il processo di fibrillazione dell'insulina.

Il dicroismo circolare (CD) è una forma di spettroscopia ottica estremamente sensibile per identificare la struttura delle proteine. Questa tecnica può essere usata per studiare la struttura secondaria e terziaria delle proteine e dare informazioni circa i cambiamenti strutturali che si verificano a seguito di interazioni molecolari o da fattori quali temperatura, pH, ed agenti dissocianti.

Il CD, generalmente, si misura tra 180 e 250 nm, comunemente nota come regione del lontano UV.

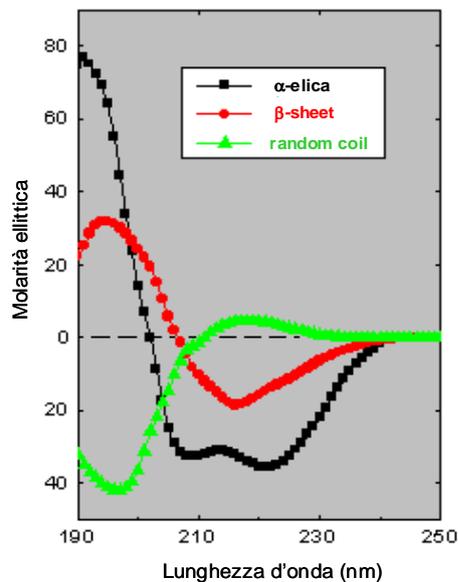


Figura 21. Le tre componenti principali dello spettro CD di una proteina.

Lo spettro dell'insulina nativa in soluzione acquosa mostra tre bande negative (Figura 21):

- ✓ banda a 208 nm: attribuita principalmente alle α -eliche (Ettinger, 1971) formate tra i residui aminoacidici B10-B19, A2-A6, e A13-A19, una caratteristica tipica del monomero.
- ✓ banda a 222 nm: derivante in parte dalla struttura α -elica, ma assegnata alla struttura β *sheet*, che predomina nella forma dimerica della proteina (Ettinger, 1971; Oliva, 1997).
- ✓ banda a 275 nm: assegnata alla presenza di residui di tirosina e fenilalanina (Brange, 1988). Generalmente si ritrova in quelle condizioni che promuovono l'auto-associazione dell'insulina.

Nel caso in cui l'insulina vada incontro a fenomeni di aggregazione irreversibile e formi fibrille in soluzione, il fenomeno può essere studiato monitorando il grado di torbidità della soluzione. Infatti, l'apparenza fisica di una soluzione contenente fibrille d'insulina, a concentrazioni minori o uguali a 2 mg/ml, è quella di un liquido viscoso contenente aggregati visibili, mentre a concentrazioni più elevate si può osservare un gel compatto e torbido (Nielsen, 2001). In entrambi i casi, la torbidità della soluzione aumenterà all'aumentare dello stato di aggregazione della proteina. La torbidità della soluzione può essere monitorata mediante spettrofotometria UV-Vis a 350 nm, lunghezza d'onda a cui l'insulina non assorbe (Figura 22).

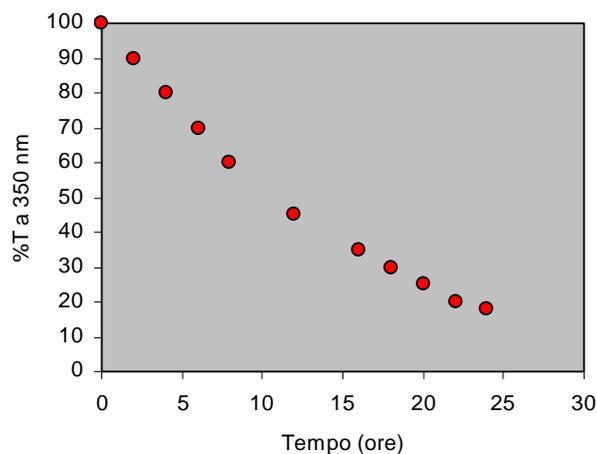


Figura 22. Trasmittanza percentuale in funzione del tempo di una soluzione d'insulina durante la sua progressiva fibrillazione.

2.1.2. Instabilità chimica

L'esposizione dell'insulina a condizioni di pH acido (pH 1,6) e ad elevate temperature può risultare in una significativa degradazione chimica della molecola. E' stato osservato che il peptide può essere soggetto ad una reazione di transamidazione con formazione di un dimero covalente (Darrington, 1995). Tuttavia, il principale prodotto di degradazione dell'insulina a pH acido è rappresentato dalla desamidoinsulina, formata per deammidazione del residuo asparaginic in posizione 21 della catena A della molecola (AsnA21). A valori di pH più elevati, in mezzo acquoso leggermente acido o basico, la deammidazione del residuo asparaginic in posizione 3 della catena B (AsnB3) sembra essere predominante (Brange, 1993) La desamidoinsulina è normalmente presente quale impurezza in tutte le formulazioni commerciali d'insulina ed è contemplata fino ad una percentuale massima pari al 5% (USP 31).

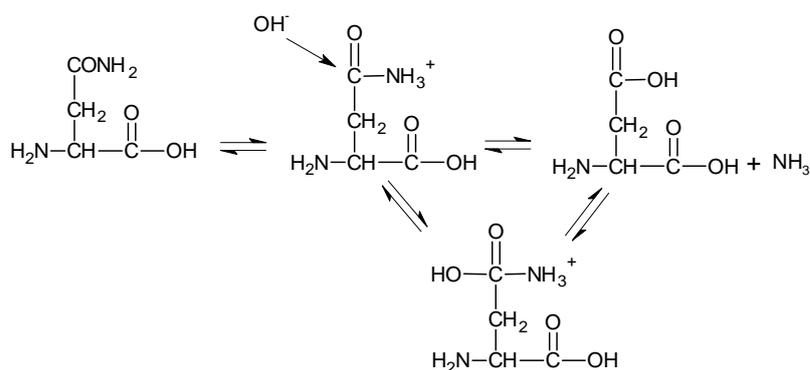


Figura 23. Meccanismo della reazione di deammidazione del residuo asparaginic.

L'HPLC a fase inversa (RP-HPLC) è una valida metodica per la simultanea rivelazione di insulina e del suo prodotto di deaminazione, mentre l'HPLC ad esclusione molecolare (SE-HPLC) consente di distinguere agevolmente l'insulina dai suoi derivati solubili a differente peso molecolare (Oliva, 2000).

2.2. *Insulina per via inalatoria*

Negli ultimi anni sono state sviluppate diverse strategie al fine di ottenere un approccio terapeutico che fosse vantaggioso rispetto alla terapia insulinica iniettiva. Nel 1970 è stata scoperta una pompa sottocutanea ad infusione continua (Rupp; 1982; Schade, 1982). Questa tecnologia consente un controllo rigoroso dei livelli di glucosio. Tuttavia, nonostante i progressi fatti negli ultimi anni, tesi a rendere questa pompa leggera, piccola, sicura e di facile utilizzo (Heller, 2007), il suo impiego è limitato alla possibilità di rottura della riserva, ostruzione o rottura del condotto di trasporto del farmaco, precipitazione interna dell'insulina e rottura del sistema di pompaggio (Lougheed, 1983). Vi è, inoltre, la necessità di un intervento chirurgico per l'impianto e la successiva rimozione del sistema quando tutto il farmaco è stato completamente rilasciato (Brown, 1983).

Una strategia completamente diversa è rappresentata da Exubera che nel gennaio del 2006 è stata la prima insulina in forma di polvere per inalazione ad azione rapida, a ricevere l'autorizzazione da parte della *Food and Drug Administration* FDA per il trattamento del diabete di tipo 1 e di tipo 2, in USA ed Europa. Realizzata da Nektar Therapeutics e cosviluppata da Pfizer e Sanofi-Aventis, consiste di particelle con un diametro di 1-5 μm preparate mediante la tecnica dello spray-drying, a partire da insulina umana ricombinante, e dispensata in blister in combinazione con un DPI (Figura 24).



Figura 24. Exubera: insulina umana ricombinante inalabile.

Ciascun blister contiene da 1 a 3 mg di insulina, per un totale di polvere di circa 5 mg per la presenza di mannitolo, glicina e sodio citrato. Una singola dose rilascia l'equivalente di 3 UI o 9 UI dell'insulina sottocutanea, rispettivamente. (Barnett, 2004). L'efficacia di Exubera è stata studiata in circa 2500 pazienti adulti con diabete di tipo 1 e di tipo 2.

Negli studi clinici è stato osservato che la concentrazione di picco di insulina dopo somministrazione di Exubera è raggiunta più rapidamente rispetto alle altre insuline somministrate per via endovenosa. I livelli di picco di insulina sono stati raggiunti mediamente in 49 minuti (*range*: 30-90 minuti) con Exubera contro i 105 minuti delle altre insuline (*range*: 60-240). La sicurezza di Exubera a livello polmonare è stata dimostrata da studi *in vivo* sia sui ratti che sulle scimmie; l'insulina inalata risulta ben tollerata e non sono state evidenziate lesioni a livello del parenchima polmonare (Brinda, 2002)

Malgrado i numerosi vantaggi che Exubera presenta rispetto alle altre insuline, la Pfizer ha annunciato il suo ritiro dal commercio per ragioni di ordine economico, in quanto Exubera ha fallito nel guadagnare la fiducia di pazienti e medici.

Recentemente hanno guadagnato enorme popolarità sistemi microparticellari a base di PLGA capaci di combinare l'abilità della polvere di raggiungere le regioni profonde del polmone (i.e alveoli) con un'attività terapeutica a lungo termine (Kumar, 2006; Malik, 2007). In particolare, tali *carrier* non solo aumentano la quantità di proteina che raggiunge il sito d'azione e prolungano il suo tempo di residenza *in situ*, ma migliorano anche la stabilità *in vivo* della macromolecola, riducendo la tossicità causata dall'immunogenicità della proteina o delle sue elevati dosi iniziali (Cryan, 2005).

Il successo che hanno riscosso questi tipi di *carrier* è legato al fatto che possono essere sviluppati in maniera differente in forma di *aerosol* prendendo in considerazione importanti criteri quali: I) basso MMAD al fine di dirigere le particelle nella regione profonda del polmone; II) ridotta area superficiale di contatto in modo da ottenere una polvere con ottime proprietà di flusso e disperdibilità. Come già discusso, la migliore *performance* di un *aerosol* può essere ottenuta impiegando *Large Porous Particles* (LPP), che in ragione della loro porosità, presentano un MMAD inferiore rispetto al diametro geometrico

(dv), facilitando la loro deposizione nelle regioni profonde del polmone (Edwards, 1997). A causa della loro dimensioni, inoltre, le LPP riescono a sfuggire all'azione fagocitaria dei macrofagi alveolari permettendo un rilascio dell'insulina inalata nel torrente circolatorio per un lungo periodo di tempo (Edwards, 1997).

Le LPP, come discusso precedentemente, si preparano principalmente mediante la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente generando un gradiente di pressione osmotica tra la fase acquosa interna e la fase acquosa esterna della doppia emulsione (i.e. sali) (De Rosa, 2008). Nel caso dell'insulina, l'uso di sali (e.g. NaCl) nella fase acquosa interna può essere causa di precipitazione/agggregazione/inattivazione della proteina in funzione del tipo di sale e della sua concentrazione (Brange, 1997; Perez, 2003). Le ciclodestrine (CD), oligomeri ciclici del glucosio, note in campo farmaceutico come stabilizzanti e solubilizzanti, rappresentano un metodo alternativo ai sali per ottenere LPP. Le CD, infatti, in soluzione acquosa generano una pressione osmotica funzione della struttura chimica e il grado di sostituzione molare della CD (Zannou, 2001). Inoltre, in ragione della loro capacità di formare complessi con molte proteine, le CD possono agire da agenti stabilizzanti nei confronti della macromolecola da incapsulare (Duchene, 2007; Brewster, 2007).

Alla luce di tali considerazioni, nei laboratori presso cui è stato condotto questo lavoro di tesi, sono state recentemente sviluppate LPP a base di PLGA contenenti HP β CD per il rilascio modificato di proteine al polmone (Ungaro, 2006). Lo studio tecnologico-formulativo suggerisce che le proprietà delle LPP dipendono fortemente dalla quantità di HP β CD ed insulina aggiunte al sistema. In condizioni formulative opportune, tuttavia, è possibile ottenere LPP a base di PLGA dalle proprietà aerodinamiche ottimizzate, in grado di rilasciare contemporaneamente l'eccipiente e la proteina per tempi prolungati.

2.3. Impostazione della ricerca

Il lavoro oggetto di questa tesi si inserisce nell'ambito di un tema di ricerca, attualmente in corso di svolgimento presso i laboratori di Tecnologia Farmaceutica del Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, riguardante lo sviluppo di nuovi sistemi di veicolazione per il rilascio di farmaci al polmone. Nel corso del primo anno di attività, l'obiettivo è stato quello di valutare le potenzialità applicative di *Large Porous Particles* (LPP) per la veicolazione polmonare di insulina.

E' stato condotto uno studio approfondito di tipo tecnologico-formulativo del sistema neo-sviluppato confortato, poi, da studi farmacologici condotti in collaborazione con il *Dipartimento di Farmacologia Sperimentale* di questa Università, finalizzati ad individuare il sito di deposizione *in vivo* delle LPP e l'attività ipoglicemica dell'insulina rilasciata dalle microsfele.

Il lavoro sperimentale si è articolato in più fasi successive:

- ✓ Allestimento delle LPP mediante la tecnica dell'emulsione-multipla evaporazione del solvente;
- ✓ Caratterizzazione del sistema poroso per morfologia (Microscopia elettronica a scansione), dimensioni (Granulometria laser), tassi d'incapsulazione e cinetiche di rilascio dell'insulina nei fluidi polmonari simulati;
- ✓ Valutazione dell'integrità chimica e conformazionale del peptide durante la fase di preparazione e d'impiego del sistema combinando diverse tecniche analitiche quali Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), e Dicroismo Circolare (CD);
- ✓ Valutazione delle proprietà aerodinamiche e di flusso della polvere;
- ✓ Valutazione del sito di deposizione della polvere mediante studi di deposizione *in vivo*;
- ✓ Valutazione dell'attività ipoglicemica dell'insulina rilasciata dal sistema mediante studi *in vivo*.

2.4. Materiali e metodi

2.4.1. Materiali

L'acido poli(D, L-lattico-co-glicolico) (PLGA) (50:50 Resomer RG 504 H, Mw 41,9 KDa, viscosità 0,5 dl/g) è stato acquistato dalla Boehringer Ingelheim (Germania). L'insulina bovina, e l'insulina-fluoresceina isotiocianato (FITC-insulina) di origine bovina, l'idrossipropil- β -ciclodestrina (Mw 1,380 KDa, sostituzione molare 0,6) (HP β CD), il polisorbato 80, e il polivinilalcol (PVA) (Mowiol® 40-88), Trizma base (TRIS), l'acido trifluoroacetico (TFA), la sodio azide, la sulforodamina 101, la formaldeide, la glutaraldeide e la streptozocina sono stati forniti dalla Sigma Chemical Co (USA). Il cloruro di magnesio esaidrato, il cloruro di sodio, il cloruro di potassio, il fosfato di sodio bibasico anidro, il solfato di sodio anidro, il cloruro di calcio deidrato, il sodio acetato triidrato, il bicarbonato di sodio, il carbonato di sodio, il sodio citrato, il cloruro di metilene, e l'acido acetico glaciale, l'acetonitrile per HPLC sono stati forniti dalla Carlo Erba (Italy).

2.4.2. Animali

Sia per gli studi di deposizione che per gli studi di attività ipoglicemica *in vivo* delle LPP sviluppate sono stati impiegati ratti maschi Wistar (Charles River, Italy). Gli animali sono stati tenuti in condizioni di temperatura (21–24 °C) e luce (cicli di 12:12 h giorno–notte) controllata, hanno avuto libero accesso sia al cibo che all'acqua, e sono stati impiegati per gli esperimenti solo dopo un periodo di acclimatazione di 7 giorni. Gli esperimenti *in vivo* sono stati eseguiti rispettando le linee-guide dettate dal Consiglio Europeo (N.86/609/CEE), e le procedure sperimentali sono state approvate dalla Commissione Etica per gli Animali dell'Università di Napoli "Federico II".

2.4.3. Preparazione di HP β CD/Insulina/PLGA LPP

Le HP β CD/Insulina/PLGA LPP sono state preparate mediante la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente. Brevemente, 12,5 mg di insulina bovina (corrispondenti a 315 UI) e 12,5 mg di HP β CD (corrispondenti ad un rapporto molare insulina/ HP β CD 1:4) sono stati solubilizzati in 250 μ l di acido acetico al 30% ed aggiunti a 2,5 ml di una soluzione di polimero al 20% (p/v) in diclorometano mediante omogeneizzazione a 15 000 rpm per 2 minuti (DiAx 900, sonda 6 G, Heidolph, Germania). L'emulsione primaria ottenuta (A_i/O) è stata poi aggiunta ad una soluzione di PVA allo 0,5% (p/v) mediante omogeneizzazione a 8000 rpm per 1 minuto (sonda 10F), con formazione di un'emulsione multipla (A_i/O/A_e). Al termine del processo, il solvente organico è stato allontanato per evaporazione sotto agitazione elettromagnetica (MR 3001K, Heidolph, Germany) per circa tre ore. Le microsfele ottenute sono state lavate con acqua distillata mediante centrifugazione (5000 rpm, 4°C, 15 minuti) (Hettich Zentrifugen, Universal 16R), congelate e sottoposte ad un ciclo di liofilizzazione della durata di 24 ore (0,001 atm, -60°C) (Modulo, Edwards, Gran Bretagna).

Microparticelle di PLGA contenenti solo HP β CD (LPP non cariche) con un caricamento pari al 2,3 % (2,3 mg di HP β CD per 100 mg di microsfele) sono state preparate come controllo. Sono state, inoltre, allestite HP β CD/Insulina/LPP, caricate con FITC-insulina (50 % del peso totale di insulina) per studi di Microscopia Confocale (CLSM).

2.4.4. Caratterizzazione di HP β CD/Insulina/PLGA LPP

2.4.4.1. Morfologia e dimensioni

Le microsfele sono state analizzate dopo liofilizzazione mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) (Leica S440, Germania). Per l'analisi il campione è stato posto su di un supporto metallico e rivestito sottovuoto con Sali d'oro. Per l'analisi della morfologia interna, la polvere è stata precedentemente dispersa in Tissue-Tek®, fissata in Cryomold® (SakuraFinetek, USA) e criosezionata (Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtome, Sakura Finetek, USA) a -24 °C (sezioni con spessore: 10 μ m).

Il diametro medio e la distribuzione dimensionale delle particelle è stata determinata utilizzando un granulometro laser (Coulter LS 100Q USA) a partire da microsfele liofilizzate previamente sospese in una soluzione acquosa di PVA allo 0,2% (p/v). Per ciascuna formulazione il diametro medio delle particelle è stato espresso in μ m \pm la deviazione standard (SD) della misura effettuata in triplicato su tre differenti lotti di microsfele.

2.4.4.2. Tassi di incapsulazione

La quantità di insulina incapsulata all'interno della matrice polimerica è stata valutata mediante una estrazione in acetonitrile/acido cloridrico. Il mezzo d'estrazione consente la solubilizzazione quantitativa dell'insulina e non è in grado di solubilizzare eventuali fibrille d'insulina (Quaglia, 2003). Cinque mg di microsfeere sono stati dissolti in 0,8 ml di una soluzione acetonitrile/acqua (9:1 v/v) a cui sono stati aggiunti 2 ml di acido cloridrico 0,05 N. La sospensione così ottenuta è stata sottoposta a centrifugazione (15 minuti, 20°C, 5000 rpm) ed il supernatante analizzato all'HPLC per contenuto e qualità dell'insulina incapsulata. I risultati sono stati espressi in termini d'incapsulazione reale percentuale (mg di insulina incapsulata *per* 100 mg di microsfeere) \pm la deviazione standard (SD) della misura effettuata su tre lotti differenti. L'analisi quantitativa dell'insulina è stata effettuata impiegando un sistema HPLC Shimadzu (Kyoto, Giappone) costituito da una pompa LC-10AD operante ad un flusso di 1 ml/min, un autocampionatore SIL-10AD VP, un rivelatore UV-VIS SPV-10A ed un integratore C-R6 A.

Per l'analisi è stata utilizzata una colonna Jupiter 5 μ m C18–porosità 300 Å (Phenomenex, USA) di dimensioni 250 x 4,6 mm e un rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 220 nm. La fase eluente era una miscela di H₂O ed acetonitrile contenenti entrambi lo 0,1% (v/v) di TFA in rapporto 70:30 (v/v). Il TFA è stato aggiunto alla fase mobile per migliorare la risoluzione dei picchi in quanto in grado di agire come accoppiante ionico. Esso, infatti, formando complessi con gruppi protonati delle proteine, rende la molecola più lipofila e riduce le interazioni “parassite” dei gruppi ionizzati del peptide con il materiale di supporto (silice in questo caso). Con tale tecnica è stato possibile distinguere l'insulina ed il suo analogo deamidato, che eluisce ad un tempo di ritenzione maggiore rispetto alla proteina integra.

Mediante HPLC ad esclusione molecolare (SE-HPLC) è stato invece possibile individuare la formazione di aggregati solubili dell'insulina. L'analisi è stata condotta applicando una metodica recentemente descritta in letteratura (Oliva,

2000). E' stata utilizzata una colonna Biosep SEC-S 2000 (Phenomenex, USA) di dimensioni 300 x 7,8 mm. La fase mobile era costituita da una miscela 96:4 (v/v) di acido acetico 2,5 M contenente L-arginina (4 mM) e acetonitrile e la lunghezza d'onda di rivelazione UV è stata fissata a 280 nm.

2.4.4.3. Proprietà aerodinamiche

La densità apparente della polvere dopo impaccamento è stata misurata secondo il saggio della FU XII Ed. Una quantità pesata di polvere (100 mg) è stata versata in un cilindro graduato da 10 ($\pm 0,05$) ml ed il volume al versamento opportunamente annotato. Successivamente, il cilindro è stato sottoposto a vibrazioni meccaniche per 1250 volte, con un impaccatore modello IG/4 Giuliani (Italia), fino al raggiungimento di un volume costante. La densità apparente delle microsfele (ρ) è espressa come il rapporto tra il peso (g) e il volume in ml occupato dopo le 1250 vibrazioni.

Per ottenere informazioni circa le proprietà di flusso delle *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* è stato valutato l'indice di comprimibilità anche definito come indice di Carr, calcolato con la seguente formula , come riportato in FU XII Ed.:

$$\text{Indice di Carr (\%)} = (1 - \rho_i/\rho) * 100 \quad (3)$$

dove ρ_i è la densità apparente dopo impaccamento e ρ è la densità del campione come tale. L'indice di Carr (%) è una misura dello scorrimento della polvere. Valori compresi tra 5 e 12 sono dati da polveri con caratteristiche di scorrimento da ottime a buone. Valori superiori a 23 corrispondono a polveri con scorrimento sempre più scadente. Le polveri molto coesive danno valori superiori a 40.

Il diametro aerodinamico medio teorico (MMADt) delle particelle è stato calcolato secondo l'equazione (1) riportata nell'introduzione:

$$\text{MMADt} = d (\rho/\rho_o X)^{1/2} \quad (1)$$

dove d è il diametro geometrico medio, ρ è la densità apparente della polvere, ρ_o è la densità di riferimento di 1 g/ml e X è un fattore dinamico legato alla forma che per una sfera è 1.

2.4.4.4. Proprietà aerosolizzanti in vitro

Le proprietà aerosolizzanti delle *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* sono state testate *in vitro* in seguito ad erogazione dal Turbospin®, un DPI con sistema respiro attivato (PH&T Pharma, Milano, Italia). Per ogni analisi, una capsula rigida di gelatina (numero 2, Capsugel) è stata riempita con circa 30 mg di polvere e poi caricata nel Turbospin.

La deposizione polmonare delle *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* è stata analizzata *in vitro* utilizzando un Astra Type Multi-Stage Liquid Impinger (MSLI), Tipo ALI 1000 (Erweka, Italia). Ognuno dei quattro stadi è stato riempito con 20 ml di una soluzione acquosa di polisorbato 80 (0,5% p/v). La velocità di flusso è stata regolata a 30, 60 e 90 l/min per 8, 4 e 2,7 secondi, rispettivamente, usando un flussimetro digitale elettronico (DFM mode), secondo le specifiche della Ph.Eur VI Ed. La polvere depositata su ciascuno stadio è stata recuperata agitando il separatore, rimuovendo la soluzione di partenza e lavando con frazioni aggiuntive della soluzione acquosa di polisorbato. L'apertura d'immissione e il filtro inferiore sono stati lavati entrambi con soluzioni acquose di polisorbato 80. In ciascun caso, la sospensione di *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* è stata centrifugata (5000 rpm, 25 °C, 15 min), lavata due volte con acqua distillata per allontanare i residui di polisorbato 80, ed il residuo solido è stato, poi, liofilizzato. Ciascun esperimento è stato eseguito in triplicato.

Il contenuto di insulina, e di conseguenza, l'ammontare di LPP depositato su ciascuno stadio è stato determinato seguendo il metodo di estrazione descritto precedentemente. Al fine di valutare l'efficienza della metodica messa a punto, è stata effettuata una prova di *recovery* partendo da una quantità pesata di *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* (5, 10, 30 mg) sospesa in 20 ml di una soluzione di polisorbato (0,5% p/v), trasferita nel primo stadio del MSLI e recuperata secondo la metodica descritta in precedenza.

A seguito dell'estrazione ed analisi dell'insulina nella soluzione acquosa acida è risultato che l'efficienza del metodo di recupero del farmaco dal MSLI è pari al

67,6 ± 9,99%. La deviazione standard è stata calcolata su tre differenti prove di *recovery*.

La dose emessa (ED) è stata calcolata pesando la capsula prima e dopo l'erogazione dal Turbospin®. I risultati sono espressi come percentuale di polvere erogata ± la deviazione standard (SD) della misura effettuata su tre differenti lotti. La dose particellare fine (FPF), il diametro aerodinamico medio sperimentale (MMADsp) e la deviazione standard geometrica (GSD) sono state calcolate secondo le specifiche riportate in Ph.Eur VI Ed. Il valore di MMADsp si ottiene riportando, su un diagramma in scala logaritmica, la frazione cumulativa di principio attivo in funzione del diametro interno. Il diametro interno (cut-off) di ogni stadio è determinato in base alla definizione:

$$D=D_{60}(60/Q)^{1/2} \quad (4)$$

dove D_{60} è il diametro interno misurato ad una velocità di flusso di 60 l/min (i.e., 13,0; 6,8; 3,1 e 1,7 μm rispettivamente dallo stadio 1 a 4) e Q è la velocità di flusso utilizzata nell'esperimento.

2.4.4.5. Cinetiche di rilascio *in vitro*

Gli studi di rilascio *in vitro* dell'insulina da *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* sono stati condotti secondo la metodica classica “*sampling separation-method*”, sospendendo le microsfele liofilizzate in un tampone fosfato (PBS) (120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM) a pH 7,4, e 37 °C in un bagnetto oscillante.

In questo studio, sono stati impiegati fluidi polmonari simulati di diversa composizione. In particolare sono stati effettuati studi rilascio *in vitro* in fluido polmonare interstiziale simulato (simulated interstitial lung fluid o SILF) e fluido polmonare surfattante simulato (simulated surfactant lung fluid o SSLF). Il SILF è stato preparato seguendo la procedura dettata da Moss (Moss, 1979). La concentrazione di ciascun componente è riportato in tabella 5. Al fine di valutare come la presenza del surfattante polmonare potesse modulare la velocità di rilascio dell'insulina dal sistema, i risultati ottenuti in SILF sono stati confrontati

con quelli ottenuti in SSLF. Nel caso del SSLF, una quantità di DPPC (0,02%), è stata preparata come dispersione liposomiale ed addizionata al SILF come raccomandato da Cook (Cook, 2005). In breve, 200 mg di DPPC sono stati pesati accuratamente e posti in un pallone da 500 ml, solubilizzati in 20 ml di una soluzione di CHCl₃/MeOH (1:1). Il solvente è stato allontanato mediante rotavapor (Laborota model 4010, Heidolph, Germany). Il film lipidico è stato poi idratato con 20 ml di SILF a 50°C per circa 1 ora. La dispersione liposomiale è stata estrusa attraverso membrane di policarbonato (Nuclepore® Polycarbonate, Whatman®, USA), con pori di dimensioni differenti (da 5 a 0,2 µm) a 50°C sotto N₂ liquido. Il diametro idrodinamico e l'indice di polidispersità è stato misurato mediante spettroscopia di correlazione fotonica (PCS) (N5 Submicron Particle Size Analyzer; Beckman–Coulter). La dispersione fosfolipidica è stata diluita con acqua Milli-Q® e le misure sono state effettuate a 25°C con un angolo di 90°. Una volta preparati SILF ed SSLF sono stati conservati a 4°C fino all'uso. Prima di utilizzarli il pH è stato aggiustato a 7,4 con una soluzione di HCl 0,01M.

I profili di rilascio dell'insulina sono stati valutati sospendendo 3 mg di microsfere liofilizzate in 2 ml di mezzo di rilascio in un bagnetto termostato a 37°C (HAAKE DC30, Italia). Ad intervalli di tempo prefissati, i campioni sono stati centrifugati (5000 rpm, 4°C, 15 min), 500 µl di mezzo di rilascio sono stati prelevati ed analizzati per il contenuto di insulina mediante RP-HPLC e SE-HPLC come descritto precedentemente. Il mezzo di rilascio è stato ripristinato con PBS fresco. Assumendo che l'insulina è stabile a pH 7,4 e 37°C per 1 giorno, per intervalli di tempo più lunghi, il mezzo di rilascio è stato allontanato ed il residuo di particelle è stato analizzato per il contenuto di insulina seguendo la metodica di estrazione precedentemente descritta. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ciascun tempo. Gli studi sono stati condotti per 42 giorni. I risultati sono stati riportati come % d'insulina rilasciata ± la deviazione standard (SD) calcolata su tre differenti lotti di microsfere.

Tabella 5. Composizione del fluido polmonare interstiziale simulato (SILF)^a (Moss, 1979).

	Concentrazione g/L
Cloruro di magnesio	0,203
Cloruro di sodio	6,019
Cloruro di potassio	0,298
Fosfato di sodio bibasico	0,268
Solfato di sodio	0,071
Cloruro di calcio	0,368
Acetato di sodio	0,952
Bicarbonato di sodio	2,604
Citrato di sodio	0,097

^a= Nel SSLF, la DPPC è stata addizionata come dispersione liposomiale (diametro geometrico medio 150 nm, indice di polispersità 0,3).

La conformazione dell'insulina rilasciata dalle *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* nei fluidi polmonari simulati è stata valutata mediante dicroismo circolare (CD). Brevemente, dopo sei ore di rilascio, il mezzo di rilascio è stato prelevato, filtrato con filtri di cellulosa rigenerata da 0,45 μm (RC filters, Phenomenex, Italia) ed analizzato mediante CD. Sono stati, inoltre, analizzati standard di insulina bovina e complessi insulina/HPβCD (rapporto molare 1:4) alla stessa concentrazione in SILF ed SSLF ($4,5 \times 10^{-6}$ M), come controllo. Gli spettri CD sono stati registrati impiegando uno spettropolarimetro J-710 controllato dal software J 700 per Windows (Jasco, Giappone). Gli spettri nel lontano UV sono stati registrati mediante cella di quarzo circolare con cammino ottico di 0,1 cm, mentre per le analisi nel vicino UV è stata usata una cella con cammino ottico di 1 cm. Lo strumento è stato calibrato con uno standard in acqua di acido D-10-canfosulfonico (0,6 mg/ml). I dati sono espressi come ellitticità molare $[\theta]$ calcolata secondo l'equazione:

$$[\theta] = (\theta M)/(C l) \quad (5)$$

dove θ è l'ellitticità misurata dallo strumento (mdeg), M è il peso molecolare medio residuo (calcolato sulla base del numero di residui amminoacidici presenti nella molecola) (g/mol), l il cammino ottico (cm), e C la concentrazione della proteina in soluzione (g/ml).

2.4.4.6. Studi di diffusione in vitro

La diffusione dell'insulina nei fluidi simulati è stata monitorata mediante membrane da dialisi da muco-simulato (MS) a SILF; da SILF e/o SSLF a PBS a pH 7,4. Il muco simulato (MS) è stato preparato in accordo al metodo descritto da Shah (Shah, 2005). Brevemente, una soluzione acquosa di polietilen-ossido (PEO; Mw 4,000000) ad una concentrazione di 1,5 % p/v è stata preparata aggiungendo il PEO all'acqua a 95°C lasciando la dispersione a temperatura ambiente tutta la notte. Una quantità pesata di microsferi (8 mg) sono state sospese in 0,3 ml di mezzo donatore (MS, SILF o SSLF) e poste in un sacchetto da dialisi (MWCO: 50,000 Da, Spectra/Por®). Il campione è stato posto in 6 ml di mezzo esterno e tenuto a 37°C. Ad intervalli di tempo prestabiliti 1 ml di mezzo esterno è stato prelevato ed analizzato per il contenuto di insulina come descritto precedentemente. Il mezzo di rilascio è stato ripristinato con lo stesso volume di mezzo fresco. Per intervalli di tempo superiori ad un giorno, il mezzo di rilascio è stato allontanato e sul residuo di particelle è stato valutato il contenuto di insulina secondo il metodo descritto. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ciascun punto della cinetica di rilascio.

2.4.5. Studio di deposizione in vivo delle LPP

Al fine di seguire il destino *in vivo* delle LPP sviluppate è stato condotto, in collaborazione con il *Dipartimento di Farmacologia Sperimentale* di questa Università, uno studio di biodistribuzione mediante microscopia confocale. I ratti sono stati anestetizzati con iniezione intraperitoneale di fentobarbital (60 mg/kg). Ai ratti normoglicemici sono stati somministrati, mediante la via intratracheale, circa 3,5 mg (corrispondenti a 4 UI/kg) di LPP (*HP β CD/Insulina-FITC/LPP*) contenenti insulina marcata con fluoresceina (Insulina-FITC). Dopo la somministrazione (30, 60 e 90 min), la cavità addominale del ratto è stata incisa, le membrane dell'epitelio polmonare sono state estratte e lavate con un'infusione di due differenti soluzioni. La prima (10 ml/min per 5 min) conteneva lo 0,1% di sulforodamina in PBS a pH 7,4 (NaCl 138 mM, 8,1 Na₂HPO₄ mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, KCl 2,7 mM). Una seconda soluzione (5 ml/min per 5 min) contenente una soluzione di sulforodamina (0,1% w/v), formaldeide (0,6% w/v) e glutaraldeide (0,9% w/v), è stata usata per fissare i tessuti. Sezioni trasversali del polmone sono state ottenute mediante criostato (Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtome, Sakura Finetek, USA) (spessore sezioni: 30 μ m) ed analizzate al microscopio confocale (Zeiss). Al fine di valutare l'auto-fluorescenza del polmone sono stati condotti esperimenti di controllo mediante somministrazione intratracheale di particelle di PLGA contenenti solo HP β CD (LPP non cariche).

2.4.6. Studio di attività in vivo di HP β CD/Insulina/PLGA LPP

L'attività ipoglicemica delle HP β CD/Insulina/PLGA LPP è stata valutata mediante un esperimento *in vivo* condotto in collaborazione con il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale di questa Università. Le polveri sviluppate sono state testate *in vivo* su ratti (200-300 g; Charles River) normoglicemici e ratti resi diabetici a seguito di somministrazione intravenosa di streptozocina (STZ, 60 mg/kg). L'induzione del diabete di tipo 1 è stata stabilita dopo una settimana dall'iniezione di STZ, ed i livelli di glucosio sono stati determinati utilizzando il kit diagnostico Accu-Chek® kit (Roche Diagnostics, USA). I ratti sono stati prima anestetizzati con fenobarbitale (60 mg/kg, i.p.), e poi trattati con quantità crescenti di LPP sviluppate (corrispondenti 0,5; 1; 2 e 4 UI/kg) mediante somministrazione intratracheale, impiegando un DPI specificamente progettato per studi su animali di laboratorio. La dose reale di polvere somministrata per ratto è stata determinata dalla differenza in peso del dispositivo prima/dopo l'insufflazione. Ad intervalli di tempo regolari, campioni di sangue sono stati raccolti dalla vena della coda ed analizzati per la concentrazione di glucosio. Particelle di PLGA contenenti solo HP β CD (LPP non cariche) (dose equivalente a 4 IU/kg), somministrate mediante DPI, sono state usate come controllo. Esperimenti simili sono stati effettuati somministrando soluzioni di insulina in PBS sterile (10 mM) a pH 7,4. In breve, è stata preparata una soluzione di insulina bovina (0,3 mg/ml) che è stata poi diluita per ottenere 100 μ l di soluzioni corrispondenti ad una dose di insulina di 0,5; 2 e 4 IU/kg. Le soluzioni preparate sono state somministrate mediante un Microsprayer (modello IA-1B, PennCentury, USA), ai ratti normoglicemici e diabetici. Al fine di valutare l'attività ipoglicemica delle LPP sviluppate, i livelli di glucosio ematico ottenuti dopo somministrazione di HP β CD/Insulina/PLGA LPP sono stati confrontati con quelli ottenuti a seguito di somministrazione sottocutanea di soluzioni di insulina (4 IU/kg in PBS).

I livelli di glucosio sono espressi come mg/dl e riportati come media \pm SEM di 3-5 esperimenti singoli per ciascun trattamento.

L'AUC (area sotto la curva) è stata calcolata seguendo la regola del trapezoide e la % relativa di attività farmacologica delle *HPβCD/Insulina/LPP*, dopo somministrazione polmonare è stata calcolata seguendo l'equazione (Morishita, 2006; Miyazak, 2001):

$$\text{disponibilità relativa (\%)} = \frac{[\text{AUC}] \text{ inal.} \quad \text{dose inal.}}{[\text{AUC}] \text{ s.c} \quad \text{dose s.c}}$$

Dove [AUC] inal. e [AUC] s.c rappresentano l'area sotto la curva relativa all'insulina inalata e sottocutanea, e dose inal. e dose s.c sono la dose di insulina (4 IU/kg) somministrata per via inalatoria e sottocutanea, rispettivamente.

2.5. Risultati e discussione

2.5.1. Preparazione e caratterizzazione di HP β CD/Insulina/PLGA LPP

Il successo di una terapia inalatoria è fortemente influenzato dalle caratteristiche intrinseche del dispositivo impiegato nonché dalle caratteristiche della polvere sviluppata, ottimizzata in termini di proprietà aerodinamiche (Van Campen, 2002; Newman, 2002). Una condizione *sine qua non* nello sviluppo di polveri respirabili, come quelle riportate in questo lavoro, è una approfondita conoscenza delle caratteristiche primarie delle particelle che compongono la polvere (i.e. diametro particellare, densità, area superficiale), le quali definiscono poi le caratteristiche secondarie (i.e proprietà di flusso, disperdibilità e maneggevolezza) (Van Campen, 2002).

Le LPP a base di PLGA contenenti insulina sono state preparate con un'ottima resa mediante la metodica classica dell'emulsione multipla evaporazione del solvente, impiegando come agente porosigeno la HP β CD. Recentemente è stato dimostrato che la quantità di HP β CD aggiunta al sistema riveste un ruolo fondamentale nel determinare le proprietà morfologiche e di rilascio delle particelle (Ungaro, 2006). In particolare, l'aggiunta di HP β CD nella formulazione, quale agente osmoticamente attivo, permette di ottenere particelle di grandi dimensioni tipicamente porose, che presentano proprietà aerodinamiche ottimali per il raggiungimento delle regioni profonde del polmone. In presenza di HP β CD, infatti, le microparticelle sono caratterizzate da un diametro geometrico medio di $26,2 \pm 1,2 \mu\text{m}$, con pori superficiali ben distribuiti ed una struttura macroporosa interna omogenea (Figura 25). E' noto che l'efficienza di un *aerosol* dipende essenzialmente dalle dimensioni delle particelle costituenti la polvere; particelle molto piccole generalmente sono esalate, mentre particelle molto grandi hanno una forte tendenza a depositarsi lungo le vie aeree superiori (Van Campen, 2002; Newman, 2002; Patton, 2007). Le HP β CD/Insulina/PLGA LPP, nonostante l'elevato diametro geometrico, presentano una spiccata capacità di raggiungere la regione alveolare dei polmoni per sortire un effetto terapeutico sistemico

(Edwards, 1998; Edwards, 1997). Tale caratteristica, nonché vantaggio, è ascrivibile alla struttura porosa delle particelle che ne determina di conseguenza una bassa densità apparente.

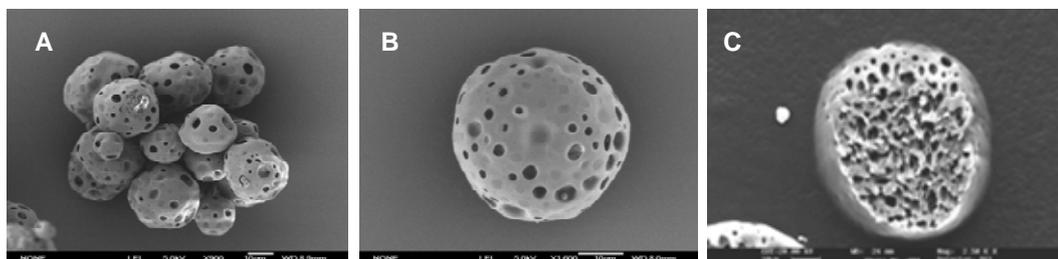


Figura 25. Immagini SEM delle *HPβCD/Insulina/PLGA LPP*: A) rappresentazione di un'intera popolazione; B) rappresentazione di una singola microsfera; C) rappresentazione di una sezione microparticellare.

In tabella 6 sono riassunte le caratteristiche tecnologiche delle LPP sviluppate. Una delle principali problematiche associata alla tecnica dell'emulsione multipla- evaporazione del solvente, impiegata in questo lavoro per preparare le polveri, è la perdita di farmaco nella fase acquosa esterna durante l'allestimento, soprattutto quando il farmaco da incapsulare è una macromolecola altamente idrofila, quale l'insulina. Ne consegue comunemente una bassa efficienza di caricamento del farmaco da incapsulare (De Rosa, 2008). Come riportato nella tabella 6, l'insulina è stata intrappolata nelle LPP, nella sua forma nativa, con un'efficienza maggiore del 50% (35 UI per 100 mg *HPβCD/Insulina/PLGA LPP*). Il risultato ottenuto è ragionevolmente attribuibile alla capacità dell'insulina di instaurare interazioni di tipo elettrostatico con i gruppi carbossilici del PLGA. Nello specifico, è stato impiegato un tipo di PLGA definito *uncapped*, ossia un polimero con un elevato numero di gruppi carbossilici liberi, in modo da favorire l'interazione polimero/proteina (Newman, 2002; Ungaro, 2006). L'efficienza di incapsulazione ottenuta, comunque, rappresenta un buon risultato considerando che tale sistema è inteso per la somministrazione polmonare (Laube, 2001; Patton, 1999).

L'analisi RP-HPLC ha evidenziato che la quantità di desamidoinsulina contenuta nelle microsfele risulta essere inferiore al 5%, un valore normalmente presente come impurità nella formulazione commerciale secondo le specifiche riportate in

Ph.Eur VI Ed. L'analisi SE-HPLC, inoltre, non ha mostrato la presenza di aggregati covalenti solubili nel mezzo di estrazione.

In ragione della loro elevata porosità, le LPP sviluppate presentano una densità apparente molto bassa pari a 0,1 g/ml (Tabella 6). Tale caratteristica risulta fondamentale considerando che polveri con una bassa densità apparente sono più facilmente disperse in forma di *aerosol* rispetto a polveri con una densità apparente elevata (Van Campen, 2002). L'indice di Carr di 6,25 %, calcolato per le *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* suggerisce, inoltre, che le polveri sviluppate presentano eccellenti proprietà di flusso. E' stato dimostrato che particelle preparate in assenza di HPβCD presentano un elevato indice di Carr, che si traduce in polveri con caratteristiche coesive (Ungaro, 2006). Quest'aspetto diventa cruciale tenendo in considerazione che forze di coesione ed interazioni interparticellari possono essere causa di ritenzione della polvere da parte del dispositivo utilizzato determinando, quindi, una perdita dell'uniformità di dose rilasciata (Van Campen, 2002). Infine, una stima preliminare del MMADt delle particelle, ottenuto normalizzando il diametro geometrico con la densità apparente della polvere, secondo l'equazione (1), attribuisce alle *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* un MMADt inferiore a 10 μm (Tabella 6). Tale risultato conferma che le polveri sviluppate presentano proprietà aerodinamiche tali da raggiungere la regione alveolare, dove possono rilasciare la macromolecola con conseguente assorbimento sistemico della proteina.

Tabella 6. Caratteristiche delle *HP β CD/Insulina/ PLGA LPP*.

	<i>HPβCD/Insulina/PLGA LPP</i>
Diametro geometrico medio (d) ^a ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	26,2 \pm 1,2
Densità apparente (ρ) ($\text{g/ml} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	0,134 \pm 0,003
Indice di Carr (%)	6,25 \pm 0,14
MMAD _t ^c ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	9,61 \pm 0,46
Incapsulazione reale (IU/100 mg $\pm \text{SD}^{\text{b}}$) ^d	35,4 \pm 10,2
Efficienza di incapsulazione (% $\pm \text{SD}^{\text{b}}$)	59 \pm 16

^a Diametro geometrico medio determinato mediante granulometria laser.

^b Deviazione standard dei valori calcolati su tre differenti lotti.

^c Diametro aerodinamico medio stimato sulla base dell'equazione (1).

^d Insulina (UI) incapsulata *per 100 mg* di LPP. Il caricamento teorico è pari a 58,2 UI/100 mg di LPP.

2.5.2. Proprietà aerosolizzanti in vitro di HP β CD/Insulina/PLGA LPP

Considerando che tali sistemi sono stati progettati per la veicolazione polmonare di insulina, è fondamentale valutarne le proprietà aerosolizzanti *in vitro*. Tali studi sono stati effettuati mediante l'utilizzo del MSLI a differenti flussi di aria dopo rilascio della polvere da un DPI respiro-attivato, il Turbospin®. Tale DPI, infatti, è caratterizzato da una resistenza intermedia ($0,08\text{cm}(\text{H}_2\text{O})^{1/2} \cdot \text{min} \cdot \text{l}^{-1}$) che rappresenta un compromesso ottimale tra la capacità inspiratoria del paziente e l'effetto del flusso di aria sulla disaggregazione delle particelle (i.e bassa variabilità inter-individuale) (Frijlink, 2004; Newman, 2002; Meakin, 1996).

I valori di ED, FPF e MMAD_{sp} delle HP β CD/Insulina/PLGA LPP sono riportati nella tabella 7. Le LPP sviluppate presentano una buona disperdibilità, come riflesso delle ottime proprietà aerodinamiche. E' importante sottolineare che nel corso dell'esperimento non sono stati recuperati residui di polvere nell'inalatore e solo una bassa percentuale di polvere (circa il 20%) è stata recuperata dall'adattatore (che mima la bocca) dopo attuazione del DPI. Tali risultati suggeriscono una minima deposizione della polvere nella cavità orofaringea con conseguente riduzione del rischio di una ridotta biodisponibilità legata alla possibilità di deglutire la polvere nonché di potenziare un effetto terapeutico locale.

Per quanto riguarda la percentuale di polvere che si deposita nello stadio 1, è evidente che essa aumenta quando il flusso di aria diminuisce, per questo motivo i risultati sono stati espressi considerando o meno questa frazione di polvere (m_1) rispetto alla massa totale di polvere recuperata.

Tabella 7. Proprietà aerosolizzanti *in vitro* delle *HPβCD/Insulina/ PLGA LPP*.

Flusso d'aria	ED (% ± SD ^a)	FPF (% ± SD ^a)		MMADsp (µm ± SD ^a)	
		m ₁ +m ₂ +m ₃ +m ₄ ^b	m ₂ +m ₃ +m ₄ ^c	m ₁ +m ₂ +m ₃ +m ₄ ^b	m ₂ +m ₃ +m ₄ ^c
30 l/min	103 ± 2,20	1,18 ± 0,21	26,9 ± 5,02	17,1 ± 0,75	7,01 ± 0,35
60 l/min	94,5 ± 0,11	4,73 ± 0,84	61,3 ± 11,4	12,3 ± 1,11	5,02 ± 1,34
90 l/min	101 ± 7,60	3,70 ± 0,67	84,9 ± 15,8	9,68 ± 0,19	4,01 ± 0,02

^a Deviazione standard dei valori calcolati su tre differenti lotti.

^b Valori ottenuti considerando nella massa totale di polvere la frazione di LPP depositata nello stadio 1 (m₁).

^c Valori ottenuti non considerando nella massa totale di polvere la frazione di LPP depositata nello stadio 1.

Come si può dedurre dalla tabella 7, la ED delle LPP sviluppate raggiunge un valore compreso tra 94,5% e 103,0% indipendentemente dal flusso di aria (30–90 l/min). La FPF risulta essere pari a 1,18% a 30 l/min, aumenta a 4,73% a 60 l/min e rimane costante a 90 l/min (3,70%). Il MMADsp, inoltre, diminuisce quando il flusso di aria aumenta da 30 a 60 l/min raggiungendo un valore di 9,68 µm a 90 l/min. La GSD varia tra 1,21 e 1,28, indipendentemente dal flusso d'aria. Trascurando la frazione di polvere depositata nello stadio 1, in accordo con Ph.Eur. VI Ed., le LPP sviluppate hanno mostrato un MMADsp di 4 µm a 90 l/min. La differenza in termini di FPF e MMADsp che si riscontra considerando o meno la frazione di polvere depositata sullo stadio 1 può essere ragionevolmente attribuita alla capacità delle *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* di flottare in presenza dell'acqua contenuta nel primo stadio. Un MMADsp maggiore di 9,68 µm, ottenuto considerando la frazione di polvere depositata sullo stadio 1, suggerisce che *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* potrebbero depositarsi preferenzialmente nella regione centrale del tratto respiratorio. Quando si trascura la massa di polvere depositata sullo stadio 1, tuttavia, si ottiene un valore di MMADsp (4 µm) paragonabile ai risultati ottenuti dallo studio di deposizione *in vivo*, descritti nei paragrafi successivi.

In tal senso, è importante sottolineare che in letteratura sono presenti guidizi molto contrastanti riguardo le metodiche ad oggi impiegate per la valutazione delle proprietà di aerosolizzazione *in vitro* delle preparazioni per inalazione. Nessuno, infatti, degli strumenti suggeriti dalla Farmacopea (TS, MSLI e NGI)

può effettivamente mimare l'apparato respiratorio in ragione della sua complessità (i.e. trachea, bronco principale, bronchioli terminali, alveoli). Esperimenti di questo tipo consentono essenzialmente di avere una stima predittiva non tanto della deposizione delle particelle lungo l'albero respiratorio quanto del loro diametro aerodinamico. E' chiaro che per avere un'informazione definitiva riguardo la capacità delle particelle di depositarsi in una o più regioni specifiche dell'apparato respiratorio sono indispensabili studi farmacologici di deposizione *in vivo*.

2.5.3. Studi di rilascio *in vitro* dell'insulina da HP β CD/Insulina/PLGA LPP

Il profilo di rilascio *in vitro* dell'insulina da HP β CD/Insulina/PLGA LPP è stato valutato in condizioni sperimentali abili a mimare la composizione del fluido polmonare biologico dove la proteina sarà rilasciata. Per una approfondita caratterizzazione tecnologica del sistema tali studi hanno richiesto la messa a punto di condizioni sperimentali più idonee a mimare le caratteristiche del sito di somministrazione della formulazione e la composizione del fluido biologico relativo in cui il rilascio si realizza. A tale proposito, bisogna tenere in debita considerazione che le vie aeree inferiori (i.e., trachea, bronchi e bronchioli) sono caratterizzate dalla presenza di un fluido biologico a pH 6,6 (airway surface liquid o ASL) costituito dal liquido periciliare (sol layer) cui si sovrappone uno strato gelatinoso (gel layer), formato dal 95% di acqua e il 5% di mucina. A diretto contatto con gli alveoli, invece, è presente un fluido biologico che consiste di una fase acquosa a pH 6,9 (alveolar subphase fluid o AVSF) su cui si deposita il surfattante polmonare, composto dall' 80% di fosfolipidi (95% di dipalmitoilfosfatidilcolina o DPPC), 10% di colesterolo e 10 % di proteine (SP-A, SP-B, SP-C e SP-D). Sono stati, pertanto, condotti studi di rilascio *in vitro*, mediante la metodica classica definita “*sampling separation method*”, nei fluidi polmonari simulati (SILF ed SSLF) e confrontati con quelli ottenuti impiegando il classico mezzo di rilascio (tampone fosfato o PBS) a pH e temperatura fisiologica (pH 7,4 and 37°C). I risultati ottenuti sono riportati nella figura 26 come percentuale di insulina rilasciata nel tempo. In tutti i casi, il rilascio di insulina è bifasico, con un rilascio rapido nei primi 30 minuti di incubazione (effetto *burst*) seguito da un rilascio controllato della proteina per più di 10 giorni. Il profilo di rilascio dell'insulina dal sistema, in particolare l'effetto *burst*, è fortemente influenzato dalla struttura macroporosa del sistema, che evolve nel tempo a causa della progressiva erosione del polimero (Batychy, 1997; Lemaire, 2003). Tale profilo è indipendente dal mezzo di rilascio testato, suggerendo che la concentrazione ionica e la presenza della DPPC nel SSLF non esercitano alcun effetto sulle proprietà di rilascio della macromolecola dal sistema. Qualora il

rilascio bifasico dell'insulina dalle LPP si riproducesse *in vivo*, consentirebbe di mimare nell'uomo la secrezione bifasica fisiologica dell'insulina mantenendo, quindi, i valori di insulina a livello basale nel trattamento del diabete di tipo 1 e 2.

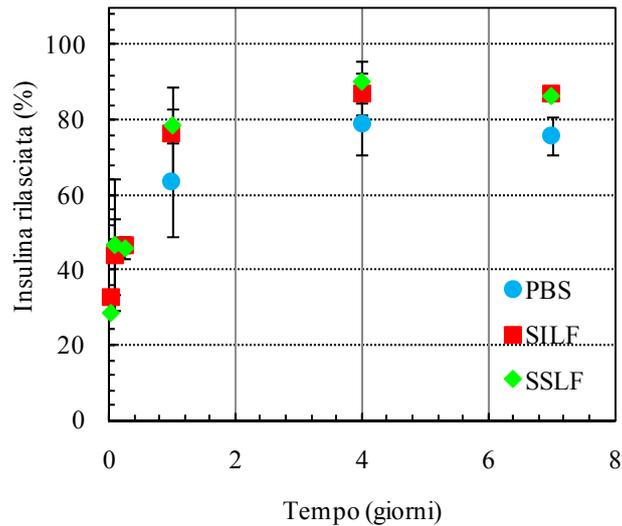


Figura 26. Profilo di rilascio *in vitro* dell'insulina da $HP\beta CD/Insulina/PLGA$ LPP valutato in PBS, fluido interstiziale polmonare simulato (SILF) e surfattante polmonare simulato (SSLF) a pH 7,4 e 37°C.

Considerando che le LPP sviluppate sono intese per la veicolazione polmonare di insulina, che come descritto precedentemente è una macromolecola altamente instabile, è stato fondamentale valutare i possibili cambiamenti strutturali di essa nei fluidi polmonari simulati. Lo stato di auto-associazione (equilibrio monomero-dimero-esamero) dell'insulina, infatti, rappresenta un parametro chiave nel controllare la biodisponibilità *in vivo* della proteina. La conformazione dell'insulina rilasciata dalle microsfele dopo 6 ore in SILF è stata, pertanto, valutata mediante dicroismo circolare. Come si può osservare dal grafico (Figura 27), il profilo dell'insulina rilasciata dalle LPP non è sovrapponibile a quello ottenuto dall'insulina bovina e dal complesso insulina bovina/ $HP\beta CD$ (1:4 mol/mol) alla stessa concentrazione e nelle stesse condizioni di rilascio. In particolare, il segnale dell'insulina bovina rilasciata dalle LPP aumenta nel lontano UV. Dallo spettro registrato nel lontano UV, è stato calcolato il rapporto tra l'ellitticità molare registrata a 208 e 223 nm. ($[\theta]_{208}/[\theta]_{223}$). E' risultato che tale

rapporto è pari a 1,45; 1,29 e 1,23 rispettivamente per l'insulina bovina rilasciata dalle *HPβCD/Insulina/ PLGA LPP*, insulina bovina ed il complesso insulina bovina/HPβCD.

I risultati ottenuti confermano che l'insulina nei fluidi polmonari simulati esiste come equilibrio monomero-dimero-esamero (Ettinger, 1971). Sebbene l'insulina rilasciata dalle *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* è inizialmente più facilmente assorbita rispetto alla forma farmaceutica iniettiva, in quanto prevale la sua forma monomerica (Figura 27), consente comunque un controllo dei livelli di glucosio per tempi prolungati.

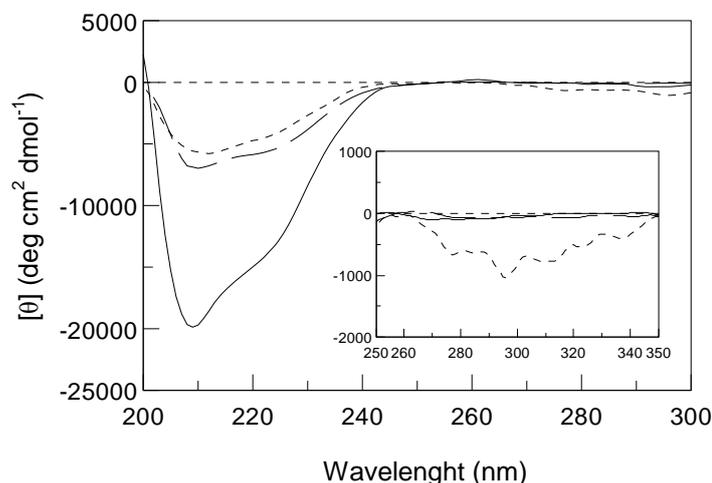


Figura 27. Spettro CD registrato nel lontano e nel vicino UV dell'insulina rilasciata dalle *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* in SILF dopo 6 ore di rilascio (linea continua). Spettri dell'insulina bovina (linea tratteggiata) e del complesso insulina bovina/HPβCD (1:4 mol/mol) (linea discontinua) sono riportati come controllo.

La stabilità chimica dell'insulina durante la fase di rilascio è stata valutata mediante analisi RP-HPLC e SE-HPLC del contenuto delle microsfere. I cromatogrammi degli estratti delle microsfere non hanno evidenziato né la presenza di desamidoinsulina né di aggregati solubili.

2.5.4. Studio di diffusione *in vitro* dell'insulina da HP β CD/Insulina/PLGA LPP

La diffusione *in vitro* dell'insulina dai fluidi polmonari simulati (SILF o SSLF) al PBS a pH 7,4 è stata valutata mediante dialisi. L'applicazione di tale metodica, infatti, permette di focalizzare l'attenzione sul trasporto della proteina dalla regione alveolare al circolo ematico durante le 24 ore. I risultati di questo studio sono riportati nella figura 28 come percentuale di insulina diffusa nelle prime 24 ore. Dal grafico è possibile notare che non ci sono differenze significative nella percentuale di insulina diffusa da SILF a PBS ($82,6 \pm 6,9\%$) rispetto a quella ottenuta da SSLF a PBS dopo 24 ore di rilascio. Al contrario, considerando la diffusione dell'insulina da muco simulato (MS) a SILF, si evidenzia una riduzione della velocità di diffusione della proteina. In queste condizioni, inoltre, solo il $49,9 \pm 10\%$ di insulina è diffusa nelle 24 ore. I risultati ottenuti suggeriscono che il muco simulato, abile a mimare le proprietà reologiche del muco umano (Shah, 2005), in particolare la sua viscosità, può determinare una riduzione della diffusione della proteina. Il contributo del muco sull'assorbimento della proteina attraverso l'epitelio polmonare, pertanto, deve essere preso in debita considerazione. Le caratteristiche chimico-fisiche e la composizione di SILF ed SSLF, invece, non influenzano in maniera significativa il grado di diffusione della proteina.

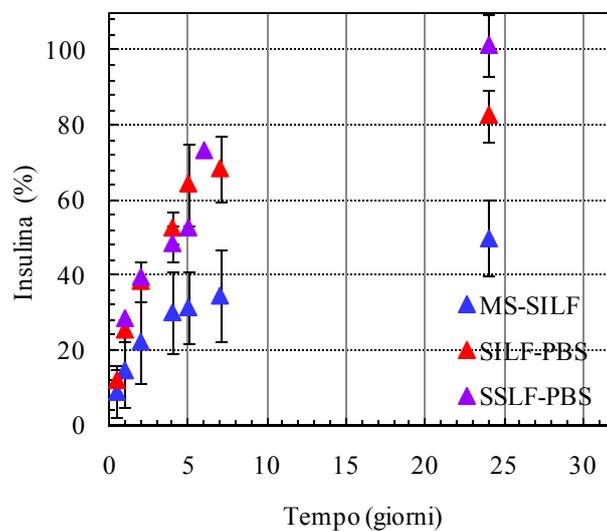


Figura 28. Profili di diffusione *in vitro* dell'insulina da *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* valutato mediante dialisi da: I) muco simulato (MS) a fluido polmonare interstiziale simulato (SILF) (i.e. vie aeree inferiori); II) SILF o fluido polmonare surfattante simulato (SSLF) a tampone fosfato (PBS) a pH 7,4 (i.e. regione alveolare).

2.5.5. Studio di deposizione *in vivo* delle LPP

Lo studio di deposizione *in vivo* delle LPP sviluppate, condotto in collaborazione con il Dipartimento di *Farmacologia* di questa Università, è stato finalizzato a chiarire il loro destino nell'albero respiratorio. Per tale studio sono state testate, le LPP caricate con insulina marcata con FITC. Nella figura 29 sono riportate le immagini CLSM di sezioni polmonari di ratto, ottenute a seguito di somministrazione intratracheale di *HP β CD/Insulina-FITC/PLGA LPP*. Nelle condizioni di analisi il tessuto polmonare non ha dato origine a fenomeni di autofluorescenza nel canale del verde. Pertanto, il rosso è attribuibile alle membrane alveolari marcate con sulforodamina, mentre il verde all'insulina-FITC, rilasciata o intrappolata nella matrice polimerica. Dopo 30 minuti dalla somministrazione, nella regione alveolare si evidenzia solo una lieve fluorescenza diffusa accompagnata da pochi *spot* rossi non sovrapponibili al rosso degli alveoli. Questo risultato suggerisce che lungo la superficie alveolare la proteina rimane intrappolata all'interno della matrice polimerica. Dopo 90 minuti non solo aumenta il numero di *spot* verdi a livello alveolare, ma è anche evidente un aumento della fluorescenza diffusa sovrapponibile al rosso degli alveoli. Tale fenomeno indica che l'insulina rilasciata dalle LPP diffonde nella regione alveolare per poi essere assorbita nel circolo ematico. L'aumento del numero di *spot* verdi, tuttavia, può essere attribuito non solo all'insulina rilasciata dalle LPP, ma anche ad un parziale *uptake* della proteina da parte dei macrofagi alveolari (Bosquillon, 2004).

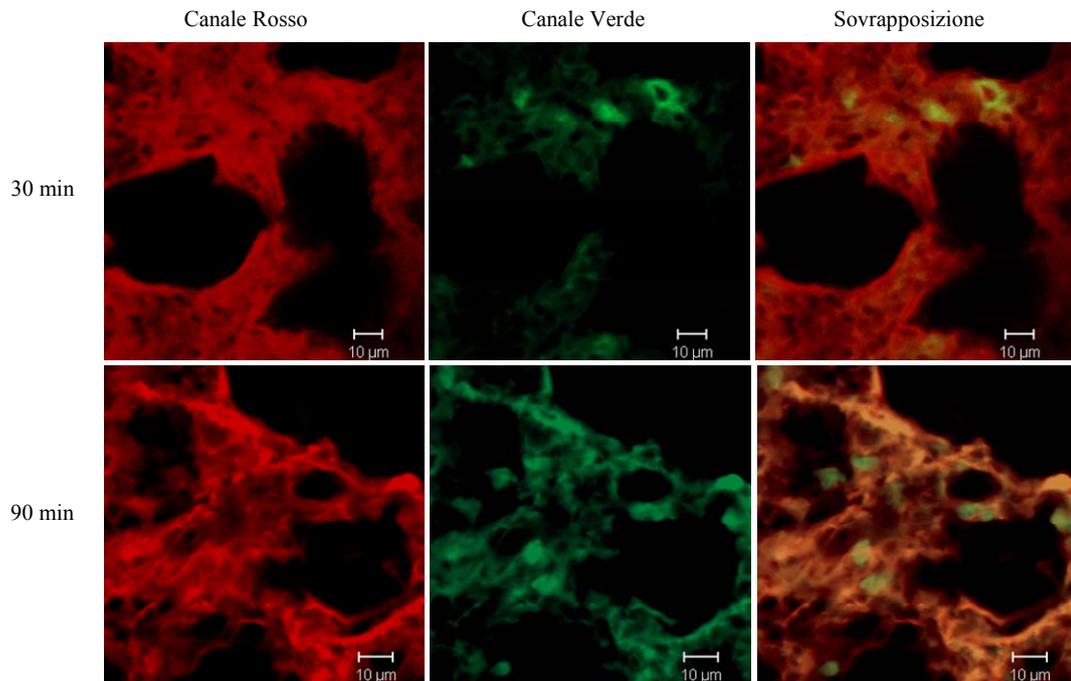


Figura 29. Immagini CLSM di polmone di ratto dopo somministrazione intratracheale delle LPP mediante DPI. Le membrane alveolari sono marcate con sulforodamina (rosso). Le LPP sono marcate con insulina-FITC (verde).

2.5.6. Attività in vivo dell'insulina dalle LPP contenenti insulina

Al fine di valutare l'attività ipoglicemica dell'insulina contenuta nelle polveri sviluppate sono stati condotti studi *in vivo* su ratti normoglicemici e ratti resi diabetici a seguito di somministrazione di STZ. La somministrazione di STZ induce il diabete di tipo 1 con una severa ipoglicemia caratterizzata da un livello iniziale di glucosio ematico di 400 mg/dl. Tali condizioni non sono alterate dal trattamento preliminare del ratto con l'anestetico, sia nei ratti normoglicemici che in quelli resi diabetici. Infatti, i valori di glicemia ottenuti prima e dopo anestesia risultano essere $130,2 \pm 4,1$ versus $141,0 \pm 4,4$ mg/dl e $483,8 \pm 23,4$ versus $466,07 \pm 21$ mg/dl, nei ratti normoglicemici e nei ratti diabetici, rispettivamente

L'effetto delle *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* sul glucosio ematico è stato seguito nel tempo (i.e. dosi equivalenti di insulina 0,5; 1; 2 e 4 UI/Kg) come riportato nella figura 30. Dal grafico è chiaro che il trattamento con le LPP sviluppate causa una riduzione significativa dei livelli di glucosio in maniera dose-dipendente sia nei ratti normoglicemici che diabetici. In condizioni normoglicemiche (Figura 30, pannello A), per tutte le dosi somministrate si osserva un massimo di attività dopo 1 ora dalla somministrazione intratracheale, e dopo 4 ore dal trattamento i livelli di glucosio ematico raggiungono valori simili a quelli riportati per le LPP non cariche. Al contrario, nei ratti resi diabetici (Figura 30, pannello B), solo dopo 2 ore dalla somministrazione della polvere si evidenzia un'attività ipoglicemica massima e dopo 5 ore i livelli di glucosio ematico sono paragonabili a quelli ottenuti per le LPP non cariche. La rapida azione dell'insulina rilasciata dalle *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* è ragionevolmente attribuibile all'elevato effetto *burst* che caratterizza il profilo di rilascio della proteina dal sistema microparticellare e conferma che l'insulina è rilasciata nelle prime ore nella sua forma monomerica e quindi rapidamente assorbibile. In particolare, va sottolineato che nei ratti diabetici, ossia in una condizione patologica, le *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* esercitano una riduzione significativa del glucosio ematico dopo somministrazione della proteina alla dose minima di 0,5 UI/Kg (Figura 30, pannello B). Ad oggi, non si conoscono formulazioni di insulina intese

per il rilascio polmonare della proteina con attività farmacologica a dosi così basse (Patton, 1999).

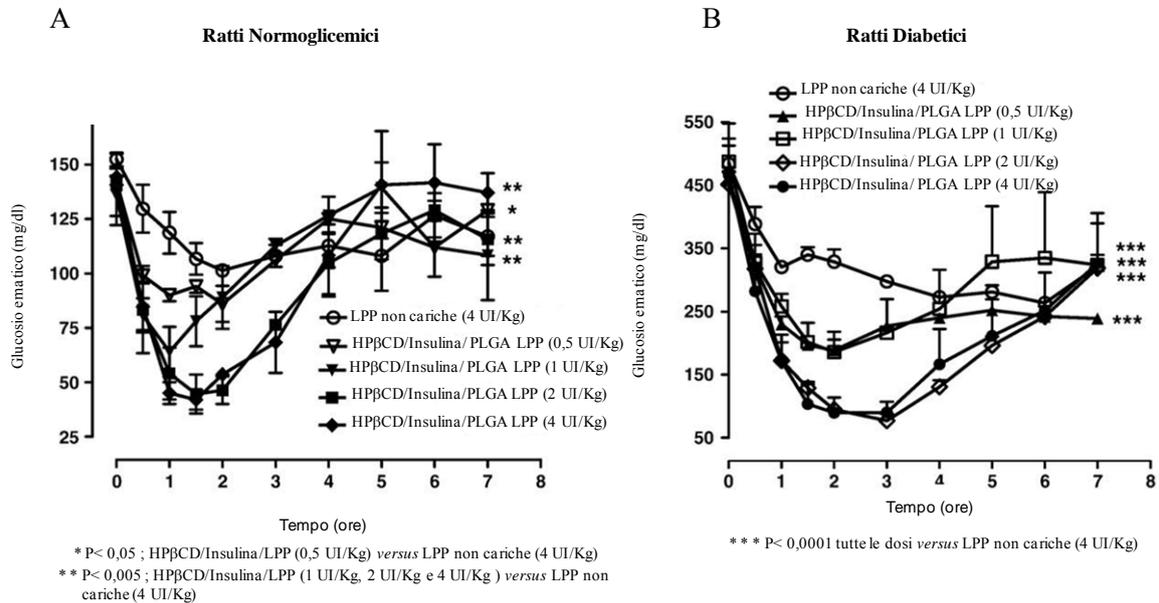


Figura 30. Livelli di glucosio ematico nel tempo in ratti normoglicemici (n=15) (pannello A) e ratti diabetici (n=15) (pannello B) dopo somministrazione intratracheale di differenti dosi di *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* (0,5; 1; 2; e 4 UI/Kg). LPP non cariche (4 UI/Kg) sono riportate come controllo. I valori di $p < 0,05$ sono considerati significativi.

Al fine di confermare l'attività ipoglicemica dell'insulina rilasciata dalle *HPβCD/Insulina/PLGA LPP*, i risultati farmacologici ottenuti dallo studio *in vivo* sono stati confrontati con quelli ottenuti a seguito di somministrazione intratracheale e sottocutanea di soluzioni di insulina (4 UI/Kg). Analizzando i grafici riportati nella figura 31 è interessante notare che la somministrazione polmonare di insulina in soluzione alla dose minima testata per le *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* non influenza in maniera significativa i livelli di glucosio ematico sia nei ratti normoglicemici che diabetici (Figura 31, pannello A-B). Tale risultato è in accordo con i numerosi studi riportati in letteratura i quali dimostrano che la somministrazione intratracheale di soluzioni di insulina non consente di controllare il livello di glucosio ematico a causa della scarsa stabilità della proteina nella formulazione (Cefalu, 1998), nonché la presenza di proteasi polmonari che riducono drasticamente l'emivita della proteina *in situ*

(Yamamoto, 1994; 1996). Il fatto che le *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* alla stessa dose (4 UI/Kg) esplicano un'attività ipoglicemica efficace suggerisce che il sistema è in grado di veicolare efficacemente la proteina e proteggerla dall'attività enzimatica.

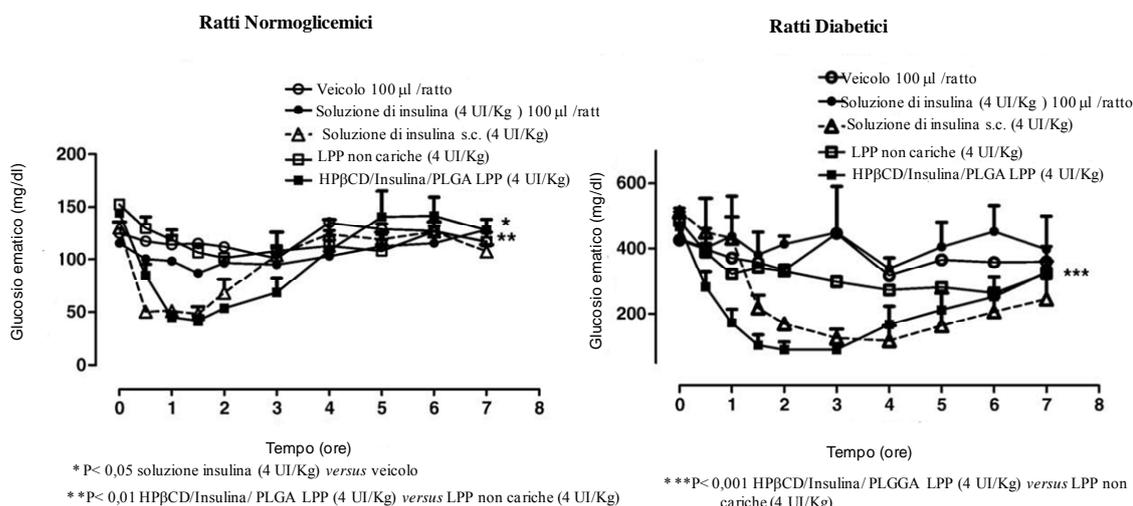


Figura 31. Livelli di glucosio ematico su ratti normoglicemici (n=15) (pannello A) e ratti diabetici (n=16) (pannello B) dopo somministrazione intratracheale di *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* (4 UI/Kg) o soluzione di insulina (4 UI/Kg). LPP non cariche (4 UI/Kg) e PBS (veicolo) sono riportate come controllo. Una soluzione sottocutanea di insulina (4 UI/Kg) è riportata come confronto. I valori di $p < 0,05$ sono considerati significativi.

Infine è stata calcolata la disponibilità relativa (%) delle polveri sviluppate, ottenendo per l'insulina inalata e per *HPβCD/Insulina/PLGA LPP* un valore di $10,2 \pm 0,8$ e $94,0 \pm 12,1$ nei ratti normoglicemici. Allo stesso modo nei ratti diabetici, i valori di disponibilità relativa sono $44,3 \pm 8,7$ e $152,0 \pm 20,0$ per l'insulina inalata e le *HPβCD/Insulina/PLGA LPP*, rispettivamente. Le LPP sviluppate, quindi, presentano un aumento di biodisponibilità di 5 volte maggiore rispetto all'insulina inalata, suggerendo che la massa di polvere da somministrare non deve essere necessariamente elevata. La possibilità di somministrare la polvere a basse dosi, offre il vantaggio di limitare i potenziali effetti tossici legati all'accumulo polmonare a lungo termine delle *HPβCD/Insulina/ PLGA LPP*.

2.6. Conclusioni

Le terapie farmacologiche impiegate attualmente nel trattamento del diabete si basano su somministrazioni ripetute di insulina, finalizzate ad ottenere un controllo del livello di glucosio ematico e ridurre i rischi associati a tale patologia. La via polmonare rappresenta un metodo alternativo ed innovativo per la somministrazione sistemica dell'insulina. Per sfruttare al meglio le potenzialità applicative di tale via, tuttavia, è necessario che la polvere sviluppata da inalare mediante DPI possieda proprietà di massa ben definite che, influenzando proprietà di flusso, disperdibilità e maneggevolezza, condizionano la capacità delle particelle di raggiungere le regioni profonde del polmone. I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi dimostrano che la co-incapsulazione di insulina e ciclodestrina in particelle a base di PLGA è essenziale per ottenere *large porous particles* con caratteristiche aerodinamiche tali da consentire il loro raggiungimento della regione alveolare del polmone. Studi di caratterizzazione *in vitro*, inoltre, evidenziano che le polveri sviluppate possiedono proprietà tecnologiche tali da determinare un controllo della velocità di rilascio della proteina nel tempo. I risultati *in vivo*, infine, confermano la capacità delle *HP β CD/Insulina/PLGA LPP* di raggiungere gli alveoli, determinando una riduzione dei livelli di glucosio ematico dose-dipendente. In particolare, la somministrazione intratracheale delle LPP nel ratto in evidenti condizioni patologiche risulta in un effetto ipoglicemizzante significativo e prolungato nel tempo anche a dosi molto basse di insulina (0,5 IU/Kg). In conclusione, le LPP sviluppate mostrano elevate potenzialità per il rilascio modificato di insulina al polmone. I dati *in vivo*, infatti, mostrano che le LPP sviluppate raggiungono gli alveoli, rilasciando insulina nella sua forma bioattiva.

CAPITOLO II

**Progettazione e sviluppo di *Large Porous Particles*
per il rilascio locale e prolungato di un
oligonucleotide decoy al polmone in pazienti affetti
da fibrosi cistica**

3. Introduzione

La fibrosi cistica (FC) è una delle patologie genetiche più diffuse e letali che colpisce soprattutto la popolazione caucasica (Collins, 1992; Cutting, 2005). È una malattia autosomica recessiva che si manifesta pienamente negli omozigoti e con nessuna sintomatologia negli eterozigoti. La patologia è causata da una mutazione del gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) che codifica per una proteina canale del cloro presente sulla membrana apicale delle cellule epiteliali.

Questa mutazione provoca principalmente un processo infiammatorio caratterizzato da un eccessivo richiamo di neutrofili ed un aumento del numero di citochine IL-6 e IL-8 nelle cellule epiteliali bronchiali (Kube, 2001). In particolare, la principale causa delle complicazioni che insorgono nei pazienti affetti da FC è l'infezione da parte di *Pseudomonas Aeruginosa* che provoca da un lato l'attivazione del Fattore Nucleare- κ B (NF- κ B) attraverso un recettore Toll-like (TLR) responsabile del processo infiammatorio (Greene, 2005), dall'altro l'attivazione del gene Muc-2 che codifica per la mucina, causando in questo modo un'iperproduzione di muco (Li, 1998).

Le principali terapie per il trattamento della FC si basano sulla somministrazione orale o inalatoria di corticosteroidi in associazione con farmaci antinfiammatori, antibiotici ed antivirali, a dosi differenti a seconda delle fasi di colonizzazione del ciclo d'infezione da *Pseudomonas* (Canton, 2005; Dinwiddie, 2005; Prescott, 2005). Sfortunatamente, fatta eccezione per le fasi iniziali di colonizzazione, la cura è solamente palliativa ma non curativa, in quanto si riesce a ridurre la massa cellulare batterica con scarse o nulle possibilità di eradicare l'infezione. Bisogna, inoltre, considerare che nel caso di terapie a lungo termine si possono sviluppare facilmente fenomeni di “*resistenza batterica*” (Woodford, 2007), senza dimenticare la tossicità tissutale e il danno che potrebbe essere causato dall'uso prolungato di molti dei farmaci utilizzati, come ad esempio il danno gastrointestinale da FANS (Mackey, 2004).

Negli ultimi anni un crescente interesse della ricerca scientifica è rivolto ad una terapia basata sull'impiego di acidi nucleici (Griesenbach, 2002), in particolare di piccoli frammenti di acidi nucleici definiti oligonucleotidi (ODNs). In tal senso, oligonucleotidi decoy (ODN decoy) in grado di interferire con la transattivazione del fattore NF- κ B possono rappresentare un utile strumento per attenuare lo stato di infiammazione cronica caratteristico della FC. Attualmente, sono in corso studi sperimentali per dimostrare la capacità di ODN decoy di alterare il *pathway* del fattore NF- κ B attivato nel corso dell'infiammazione, e in particolare la possibilità di bloccare il legame tra il fattore NF- κ B e le regioni promoter dei geni *target*, in modo da inibire la sintesi di varie citochine pro-infiammatorie-NF- κ B dipendenti. Nella FC una strategia terapeutica ottimale dovrebbe prevedere la somministrazione di ODNs decoy per via inalatoria in modo da consentirne il rilascio direttamente sulla superficie polmonare, evitando che si determini un'azione terapeutica anche in altri organi e tessuti non-*target* e quindi non coinvolti direttamente nella patologia (Ziady, 2006; Densmore, 2006). Sfortunatamente l'impiego terapeutico di ODNs è fortemente ostacolato dalla difficoltà di agire selettivamente nei siti *target* coinvolti nella patologia (i.e. polmone) e da una serie di fattori, quali la loro instabilità alle nucleasi e la scarsa permeabilità delle membrane cellulari al passaggio di molecole ad elevato peso molecolare.

Al fine di superare tali problematiche, una valida strategia è la progettazione, lo sviluppo e l'applicazione di sistemi microparticellari contenenti ODNs intesi per essere somministrati per via inalatoria direttamente in forma di polvere secca. Tali sistemi oltre ad avere la capacità di raggiungere il sito bersaglio per esplicare un'attività terapeutica a lungo termine, offrono il vantaggio di migliorare la stabilità *in vivo* del farmaco veicolato, diminuire la tossicità e prolungare il tempo di permanenza *in situ*.

In questa seconda fase del progetto di dottorato, sono state sviluppate LPP a base di PLGA per il rilascio controllato al polmone di un oligonucleotide decoy (dec-ODN) diretto contro NF- κ B per il trattamento della FC. Tali polveri devono veicolare localmente il dec-ODN e consentirne un rilascio progressivo nel tempo direttamente nel sito sede dell'infiammazione. Pertanto, sono state progettate e

sviluppate LPP che presentano un diametro aerodinamico medio e proprietà aerosolizzanti ottimali per la deposizione a livello di bronchi/bronchioli. Le particelle sono state formulate in modo da consentire l'efficace incapsulazione ed il rilascio controllato nel tempo del dec-ODN in forma bioattiva. Tali obiettivi sono stati perseguiti introducendo nella formulazione iniziale "*aid excipients*" di natura lipidica e valutando di volta in volta l'effetto dell'excipiente sulle proprietà tecnologiche della polvere.

3.1 Fibrosi cistica: fisiopatologia

3.1.1 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator): struttura e funzione

La FC è una malattia diffusa che colpisce la secrezione dei liquidi delle ghiandole esocrine e l'epitelio di rivestimento del tratto respiratorio, gastrointestinale e riproduttivo.

Ad oggi oggetto di discussione è l'identificazione delle cause genetiche che sono alla base della FC, tuttavia il modello più ampiamente accettato è che il difetto primitivo della malattia è causato da un'anomala funzione della proteina del canale epiteliale del cloruro codificata dal gene regolatore della conduttanza transmembrana in fibrosi cistica (CFTR) allocato sul cromosoma 7. La proteina codificata da CFTR ha due domini transmembrana, due domini citoplasmatici leganti i nucleotidi e un dominio regolatore R. L'attivazione del canale del CFTR è mediata da un agonista che induce un aumento dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP), seguito dall'attivazione di una proteina chinasi A che fosforila il dominio R. Il legame dell'adenosina trifosfato (ATP) e l'idrolisi avvengono nel dominio legante il nucleotide e questo è essenziale per l'apertura e la chiusura del canale in risposta al segnale mediato dal cAMP (Figura 32).

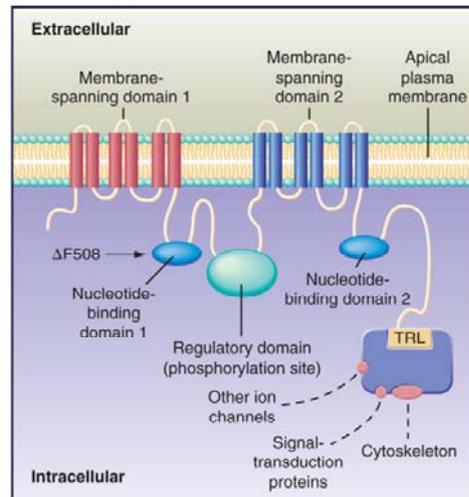


Figura 32. Struttura ed attivazione del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) (<http://www.mdconsult.com/das/book/body/146563804-2/0/1608/f4-u1.0-B978-1-4160-2450-7.50402-3.gr2.jpg>).

CFTR regola numerosi canali ionici e processi cellulari attraverso l'interazione con il suo dominio legante i nucleotidi. Questi comprendono i canali esocellulari per il cloruro, i canali intracellulari per il potassio, i canali epiteliali per il sodio (ENaC), canali a *gap junction* e processi cellulari coinvolti nel trasporto dell'ATP e nella secrezione mucosa.

Di questi, l'interazione di CFTR con ENaC ha probabilmente maggiore rilievo fisiopatologico nella FC. I canali ENaC sono situati sulla superficie apicale di cellule epiteliali esocrine e sono responsabili del trasporto intracitoplasmatico del sodio dalle secrezioni luminali, rendendole ipotoniche. I canali ENaC sono inibiti dalla normale funzione del CFTR; quindi, nella FC vi è un aumento dell'attività di ENaC con un conseguente incremento del trasporto di sodio attraverso le membrane apicali. La sola eccezione a questa regola si verifica a livello dei dotti delle ghiandole sudoripare umane, dove l'attività di ENaC diminuisce come risultato di una mutazione del CFTR. Perciò, il lume delle ghiandole sudoripare contiene una secrezione ipertonica ad alto contenuto di cloruro e di sodio.

Le funzioni di CFTR sono tessuto-specifiche e di conseguenza lo sono anche le mutazioni del gene. La più importante funzione di CFTR a livello dei dotti delle ghiandole sudoripare consiste nel riassorbimento degli ioni cloruro dal lume

ghiandolare e in un aumento del riassorbimento del sodio tramite ENaC. I canali CFTR, tuttavia, non sono solo responsabili del riassorbimento del cloruro, ma anche a livello dell'epitelio respiratorio ed intestinale, formano una delle più importanti vie per la secrezione attiva del cloruro all'interno del lume. In tali sedi, una mutazione di CFTR porta alla perdita o alla riduzione del cloruro escreto nel lume. L'assorbimento attivo del sodio intraluminare è, inoltre, aumentato (dovuto alla perdita dell'inibizione dell'attività di ENaC) ed entrambe queste modificazioni ioniche aumentano il riassorbimento passivo dell'acqua dal lume, abbassando il contenuto di acqua dalla superficie di rivestimento delle cellule delle mucose (Figura 33). A livello dei polmoni, questa disidratazione conduce a un *deficit* dell'attività mucociliare e all'accumulo di secrezioni iperconcentrate e viscosi che ostruiscono il passaggio dell'aria e predispongono a infezioni polmonari ricorrenti. L'assorbimento attivo del sodio intraluminare è inoltre aumentato (dovuto alla perdita dell'inibizione dell'attività di ENaC) ed entrambe queste modificazioni ioniche aumentano il riassorbimento passivo dell'acqua dal lume, abbassando il contenuto di acqua dalla superficie di rivestimento delle cellule.

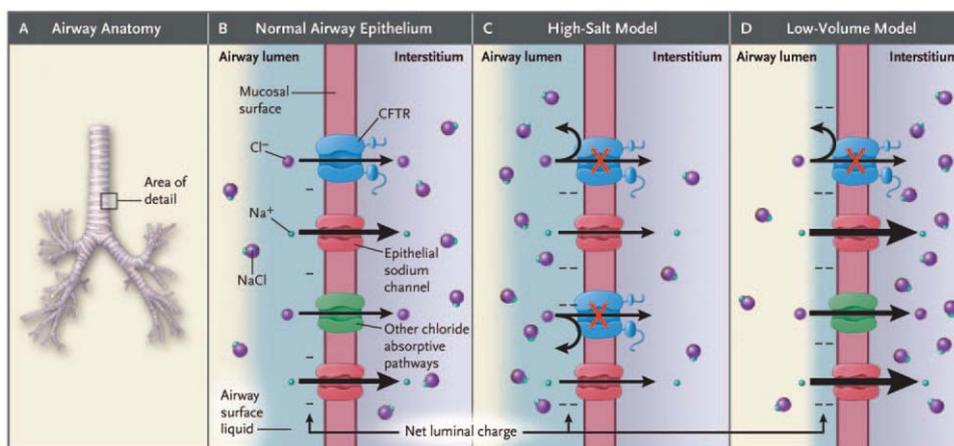


Figura 33. Rappresentazione del funzionamento del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) nelle vie aeree (Rowe, 2005).

Di recente, è stato dimostrato che CFTR può anche trasportare attivamente ioni bicarbonato in alcune varianti mutate di CFTR; in questo caso il trasporto del

cloruro è notevolmente conservato mentre il trasporto del bicarbonato è marcatamente alterato. I liquidi alcalini sono secreti da tessuti normali, al contrario liquidi acidi (da assenza di ioni bicarbonato) sono secreti da epitelii che presentano forme mutanti di CFTR. La riduzione luminale del pH, quindi, può produrre una serie di effetti avversi quali l'aumento della precipitazione della mucina con ostruzione dei dotti, e l'aumentata captazione dei batteri da parte dei tappi di mucina. L'insufficienza pancreatica è sempre presente quando ci sono mutazioni di CFTR con anomala conduttanza del bicarbonato (Robbins, 7^a ed.).

3.1.2 Aspetti clinici e diagnostici

La FC si manifesta con sintomi pancreatici, gastro-intestinali, respiratori, epatici e dell'apparato riproduttivo a differente insorgenza e manifestazione nei diversi pazienti. Nel 98% dei casi essi sono associati ad un *test* del sudore positivo, ma un piccolo numero di pazienti possono non presentare questa caratteristica, così come può non essere evidente nessuna delle manifestazioni della patologia accanto alle classiche presentazioni con ileo da meconio o sintomatologia respiratoria nel primo anno di vita. In genere si hanno casi di esordio con sintomatologia di malassorbimento, infezioni respiratorie recidivanti, epatopatie e disturbi della fertilità. Nei casi di: I) tosse pertussioide protratta, sibilante ricorrente e cronica; II) ritardo dell'accrescimento; III) riscontro radiologico di atelectasie; IV) diarrea cronica; V) poliposi nasale; è buona norma ipotizzare la presenza di FC e sottoporsi ai vari *tests* diagnostici.

Il coinvolgimento pancreatico è presente nell'85% dei pazienti e si manifesta con scariche frequenti di feci maleodoranti, untuose e voluminose. Le anomalie della secrezione pancreatica consistono in scarsa quantità, diminuita concentrazione di bicarbonato, alta concentrazione di enzimi, aumento della viscosità e diminuita capacità digestiva per i lipidi. I sintomi pancreatici possono manifestarsi a vari livelli di gravità; a volte si associa prolasso rettale, sintomi endocrini con iperglicemia e glicosuria che possono richiedere il trattamento sostitutivo insulinico e causare complicazioni di tipo diabetico. A livello epatico, si può avere ostruzione dei dotti biliari intraepatici per materiale eosinofilo, si può sviluppare cirrosi biliare con conseguenti ipertensione portale secondaria, ipersplenismo e varici esofagee. Per quanto concerne l'apparato riproduttivo, si può presentare ritardo puberale, probabilmente per la disfunzione ipotalamo-ipofisaria derivante dalla cronicità della malattia.

In particolare nel maschio si può avere aspermia, mentre nella femmina si riscontra un aumento dell'incidenza di gestazione, che potrebbe essere rischiosa qualora l'attività epatica o polmonare materna sono compromesse.

Per porre diagnosi di FC sono necessari almeno due dei tre criteri seguenti:

1. due *tests* del sudore successivi positivi, eseguiti mediante metodo di Gibson-Cooke; con valori di cloro maggiori di 60 mEq/l in un campione di 50 mg o più raccolto in 30 minuti;
2. anamnesi familiare positiva;
3. malattia polmonare ostruttiva cronica (*tests* di funzionalità respiratoria alterati, tosse cronica, rx torace patologico);
4. insufficienza del pancreas esocrino (malassorbimento dei grassi, scarso accrescimento ponderale, alterazione dei livelli sierici di vitamine liposolubili, feci caratteristiche).

Il metodo più affidabile per eseguire il *test* del sudore è la ionoforesi pilocarpinica secondo Gibson e Cooke, basata sulla stimolazione e sulla raccolta del sudore alla superficie volare dell'avambraccio, seguita dall'analisi quantitativa della composizione elettrolitica di un'adeguata quantità di sudore (minima quantità 100 mg). L'analisi chimica viene eseguita quantitativamente mediante fotometro a fiamma per il sodio e metodo titolimetrico per il cloro. Il *test* del sudore non è utilizzabile per lo *screening* di massa neonatale, in quanto il neonato non produce di regola la quantità di sudore necessaria per una valutazione adeguata.

Ad oggi, è possibile anche eseguire una diagnosi prenatale, basata sull'analisi degli enzimi microvillari nel liquido amniotico (Giovannini, 1990).

3.2 Fibrosi Cistica e coinvolgimento del tratto respiratorio

Durante la progressione della FC nei primi mesi di vita non si ha usualmente alcun segno clinico di interessamento polmonare. Tuttavia, è già nel primo anno che i pazienti iniziano a manifestare sintomi respiratori.

Le infezioni polmonari sono il sintomo più eclatante ma non l'unico; anche il tratto aereo superiore, infatti, è colpito da infezioni, spesso complicate da sinusite o otite cronica, e nel corso della vita il 20% dei pazienti sviluppa poliposi nasale.

Il decorso polmonare della FC varia da paziente a paziente: alcuni rimangono asintomatici per anni, altri sviluppano già nel primo anno di vita tosse cronica produttiva con espettorazione, dispnea e cianosi. Il più costante sintomo di coinvolgimento polmonare è la tosse, che varia da secca, abbaiente ad intensamente produttiva. I sintomi respiratori peggiorano periodicamente: la tosse si fa più produttiva, le secrezioni bronchiali più purulente, le condizioni generali più compromesse. I polmoni dimostrano accumulo di secrezioni ispessite nelle piccole vie aeree che comportano stenosi bronchiolare e successive infezioni. Lo studio anatomico-patologico documenta progressivamente il passaggio dall'infezione batterica all'infiltrazione peribronchiale e peribronchiolare, successiva distruzione della parete alveolare fino ad arrivare alla fibrosi irreversibile, che annuncia insufficienza respiratoria, cuore polmonare e morte.

3.2.1 Alterazione della clearance mucociliare

Il muco delle vie aeree è costituito da una miscela di secrezioni provenienti dalle cellule epiteliali e dal liquido interstiziale. Il principale componente del muco è l'acqua (95%), ma le sue proprietà chimico-fisiche sono profondamente influenzate dalla presenza di altri componenti, soprattutto da glicoproteine e sali. Il muco combina le caratteristiche di un liquido (viscosità) con quelle di un solido (proprietà elastiche). La viscosità del muco dipende dalla sua fluidità, a cui è legata in modo inversamente proporzionale. I meccanismi di depurazione delle vie aeree sono tre: battito ciliare, tosse e riassorbimento linfatico; tuttavia il muco

influenza solo i primi due meccanismi inglobando le particelle presenti nell'aria in modo da impedire il loro tragitto verso le vie aeree più profonde.

Nei pazienti affetti da FC si ha un'alterazione delle proprietà reologiche del muco che si presenta più viscoso e meno elastico a causa di un aumento del contenuto di glicoproteine. Come causa e/o conseguenza di tali alterazioni, si sviluppano ipertrofia delle ghiandole mucipare ed iperplasia delle cellule calciformi. Un meccanismo corollario alla deidratazione del muco potrebbe essere un'alterazione della normale funzione delle mucose nasali che, incapaci di provvedere ad una completa ed adeguata umidificazione e riscaldamento dell'aria inspirata, potrebbero concorrere alla deidratazione del muco nei bronchi distali e alla diminuzione della *clearance mucociliare*. Di fatto, il trasporto mucociliare in trachea nella FC è ridotto: si passa da un valore normale di 15-25 mm/min ad un valore di 0-8 mm/min.

Il ristagno delle secrezioni costituisce, inoltre, un ottimo *pabulum* per la colonizzazione batterica, lo sviluppo di infezioni secondarie e flogosi locale con broncospasmo ed edema. Le infezioni sono la principale causa di progressione e lesione del parenchima polmonare, in quanto possono determinare lesioni della parete delle vie aeree che sfociano in bronchiectasie e bronchioloectasie. Naturalmente le alterazioni mucose non avvengono solo a livello polmonare, ma anche in altri organi e tessuti a secrezione mucosa: pancreas, ghiandole della cervice uterina, tratto gastrointestinale, epididimo, vescicole seminali (Giovannini, 2000).

3.2.2 Ruolo di NF- κ B nel processo infiammatorio

Il Fattore Nucleare- κ B (NF- κ B) è un fattore di trascrizione proteico che induce la trascrizione di molteplici proteine pro-infiammatorie, quali molecole di adesione (ICAM-1), enzimi (COX-2, ossido nitrico sintasi), citochine (IL-1 β , TNF- α , IL-6), e chemochine (IL-8). Siccome tali molecole sono coinvolte nell'attivazione della cascata infiammatoria, NF- κ B è un mediatore intracellulare critico dell'infiammazione cronica che si sviluppa a livello polmonare nella FC. Il fattore NF- κ B appartiene alla famiglia delle proteine *Rel*, ed è un eterodimero costituito

da due subunità, p50 (detto anche NF- κ B1) e p65 (Rel A) (Figura 34). Ogni subunità lega il DNA, ma solo p65 contiene un dominio di trans-attivazione che attiva la trascrizione. Nelle cellule quiescenti, NF- κ B è sequestrato nel citoplasma mediante il legame con un membro della famiglia degli inibitori kappa B, che include I κ B- α e I κ B- β . Dopo la stimolazione cellulare, I κ B- α e I κ B- β vengono fosforilati, legati all'ubiquitina e degradati dal proteasoma 26S. La degradazione dell'I κ B smaschera il segnale di localizzazione nucleare (NLS) del peptide, che consente il trasporto del fattore NF- κ B all'interno del nucleo della cellula, dove lega il DNA nella zona che contiene la sequenza attivante la trascrizione del gene. Quindi, sia I κ B- α che I κ B- β hanno un ruolo determinante nell'attivazione e nella generazione dell'infiammazione acuta: in particolare I κ B- α è fondamentale per la *down-regulation* del fattore NF- κ B, mentre I κ B- β consente un'attivazione continuata del fattore NF- κ B. L'attivazione del *pathway* di NF- κ B può avvenire in seguito a svariati stimoli, quali Gram-negativi, endotossine, lipopolisaccaride (LPS), TNF- α e IL-1 β . Tali stimoli provocano l'attivazione della chinasi attivante il fattore NF- κ B (NIK). L'attivazione di NIK a sua volta provoca la fosforilazione delle chinasi per I κ B (IKK), che fosforilano di conseguenza I κ B. L'I κ B fosforilata subisce poi il legame all'ubiquitina e la degradazione da parte del proteasoma, consentendo il trasporto di NF- κ B nel nucleo.

E' stato osservato che nella FC vi è un aumento dei livelli di I κ B- β nelle cellule epiteliali che, fosforilato, previene l'inattivazione del fattore NF- κ B dall'I κ B- α , provocando un'attivazione prolungata del fattore NF- κ B. Non è ancora chiaro, tuttavia, il meccanismo attraverso il quale le mutazioni del gene CFTR possano alterare il *pathway* del fattore NF- κ B (John, 2000).

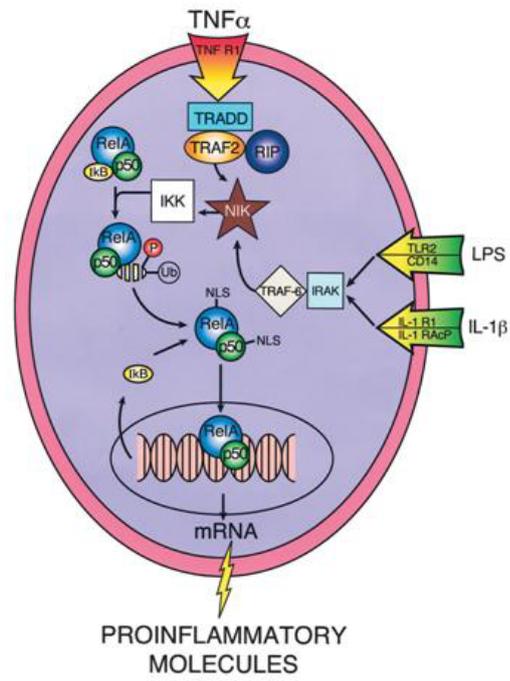


Figura 34. Pathway di NF- κ B (John, 2000).

3.3 Strategie terapeutiche

3.3.1 *Terapia pneumologia*

In una malattia progressivamente degenerativa come la FC, l'intervento terapeutico deve essere tempestivo, allo scopo di interrompere il circolo vizioso infezione-ostruzione prima dell'instaurarsi di un danno irreversibile.

L'umidificazione ha lo scopo di ridurre la deidratazione delle secrezioni e di nebulizzare farmaci direttamente nelle vie aeree e può essere eseguita mediante inalazione diretta di *aerosols*. La nebulizzazione di mucolitici o broncodilatatori, in associazione con la fisioterapia respiratoria, è utile alla mobilizzazione delle secrezioni ed alla riduzione delle resistenze delle vie aeree. In caso di broncospasmo, il farmaco di elezione è il salbutamolo, 200-400 µg/dose, eventualmente associato con beclometasone. Si può beneficiare anche di una terapia orale con teofillina alla dose di 15-20 mg/kg/die.

Fondamentale è la fisioterapia respiratoria (FTR), detta anche drenaggio posturale segmentale o *clapping*. Si basa su esercizi di respirazione finalizzati ad ottenere un efficace drenaggio delle secrezioni bronchiali, specie dopo pretrattamento con *aerosols* e decongestionanti. Nei casi più gravi, le sedute devono essere 3-4 al giorno, soprattutto durante le esacerbazioni e quando la frequenza della tosse aumenta.

Dal momento che le infezioni respiratorie ricorrenti o croniche sono la maggior causa di mortalità e morbilità nella FC, è necessaria anche una terapia antibiotica. Gli antibiotici possono essere somministrati sia nelle fasi acute che a scopo profilattico, per sopprimere la colonizzazione batterica delle vie aeree (Boxerbaum, 1982). Contrariamente al soggetto sano, nel paziente affetto da FC, le secrezioni delle vie aeree risultano colonizzate da batteri sia in assenza che in presenza di esacerbazioni acute.

I batteri più frequentemente ritrovati in questa malattia sono *Haemophilus Influenzae*, *Stafilococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Pseudomonas Capacia*. La terapia antibiotica ad oggi permette di eradicare l'infezione batterica sostenuta da *Haemophilus Influenzae* e *Stafilococcus Aureus* mentre risulta

inefficace per i ceppi di *Pseudomonas*. Benché esistano molti farmaci efficaci nei confronti dei microrganismi associati alla FC, non c'è accordo comune circa le indicazioni, la durata, la scelta ed il dosaggio della terapia antibiotica.

Infine, la terapia mucoattiva può apportare un valido contributo alla rimozione del muco dalle piccole vie aeree, cooperando a prevenire l'ingorgo che porta all'iperinfiltrazione polmonare, alle infezioni e all'ostruzione. Essa deve essere associata comunque ad umidificazione e a fisioterapia respiratoria. Sebbene sia stato dimostrato che molti farmaci quali l'Ambroxol, il Sobrero ed il Domiodolo sono efficaci nella terapia della FC, i tiolici con gruppo -SH bloccato (Carbocisteina) o con gruppo -SH libero (N-acetilcisteina, Tiopronina) sono allo stato attuale i farmaci maggiormente impiegati nella terapia mucolitica (Ferraris, 1983). In particolare, è stato dimostrato come la Carbocisteina sia particolarmente utile quando ad essa si associa la Amoxicillina nel trattamento delle infezioni da Gram-positivi. Infatti questa associazione induce un aumento della concentrazione dell'antibiotico nelle secrezioni bronchiali, così che mentre si esplica l'effetto mucoattivo si ha un'aumentata distribuzione dell'antibiotico (Fraschini, 1986).

3.3.2 Terapia generale non-pneumologica

Nel caso di insufficienza pancreatica, si consiglia di regola dieta ipercalorica e precisamente iperproteica-ipolipidica, avendo problemi di malassorbimento di grassi. Inoltre, a causa di deplezione salina che può essere causa di sindromi ipotensive durante febbri o diarree, si consiglia un'integrazione con cloruro di sodio. Altre condizioni che richiedono una particolare attenzione sono: ostruzione intestinale, cirrosi biliare, diabete, cuore polmonare e pubertà ritardata. Tuttavia, le strategie terapeutiche non differiscono da quelle adottate in condizioni simili in pazienti che non abbiano la FC.

3.3.3 *Terapia del difetto di base*

Un trattamento alternativo della FC consiste nell'uso di farmaci “*genetici*” (i.e DNA, RNA, ODNs) che agiscono sulle funzioni intracellulari e sull'espressione di CFTR. Le mutazioni del gene CFTR possono essere raggruppate in sei classi che provocano: 1) mancata sintesi (Classe I); 2) inadeguata sintesi e processazione (Classe II); 3) alterata regolazione (Classe III); 4) ridotta conduttanza del trasportatore (Classe IV); 5) riduzione quantitativa della proteina (Classe V); 6) rapida degradazione (Classe VI). Le mutazioni di classe I, II e III sono le più frequenti e sono associate all'insufficienza pancreatica. In base al tipo di mutazione del gene CFTR, si possono seguire quindi trattamenti terapeutici diversi.

Nel caso di mutazioni di I classe, definite anche “*stop mutations*”, gli aminoglicosidi possono indurre la completa sintesi della proteina CFTR con attività funzionale, agendo sui codoni di stop. Il problema però è che per sortire tale effetto sarebbero necessarie alte concentrazioni di farmaco che, a causa degli effetti collaterali, non viene quindi utilizzato. Un trattamento specifico, nelle mutazioni di classe II, è basato sull'impiego di composti che riducono la degradazione ed aumentano il trasporto di CFTR sulle membrane cellulari. Per quanto riguarda le mutazioni di III classe, che sono abbastanza rare, ad oggi sono in fase di sviluppo molecole promotrici capaci di attivare CFTR.

Un ulteriore approccio terapeutico è basato sulla stimolazione alternativa dei canali del cloruro. La secrezione del cloruro, infatti, nelle cellule epiteliali delle vie aeree non è limitata al CFTR; nelle cellule epiteliali c'è anche un canale del cloro Ca-dipendente che, se stimolato, potrebbe compensare la mancata azione del CFTR. *Clinical trials* sono in corso per valutare la capacità del Denufosol e del Lancovotide di stimolare la secrezione del cloruro tramite quest'ultimo canale (Burrows, 2006).

Oltre che stimolare la secrezione del cloro, si sta tentando di trovare strategie che vadano ad inibire i canali del sodio delle cellule epiteliali delle vie aeree, in quanto nei pazienti affetti da FC, è stata osservata una iper-espressione di tali

canali e quindi un iper-assorbimento di sodio che coopera al danno tissutale polmonare.

3.3.4 Terapia alternativa: somministrazione polmonare di un oligonucleotide decoy diretto contro NF- κ B

La strategia terapeutica proposta per la FC, in questo lavoro di tesi, prevede il blocco dell'attività del fattore NF- κ B mediante un oligonucleotide decoy (dec-ODN).

L'espressione del fattore NF- κ B, può essere inibita da un ODN decoy che presenta alta affinità per un fattore di trascrizione. È stato dimostrato che un ODN decoy riesce a bloccare il legame del fattore NF- κ B alle regioni promoter dei suoi geni *target* che codificano per proteine pro-infiammatorie, provocando così l'inibizione *in vitro* della trans-attivazione (Sharma, 1996). L'attivazione del fattore NF- κ B da *Pseudomonas Aeruginosa* nella FC è responsabile dell'eccessiva produzione di IL-6 e IL-8, dell'aumento dell'infiltrazione dei neutrofili e dell'*up-regulation* del gene Muc-2 (Kube, 2001; Saadane, 2006).

La capacità di un ODN decoy, dunque, di interferire con il *pathway* del fattore NF- κ B può essere di grande aiuto nel ridurre l'infiammazione cronica polmonare mediata dal fattore NF- κ B che è la causa principale di bronchioectasia e successiva morte dei pazienti affetti da questa patologia.

L'impiego terapeutico di ODNs decoy, è al momento fortemente ostacolato dal loro scarso profilo farmacocinetico. Gli ODNs sono caratterizzati, infatti, da una scarsa permeabilità cellulare a causa della loro natura polianionica e da una rapida degradazione enzimatica *in vivo*. La scarsa stabilità biologica, pertanto, associata con la loro rapida eliminazione, rendono ad oggi necessarie ripetute somministrazioni per ottenere un effetto farmacologico prolungato. Recenti studi hanno, pertanto, sottolineato la necessità di sviluppare un *carrier* per il superamento di tutte le problematiche associate all'impiego terapeutico di ODNs. In tal senso, microsfele biodegradabili a base di PLGA sono state impiegate con successo per il rilascio controllato di ODNs. L'incapsulazione di ODNs in microsfele biodegradabili può aumentare significativamente la stabilità nel siero preservandone la capacità di ibridizzazione promuovendone l'efficacia

terapeutica. La versatilità del sistema, inoltre, è tale che variando opportunamente i parametri formulativi, si può realizzare la cinetica di cessione del ODN desiderata ottimizzandone il profilo di attività (De Rosa, 2003).

In particolare, recenti studi hanno dimostrato che il rilascio prolungato di un ODN decoy da microsfele biodegradabili di PLGA permette di aumentare l'inibizione del fattore NF- κ B riducendo l'espressione di molecole pro-infiammatorie (De Rosa, 2005; De stefano, 2009).

3.4. Impostazione della ricerca

Sulla base dell'esperienza maturata nell'ambito della veicolazione polmonare di farmaci, nella seconda fase del lavoro di ricerca oggetto di questa tesi, sono state sviluppate LPP a base di PLGA per il rilascio modificato al polmone di un dec-ODN diretto contro il fattore NF- κ B in pazienti affetti da FC. Tali sistemi sono intesi per essere somministrati in forma di polvere secca, devono veicolare localmente il dec-ODN e consentirne un rilascio progressivo nel tempo direttamente nel sito sede dell'infiammazione. Pertanto, si è reso necessario uno studio preliminare di tipo tecnologico/formulativo finalizzato alla individuazione delle condizioni formulative più opportune per ottenere LPP con proprietà aerodinamiche ottimali per la deposizione a livello di bronchi/bronchioli. Tali formulazioni sono state, quindi, caricate con una molecola modello fluorescente, la Rodamina B isotiocianato-destrano (Rhod), che offre il vantaggio di una determinazione quantitativa mediante una tecnica analitica molto sensibile, quale la spettrofluorimetria, e la possibilità di effettuare un “*imaging*” *in vivo* delle LPP. Infine nella terza fase, nella formulazione ottimizzata in termini di proprietà aerodinamiche e tecnologiche (i.e., proprietà di incapsulazione/rilascio) è stato incapsulato il dec-ODN. Il lavoro sperimentale, pertanto, ha previsto:

1. messa a punto di LPP non cariche per la veicolazione del dec-ODN a livello di bronchi/bronchioli;
2. preparazione di LPP contenenti Rhod caratterizzate in termini di morfologia, dimensioni, tassi d'incapsulazione, cinetiche di rilascio e proprietà aerosolizzanti *in vitro*;
3. allestimento e caratterizzazione tecnologica di LPP contenenti dec-ODN. I risultati ottenuti sono stati confermati da studi farmacologici condotti in collaborazione con il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale di questa Università. In particolare, sono stati condotti studi di biodistribuzione *in vivo* delle LPP fluorescenti nel polmone del ratto. Studi di attività *in vitro* delle dec-ODN LPP sono stati, infine, condotti su cellule umane bronchiali epiteliali normali e con mutazione ΔF 508 stimulate con LPS da *P. Auriginosa*

3.5. Materiali e metodi

3.5.1 Materiali

L'acido poli (D,L-lattico-co-glicolico) (50:50) (PLGA) (Resomer RG 504H; Mw 41,9 kDa; i.v. 0,4 dl/g) è stato fornito dalla Boehringer Ingelheim (Germania). Gli oligodeossiribonucleotidi fosforotioati NF- κ B cons1(5'gsAsTs CsgsAs gsgsgs gsAsCs TsTsTs CsCsCs TsAsGs C) e NF- κ B cons2 (5'gsCsTs Asgsgs gsAsAs AsgTs CsCsCs CsTsCs gsAsTs C) sono stati acquistati presso la Tib Molbiol (Roche Diagnostics, Italia). Per preparare il dec-ODN in forma di doppia elica è stata seguita una metodica classica riportata in letteratura, nota come “*annealing*”. Tale metodica prevede la preparazione di una soluzione acquosa di NF- κ B cons1 e NF- κ B cons2, che viene prima riscaldata a 80°C per 5 min e quindi lasciata a temperatura ambiente per più di 18 ore. L'*annealing* del dec-ODN è stato effettuato prima di ogni esperimento. La Rodamina B isotiocianato-destrano (Rhod) polvere liofilizzata (Mw 10 kDa), l'alcool polivinilico (PVA, Mowiol® 40-88), il polisorbato 80, la sodio azide, il bicarbonato di ammonio e l'1,2-Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia). Il 1,2-dioleoil-3-trimetilammonio-propano (DOTAP) è stato acquistato presso la Lipoid (Germania). Il cloruro di sodio per analisi, il cloruro di potassio, il fosfato di sodio bibasico anidro, il bicarbonato di sodio e il diclorometano sono stati forniti dalla Carlo Erba (Italia). L'acqua impiegata negli esperimenti è stata preventivamente filtrata.

3.5.2 Analisi spettrofluorimetrica della Rodamina B isotiocianato destrano

L'analisi quantitativa della Rhod è stata effettuata mediante spettrofluorimetria. È stato impiegato uno spettrofluorimetro da banco Shimadzu RF 1501 (Shimadzu Milano, Italia) equipaggiato con una microcella in quarzo con cammino ottico di 0,1 cm (Hellma, Italia). L'intensità massima di fluorescenza della Rhod si registra a 575 nm dopo eccitazione a 556 nm. Al fine di costruire una retta di taratura, sono state preparate soluzioni standard di Rhod in acqua filtrata in un *range* di concentrazione da 0,1 a 2 µg/ml ed i valori dell'intensità di fluorescenza (IF) ottenuti sono stati riportati in grafico in funzione della concentrazione.

3.5.3 Analisi spettrofotometrica del dec-ODN

L'analisi quantitativa del dec-ODN è stata effettuata mediante spettrometria UV-visibile. È stato impiegato uno spettrofotometro da banco Shimadzu 1204 (Shimadzu, Milano, Italia) equipaggiato con una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 0,1 cm (Hellma, Italia). L'assorbanza massima del dec-ODN si registra a 262 nm. Al fine di costruire una retta di taratura, sono state preparate soluzioni standard di dec-ODN in acqua filtrata in un *range* di concentrazione da 0,065 a 1,30 nmol/ml ed i valori dell'assorbanza ottenuti sono stati riportati in grafico in funzione della concentrazione.

3.5.4 Preparazione delle LPP

Le LPP sono state preparate mediante la tecnica dell'emulsione multiplaevaporazione del solvente. Tale tecnica prevede la formazione di un'emulsione primaria acqua in olio (A/O) preparata solubilizzando una quantità nota di molecola modello (Rhod)/dec-ODN e/o agente porosigeno in 0,25 ml di acqua filtrata ed emulsionata successivamente in una soluzione di diclorometano (2,5 ml) contenente differenti concentrazioni di PLGA (15-20%) in presenza o meno di opportuni additivi. L'emulsione primaria è stata preparata usando un

omogeneizzatore ad alta velocità (Ystral) (sonda 6G) (Heidolph, Germania) operando a 15 000 rpm per 3 minuti. L'emulsione primaria (A_i/O) è stata poi aggiunta alla fase acquosa esterna (A_e) costituita da 25 ml di PVA all'1% (p/v), ottenendo una dispersione che è stata poi sottoposta ad omogeneizzazione a 11000 rpm (sonda 10F) per 2 minuti, con formazione di un'emulsione multipla ($A_i/O/A_e$). L'emulsione finale è stata posta sotto agitazione elettromagnetica (MR 3001K, Heidolph, Germania) per circa tre ore al fine di allontanare per evaporazione il solvente organico e precipitare il polimero in forma di microparticelle. Le LPP ottenute sono state lavate tre volte con acqua filtrata, previa centrifugazione a 5000 rpm e 4°C per 15 minuti (Hettich Zentrifugen, Universal 16R), congelate in N_2 liquido e sottoposte ad un ciclo di liofilizzazione della durata di 36 ore (0,001 atm, -60°C) (Modulo Edwards, Gran Bretagna). Quando necessario, NaCl (3-9% p/v) o NH_4HCO_3 (5-20% p/v) sono stati aggiunti nella fase acquosa interna dell'emulsione (A_i), mentre DOTAP o DPPC (0,1% p/v) sono stati aggiunti nella fase organica contenente PLGA.

LPP caricate con Rhod ad una incapsulazione teorica dello 0,3% (0,3 mg di Rhod per 100 mg di polvere) sono state preparate in presenza di NH_4HCO_3 (10% p/v) come agente porosigeno. DPPC e DOTAP sono stati testati come agenti in grado di modulare l'efficienza di incapsulazione.

LPP ottimizzate contenenti il dec-ODN (dec-ODN LPP) ad una incapsulazione teorica di 0,14 nmoli per mg di polvere sono state preparate in presenza di NH_4HCO_3 (10% p/v) e DPPC.

3.5.5 Caratterizzazione delle LPP

3.5.5.1 Analisi morfologica

La morfologia delle LPP è stata analizzata dopo liofilizzazione della polvere mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) (Leica S440, Germania). Per l'analisi il campione è stato posto su di un supporto metallico e rivestito sotto vuoto con sali d'oro per 120 s.

3.5.5.2 Osservazione al microscopio confocale

La distribuzione del principio attivo nella matrice polimerica e la morfologia interna delle LPP contenenti Rhod e FITC-PLGA, rispettivamente, è stata valutata mediante analisi al microscopio confocale. L'analisi è stata effettuata mediante un microscopio a scansione laser CLSM 510 (Carl Zeiss, Italia), equipaggiato con un obiettivo ad immersione 63 x 1,25 oil(C-Apochromat; NA =1,4), a partire da microsfere liofilizzate previamente sospese in Mowiol 40-88 *mounting medium*.

3.5.5.3 Analisi dimensionale

Il diametro medio e la distribuzione dimensionale delle LPP sviluppate è stata determinata utilizzando un granulometro laser (Coulter LS 100Q, USA) a partire da microsfere liofilizzate previamente sospese in una soluzione acquosa di PVA allo 0,5% (p/v). Il diametro medio delle particelle è stato espresso in $\mu\text{m} \pm$ la deviazione standard (SD) della misura effettuata in triplicato su tre differenti lotti di microparticelle.

3.5.5.4 Proprietà di flusso delle polveri

La densità apparente della polvere dopo impiccamento è stata misurata secondo il saggio della FU XII Ed. Una quantità pesata di polvere (100 mg) è stata versata in un cilindro graduato da 10 (\pm 0,05) ml ed il volume al versamento opportunamente annotato. Successivamente, il cilindro è stato sottoposto a vibrazioni meccaniche per 1250 volte, con un impaccatore modello IG/4 Giuliani (Italia), fino al raggiungimento di un volume costante. La densità apparente delle microsfere (ρ) è espressa come il rapporto tra il peso (g) e il volume in ml occupato dopo le 1250 vibrazioni.

Il diametro aerodinamico medio teorico (MMADt) delle particelle è stato valutato in base all'equazione (1):

$$\text{MMADt} = d (\rho/\rho_0 X)^{1/2} \quad (1)$$

dove d è il diametro geometrico medio, ρ_0 è la densità di riferimento di 1 g/ml e X è un fattore dinamico legato alla forma, che è 1 nel caso di una sfera. Per le particelle porose, si assume che la forma sia approssimativamente sferica per cui:

$$\rho \approx \rho_s(1-\varepsilon) \quad (2)$$

dove ρ_s è la densità vera delle particelle misurata con un picnometro, ε è la porosità delle particelle. Una misura approssimata di ρ come definita dall'equazione (2) è fornita dalla densità apparente (Vanbever, 1999).

3.5.5.5 Tassi di incapsulazione

La quantità di Rhod/dec-ODN incapsulata nelle LPP contenenti Rhod e dec-ODN, rispettivamente, è stata valutata mediante solubilizzazione del polimero in diclorometano e successiva estrazione del farmaco in fase acquosa. In particolare, 5 mg di microsfele sono state sospese in 1 ml di diclorometano e sottoposte ad agitazione fino a completa solubilizzazione del PLGA. Successivamente è stato aggiunto 1 ml di acqua filtrata, ottenendo così due fasi che sono state, poi, miscelate su vortex per 1 minuto fino ad ottenere un'emulsione. Dopo centrifugazione (mod. Universal 16 R, Hettich Zentrifugen, Germania) (15 minuti, 4°C, 5000 rpm), la fase acquosa è stata prelevata ed è stata effettuata un'analisi quantitativa della Rhod e del dec-ODN incapsulato mediante spettrofluorimetria e spettrofotometria, rispettivamente. I risultati sono stati espressi in termini d'incapsulazione reale percentuale \pm la deviazione standard (SD) della misura effettuata su tre differenti lotti. Nel caso delle LPP contenenti Rhod l'incapsulazione reale è stata espressa come mg di Rhod incapsulata *per* 100 mg di microsfele, per le dec-ODN LPP, invece, come nmoli di dec-ODN *per* mg di microsfele.

3.5.5.6 Studi di rilascio *in vitro*

Gli studi di rilascio *in vitro* delle LPP contenenti Rhod e delle dec-ODN LPP sono stati condotti in tampone fosfato (PBS) a 37°C mediante una metodica che prevede l'impiego di membrane da dialisi (MWCO: 50000 Da, Spectra/Por®). Il tampone fosfato (PBS) (Na₂HPO₄ 0,01 M, KCl 0,0027 M e NaCl 0,120 M) è stato modificato aggiungendo lo 0,05% p/v di sodio azide come agente conservante e il pH è stato portato a 7,2 con una soluzione di HCl 0,01 M. Una quantità pesata di LPP (5 mg) è stata sospesa in 0,35 ml di PBS e la sospensione ottenuta posta in un sacchetto da dialisi di 4 cm. All'esterno del sacchetto sono stati aggiunti 5 ml di PBS in modo da essere in condizioni *sink* ed il campione è stato posto in un bagnetto oscillante termostato a 37°C, per mimare le condizioni fisiologiche (condizioni dinamiche). Ad intervalli di tempo regolari è stato effettuato un prelievo del mezzo esterno (1 ml) e rimpiazzato con lo stesso volume di PBS fresco. Ad ogni prelievo il contenuto di Rhod e dec-ODN, rispettivamente, è stato analizzato quantitativamente secondo le metodiche spettroscopiche descritte.

Quando necessario, sono stati studiati i profili di rilascio della Rhod da LPP preparate in assenza di eccipienti (DPPC o DOTAP).

I risultati sono stati riportati come % di Rhod o dec-ODN rilasciato \pm la deviazione standard (SD) calcolata su tre differenti lotti di microsfele per ciascun tipo di cinetica di rilascio.

3.5.5.7 Proprietà aerosolizzanti *in vitro*

Le proprietà aerosolizzanti delle LPP contenenti Rhod e delle dec-ODN LPP sono state testate *in vitro* in seguito ad erogazione dal Turbospin®, un DPI con sistema respiro-attivato (PH&T Pharma, Milano, Italia). Per ogni analisi, una capsula rigida di gelatina (numero 2, Capsugel) è stata riempita con circa 20 mg di polvere e poi caricata nel Turbospin.

La deposizione polmonare delle LPP è stata analizzata *in vitro* utilizzando un Astra Type Multi-Stage Liquid Impinger (MSLI), Tipo ALI 1000 (Erweka, Italia).

Ognuno dei quattro stadi è stato riempito con 20 ml di diclorometano. La velocità di flusso è stata regolata a 60 l/min per 4 s usando un flussimetro digitale elettronico (DFM mode), secondo le specifiche della Ph.Eur VI Ed. La polvere depositata su ciascuno stadio è stata recuperata agitando il separatore, rimuovendo la sospensione di partenza e lavando con frazioni aggiuntive di diclorometano. L'apertura d'immissione e il filtro inferiore sono stati lavati entrambi con soluzioni di diclorometano. Le sospensioni presenti in ogni stadio sono state recuperate e portate a secco utilizzando un evaporatore rotante (Heidolph Instrument, Laborota 4010-digital). Sul precipitato è stata eseguita un' estrazione aggiungendo diclorometano e acqua filtrata (2 ml rispettivamente); dopo centrifugazione (5000 rpm, 15 min) dell'emulsione la fase acquosa è stata prelevata ed analizzata mediante spettrofluorimetria per la determinazione quantitativa della Rhod e spettrofotometria per la determinazione quantitativa del dec-ODN.

Al fine di valutare l'efficienza della metodica messa a punto, è stata effettuata una prova di *recovery* partendo da una quantità pesata di dec-ODN LPP (5 mg) sospesa in 20 ml di CHCl₂, trasferita nel primo stadio del MSLI e recuperata secondo la metodica descritta precedentemente.

A seguito dell' estrazione ed analisi del dec-ODN dalle LPP recuperate dal MSLI è risultato che l'efficienza del metodo di recupero del farmaco dal MSLI è pari al $84,97 \pm 5,29\%$.

La ED è stata calcolata pesando la capsula prima e dopo erogazione dal Turbospin®. I risultati sono espressi come percentuale di polvere erogata \pm la deviazione standard (SD) della misura effettuata su tre differenti lotti. La FPF, il MMAD_{sp} e la GSD sono state calcolate secondo le specifiche riportate in Ph.Eur VI Ed. Il valore di MMAD_{sp} si ottiene riportando, su un diagramma in scala logaritmica, la frazione cumulativa di principio attivo in funzione del diametro interno. Il diametro interno (cut-off) di ogni stadio è determinato in base alla definizione:

$$D=D_{60}(60/Q)^{1/2} \quad (4)$$

dove D_{60} è il diametro interno misurato ad una velocità di flusso di 60 l/min (i.e., 13,0; 6,8; 3,1 e 1,7 μm rispettivamente dallo stadio 1 a 4) e Q è la velocità di flusso utilizzata nel corso dell'esperimento.

3.5.5.8 Studi di deposizione *in vivo* delle LPP

Al fine di seguire il destino *in vivo* delle LPP sviluppate è stato condotto, in collaborazione con il Dipartimento di *Farmacologia Sperimentale* di questa Università, uno studio di biodistribuzione mediante microscopia in fluorescenza.

I ratti sono stati prima anestetizzati con iniezione intraperitoneale di uretano (15%, 1 mg/kg), e poi trattati con LPP contenenti Rhod (3 mg) somministrate mediante la via intratracheale. Immediatamente dopo la somministrazione, la cavità addominale del ratto è stata incisa, le membrane dell'epitelio polmonare sono state estratte e lavate con una infusione di due differenti soluzioni. La prima (10 ml/min per 5 min) conteneva PBS a pH 7,4 (NaCl 138mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,1mM, KCl 2,7mM). Una seconda soluzione (5 ml/min per 5 min) contenente una soluzione di formaldeide (4% w/v), è stata usata per fissare i tessuti. Sezioni trasversali del polmone sono state ottenute mediante criostato (Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtome, Sakura Finetek, USA) (spessore sezioni: 50 μm) ed analizzate al microscopio in fluorescenza (Leica DMRB). L'acquisizione delle immagini è stata effettuata utilizzando un programma specifico (Leica Application Suite Program V2.8.1). Al fine di valutare l'auto-fluorescenza del polmone sono stati condotti esperimenti di controllo mediante somministrazione intratracheale di particelle di solo PLGA (LPP non cariche).

3.5.5.9 Attività delle dec-ODN LPP *in vitro*

L'attività delle LPP contenenti dec-ODN è stata confermata da studi *in vitro* condotti in collaborazione con il Dipartimento di *Farmacologia Sperimentale* di questa Università. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule epiteliali

bronchiali umane IB3-1 (con la mutazione $\Delta F508$ CFTR) e S9 (con CFTR corretto), coltivate a 37°C in atmosfera di 5% CO₂/95% aria in LHC-8 (Leibovitz for human cells) contenente 5% di siero fetale bovino (FBS). Le cellule sono state stimulate con lipopolisaccaride batterico (LPS; 10 µg/ml) estratto da *P. Aeruginosa* (serotipo 10, rough) ed incubate per 24 e 72 ore. E' stata valutata l'espressione di citochine IL-6 e IL-8 mediante *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) e l'attivazione del fattore NF-κB mediante *Electrophoretic Mobility shift assay* (EMSA). Gli esperimenti sono stati eseguiti in presenza di dec-ODN LPP, LPP non cariche (blank LPP), e dec-ODN libero (naked dec-ODN), ad una concentrazione di 0,5 µM in tutti i casi descritti. Come controllo l'esperimento è stato eseguito a partire da LPP (0,5 µM) contenenti un ODN decoy mutato (dec-ODNMut), caratterizzato da una mutazione di quattro basi rispetto alla sequenza del dec-ODN diretto contro NF-κB.

I risultati sono espressi come media ± S.E.M. di n esperimenti. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il *test t di Student*. La significatività è stata calcolata con l'analisi della varianza (ANOVA) e con Bonferroni-corrected p value per il confronto di molteplici test, considerando significativi i valori di $p < 0,05$.

3.6 Risultati e discussione

In questa seconda fase del lavoro di tesi sono state sviluppate LPP a base di PLGA per il rilascio modificato di un dec-ODN diretto contro NF- κ B al polmone. ODNs decoy in grado di interferire con il fattore di trascrizione NF- κ B possono svolgere un ruolo attivo nel trattamento dell'infiammazione cronica polmonare, principale causa di bronchioectasia, perdita della funzionalità polmonare e successiva morte dei pazienti affetti da FC. Recenti studi dimostrano che microparticelle a base di PLGA consentono di migliorare l'attività farmacologica di ODNs con diversa struttura chimica e, se opportunamente formulate, permettono un rilascio controllato di macromolecole biologicamente attive direttamente nel polmone. In tal senso, particolare rilievo assumono le proprietà aerodinamiche delle polveri da progettare che, dopo somministrazione via *aerosol*, devono depositarsi nelle vie aeree inferiori per sortire un effetto terapeutico locale.

3.6.1 LPP non cariche: preparazione e caratterizzazione

Lo studio preliminare di tipo tecnologico/formulativo effettuato ha evidenziato che nello sviluppo di LPP a base di PLGA preparate mediante emulsione multipla-evaporazione del solvente, la presenza di un agente in grado di formare i pori, nonché la sua natura e concentrazione, svolge un ruolo fondamentale nel determinare la morfologia delle particelle.

Tabella 8. Composizione di LPP non cariche.

Formulazione	PLGA (%) p/v	NaCl (%) p/v	NH ₄ HCO ₃ (%) p/v	DPPC (%) p/v	DOTAP (%) p/v
DPPC20	20	-	-	0,1	-
DOTAP20	20	-	-	-	0,1
DPPC20_3CS	20	3	-	0,1	-
DPPC20_5AB	20	-	5	0,1	-
DPPC20_10AB	20	-	10	0,1	-
DPPC20_20AB	20	-	20	0,1	-
DPPC15_10AB	15	-	10	0,1	-
DOTAP15_10AB	15	-	10	-	0,1
DOTAP20_10AB	20	-	10	-	0,1

Le LPP di controllo (DPPC20 e DOTAP20), preparate in assenza di sali presentano una superficie liscia e non porosa (Figura 35A-B). L'aggiunta alla formulazione iniziale di NaCl (CS) determina la formazione di una popolazione disomogenea di particelle poco porose (Figura 35C). Tale effetto è ragionevolmente attribuibile alla scarsa stabilità dell'emulsione primaria legata alla presenza dell'elettrolita in acqua. Al contrario, l'aggiunta di NH₄HCO₃ (BA), porta alla formazione di LPP di forma e dimensioni omogenee (Figura 35D) (Yang, 2009). L'effetto porosigeno del BA è stato recentemente descritto da Kim *et al* e può essere rappresentato come in figura 36 (Kim, 2006). I pori sono originati durante l'evaporazione del solvente per la produzione di CO₂ e NH₃. Tuttavia, la quantità di sale effervescente aggiunta nella fase acquosa interna della doppia emulsione influenza notevolmente la morfologia delle particelle. Quando,

infatti, si aggiunge un'elevata quantità di BA (20%) si evidenzia una rottura della struttura microparticellare con conseguente collasso delle particelle (Figura 35E). In particolare, il 10% di BA rappresenta la concentrazione limite per ottenere particelle porose di grandi dimensioni e forma regolare.

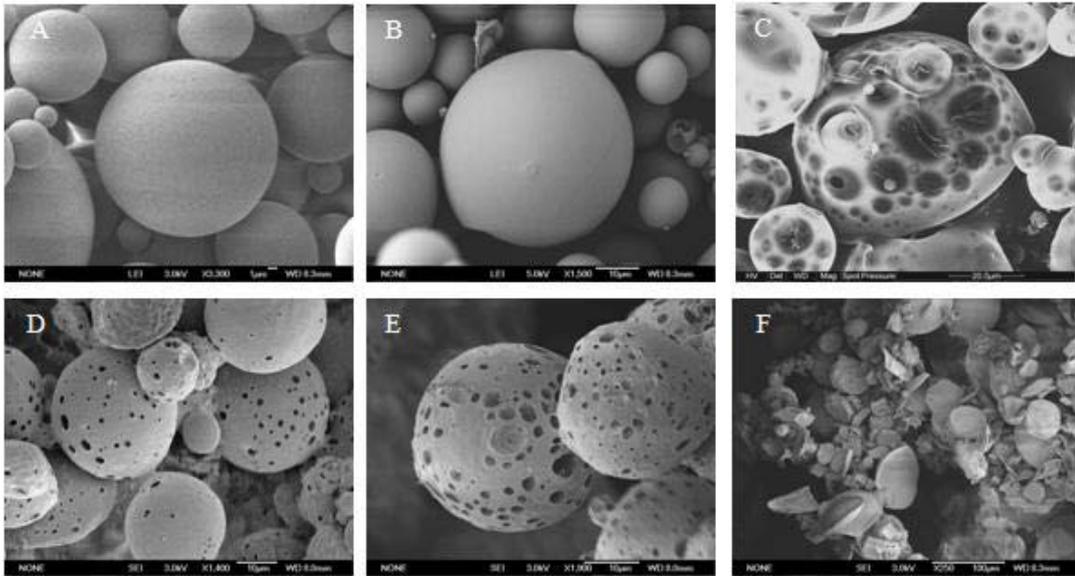


Figura 35. Immagini SEM delle LPP non cariche preparate con il metodo dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente: A) DPPC20; B) DOTAP20; C) DPPC20_3CS; D) DPPC20_5AB; E) DPPC20_10AB; F) DPPC20_20AB.

Sulla base dei risultati ottenuti, mantenendo fissa la concentrazione di sale effervescente, è stato valutato l'effetto della differente concentrazione di PLGA e del tipo di eccipiente aggiunto alla fase organica della doppia emulsione. Pertanto sono state allestite quattro formulazioni al 15 e al 20% (p/v) di PLGA contenenti DOTAP o DPPC.

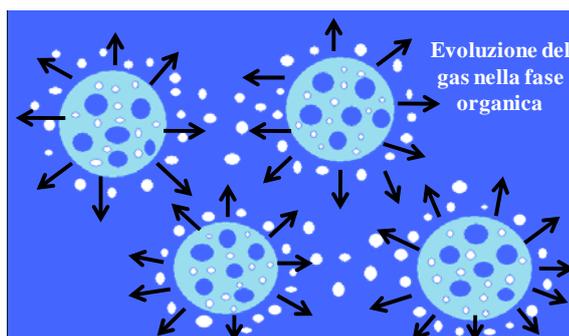


Figura 36. Rappresentazione schematica della decomposizione del sale effervescente con migrazione dei prodotti di decomposizione nella fase organica (Kim, 2006).

Le caratteristiche delle formulazioni sviluppate sono riportate nella tabella 9. Le polveri allestite, a fronte di un diametro geometrico elevato compreso tra 23,7 e 36,9 μm , sono caratterizzate da una densità apparente pari a circa 0,05 g/ml, ragionevolmente attribuibile alla loro elevata porosità (Van Campen, 2002). Tale parametro tecnologico assume un ruolo cruciale nel determinare le proprietà aerodinamiche della polvere. Da una stima preliminare del MMADt estrapolata dall'equazione (1), tutte le formulazioni presentano un $\text{MMADt} \leq 10 \mu\text{m}$ ad indicare buone proprietà di flusso e capacità di depositarsi nel tratto bronchiale per un'azione di tipo locale.

Tabella 9. Caratteristiche di LPP non cariche.

Formulazione	Diametro geometrico medio (d)^a ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	Densità apparente (ρ) ($\text{g/ml} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	MMAD_t^c ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)
DPPC15_10BA	23,7 \pm 2,1	0,04 \pm 0,005	4,6 \pm 0,1
DPPC20_10BA	31,2 \pm 1,5	0,04 \pm 0,01	6,8 \pm 0,7
DOTAP15_10BA	32,5 \pm 6,0	0,05 \pm 0,01	7,3 \pm 0,3
DOTAP20_10BA	36,9 \pm 2,0	0,06 \pm 0,003	9,5 \pm 0,3

^a Diametro medio geometrico determinato mediante granulometria laser.

^b Deviazione standard dei valori calcolati su tre differenti lotti.

^c Diametro aerodinamico medio stimato sulla base dell'equazione (1).

3.6.2 LPP contenenti Rhod: preparazione e caratterizzazione

Sulla base dei promettenti risultati ottenuti, le formulazioni ottimizzate dal punto di vista aerodinamico sono state selezionate come potenziali *carrier* per il rilascio controllato del dec-ODN al polmone. In tal senso, si è proceduto all'incapsulazione di una molecola modello idrofila, la sonda fluorescente Rodamina-destrano (Rhod). Le LPP contenenti Rhod sono state preparate con ottima resa mediante la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente, usando come agente porosigeno il BA. Sono state allestite differenti formulazioni variando la concentrazione di PLGA in fase organica nonché il tipo di additivo, DPPC o DOTAP, aggiunto alla formulazione. Si è ritenuto opportuno, inoltre, preparare una formulazione di controllo (15_Rhod) in assenza di eccipienti in fase organica (Tabella 10).

Tabella 10. Composizione di LPP contenenti Rhod.

Formulazione	PLGA (%) p/v	NH ₄ HCO ₃ (%) p/v	DPPC (%) p/v	DOTAP (%) p/v	Rhod (%) p/p
15_Rhod	15	10	-	-	0,3
DPPC15_Rhod	15	10	0,1	-	0,3
DPPC20_Rhod	20	10	0,1	-	0,3
DOTAP15_Rhod	15	10	-	0,1	0,3
DOTAP20_Rhod	20	10	-	0,1	0,3

L'analisi SEM delle LPP prodotte evidenzia un effetto dell'additivo aggiunto in fase organica sulla morfologia delle particelle (Figura 37). In particolare, nelle formulazioni preparate in presenza di DPPC, i pori si presentano omogenei, piccoli e ben distribuiti in superficie (Figura 37B -37C). Al contrario, entrambe le formulazioni contenenti DOTAP sono caratterizzate da un'elevatissima porosità, con pori tipicamente grandi e disomogenei (Figura 37D -37E). Una morfologia simile si osserva per le LPP di controllo (15_Rhod) (Figura 37A), suggerendo che la DPPC consente di ottenere un eccellente controllo delle condizioni di formazione delle microparticelle porose.

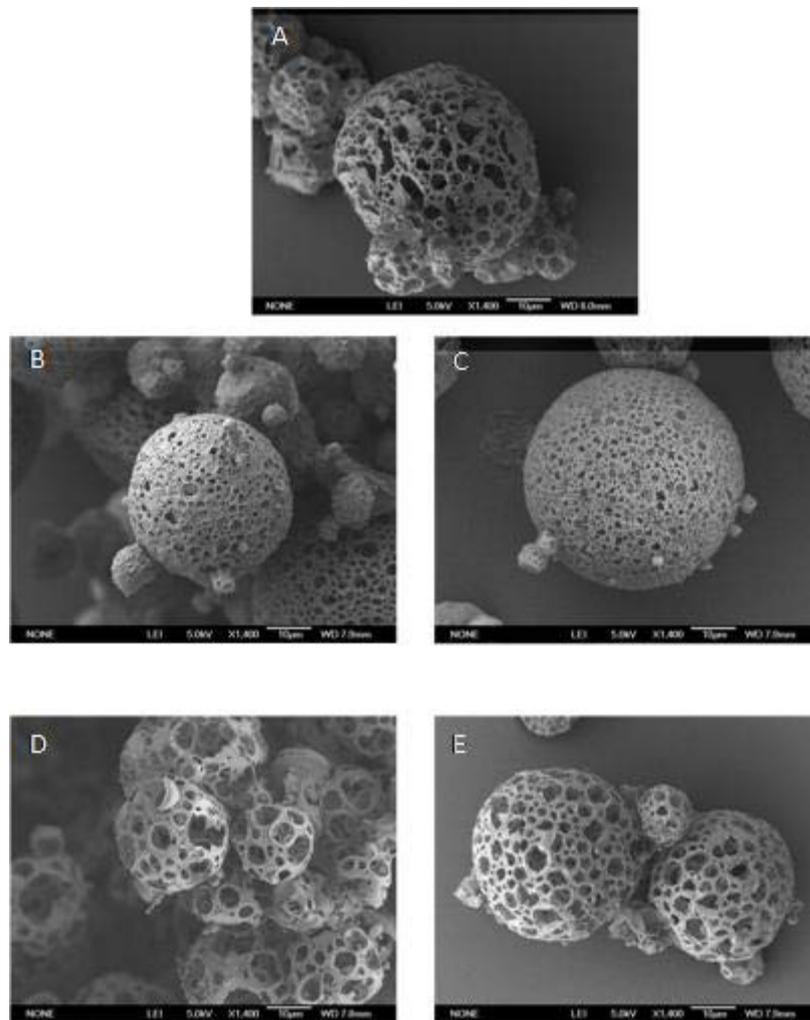


Figura 37. Immagini SEM delle LPP contenenti Rhod: A) 15_Rhod; B) DPPC15_Rhod; C) DPPC20_Rhod; D) DOTAP15_Rhod; E) DOTAP20_Rhod.

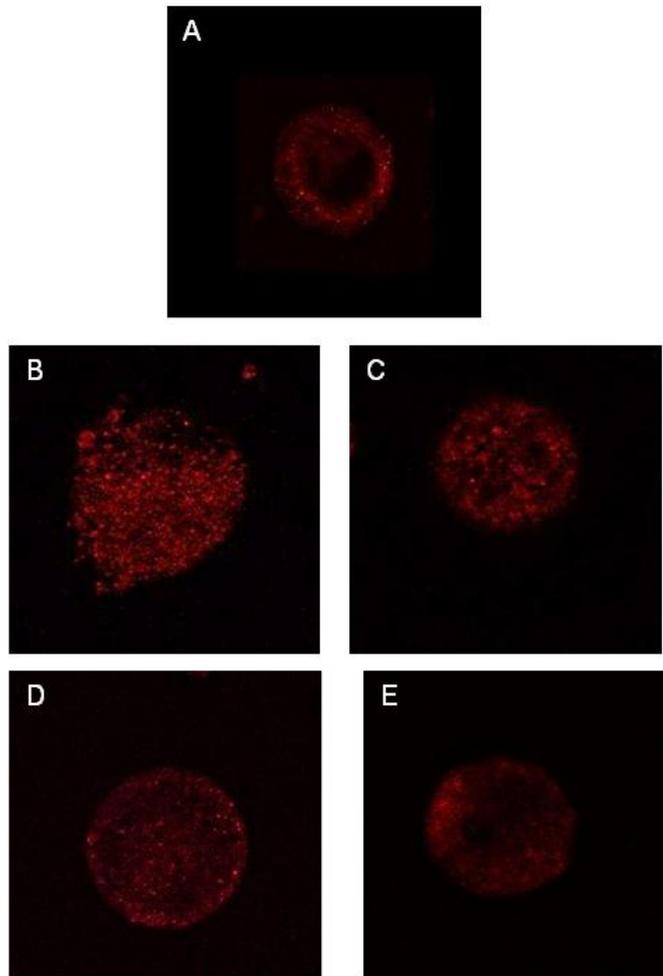


Figura 38. Immagini CLSM delle LPP contenenti Rhod: A) 15_Rhod; B) DPPC15_Rhod; C) DPPC20_Rhod; D) DOTAP15_Rhod; E) DOTAP20_Rhod. In ciascuna immagine è riportata la struttura di una singola microsfera, rappresentativa dell'intera popolazione.

L'analisi al confocale ha consentito di verificare la morfologia interna delle LPP, con particolare riguardo alla distribuzione della sonda nella matrice polimerica (Figura 38). Tutte le formulazioni contenenti DPPC o DOTAP, indipendentemente dalla concentrazione di PLGA, presentano una distribuzione omogenea della sonda fluorescente all'interno della matrice polimerica. Mentre le LPP di controllo mostrano una localizzazione preferenziale della Rhod lungo la superficie esterna. Tale fenomeno suggerisce che l'impiego dell'additivo lipofilo possa svolgere un ruolo cruciale nel determinare le proprietà di rilascio del sistema.

Le caratteristiche tecnologiche delle LPP contenenti Rhod sono riportate nella tabella 11, da cui si evince che le formulazioni messe a punto presentano tutte caratteristiche ottimali per la somministrazione polmonare via *aerosol*. Nello specifico, le polveri presentano un diametro geometrico medio compreso tra 25-34 μm ed una densità apparente inferiore a 0,1 g/ml. Inoltre, la stima del MMADt secondo l'equazione (1) evidenzia che tutte le formulazioni sono caratterizzate da un MMADt inferiore a 10 μm , dimostrando che le ottime proprietà aerodinamiche delle LPP non sono influenzate dall'aggiunta del farmaco.

Tabella 11. Caratteristiche delle LPP contenenti Rhod.

Formulazione	Diametro geometrico medio (d) ^a ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^b$)	Densità apparente (ρ) (g/ml \pm SD)	MMAD _t ^c ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^b$)	Incapsulazione reale ^d (mg/100 mg \pm SD ^b)	Efficienza di incapsulazione (% \pm SD ^b)
15_Rhod	33,9 \pm 8,20	0,04 \pm 0,01	5,7 \pm 0,5	0,05 \pm 0,004	17,1 \pm 0,57
DPPC15_Rhod	34,4 \pm 11,8	0,07 \pm 0,01	8,6 \pm 2,0	0,08 \pm 0,03	29,7 \pm 16,0
DPPC20_Rhod	34,9 \pm 4,8	0,08 \pm 0,02	9,6 \pm 0,2	0,05 \pm 0,02	21,1 \pm 6,1
DOTAP15_Rhod	28,4 \pm 0,2	0,05 \pm 0,01	6,3 \pm 0,8	0,07 \pm 0,03	23,6 \pm 10,3
DOTAP20_Rhod	25,8 \pm 4,0	0,05 \pm 0,01	5,5 \pm 0,1	0,17 \pm 0,007	80,2 \pm 0,6

^a Diametro medio geometrico determinato mediante granulometria laser.

^b Deviazione standard dei valori calcolati su tre differenti lotti.

^c Diametro aerodinamico medio stimato sulla base dell'equazione (1).

^d L'incapsulazione teorica è di 0,30 mg di Rhod *per* 100 mg di microparticelle.

Se la porosità delle LPP rappresenta un vantaggio in termini aerodinamici, da un punto di vista tecnologico il principale ostacolo incontrato nella formulazione di tali sistemi è rappresentato dalla loro scarsa efficienza di incapsulazione. In tal senso, i risultati ottenuti evidenziano in tutti i casi una efficienza pari a circa il 20%, fatta eccezione per le DOTAP20_Rhod la cui capacità di incapsulare la sonda fluorescente è sorprendentemente aumentata (circa l'80% rispetto alla dose iniziale).

Al fine di valutare la capacità della DPPC o del DOTAP aggiunti alla formulazione iniziale di modulare la velocità di rilascio del farmaco dal sistema poroso, sono stati eseguiti studi di rilascio *in vitro* mediante il metodo della dialisi a pH e temperatura fisiologica (7,2 e 37°C). Le LPP controllo (15_Rhod), fatta

eccezione per il *burst* ridotto ($16,4 \pm 3,4\%$ di Rhod rilasciata nei primi 30 minuti di incubazione), mostrano un rilascio più rapido rispetto alle corrispondenti formulazioni contenenti DPPC o DOTAP, ad indicare la capacità dell'eccipiente di modulare il profilo di rilascio del farmaco (Figura 39A). D'altra parte, la differente concentrazione di PLGA in fase organica potrebbe giocare un ruolo importante nel regolare il profilo di rilascio della Rhod dalle LPP (Figura 39B).

Tale effetto è particolarmente evidente nel caso delle LPP contenenti DOTAP, per le quali si osserva una riduzione della velocità di rilascio all'aumentare della concentrazione di PLGA in fase organica. Come già più volte discusso, il rilascio del principio attivo da microparticelle biodegradabili è regolato principalmente dalla diffusione del principio attivo incapsulato attraverso la matrice polimerica e dalla biodegradazione del polimero. La velocità di diffusione del farmaco e di erosione del polimero saranno fortemente influenzate dalla porosità interna delle particelle (i.e., micropori, mesopori e macropori), che evolve progressivamente in seguito alla degradazione idrolitica del PLGA. Nel caso di particelle ottenute per emulsione multipla, un aumento della viscosità della fase organica (i.e., un aumento della concentrazione di PLGA) può risultare in una più fine dispersione delle goccioline d'acqua, con conseguente riduzione della macroporosità interna del sistema (Ungaro, 2005). Nel caso di macromolecole come la Rhod, tale fenomeno determina una riduzione della velocità di rilascio durante la fase diffusiva dello stesso.

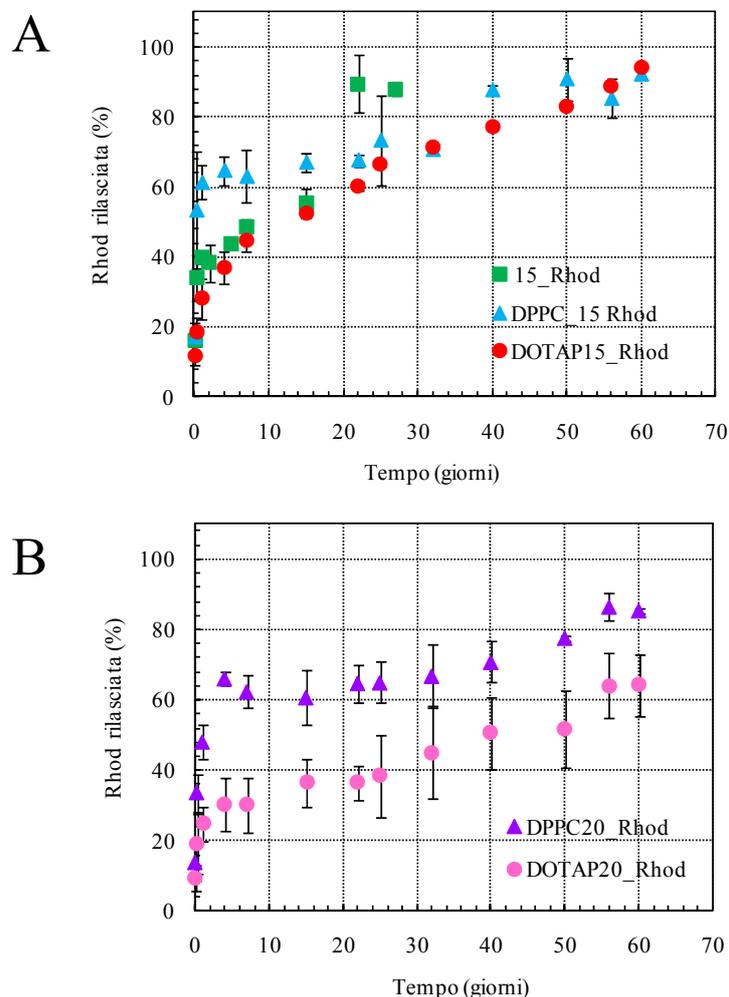


Figura 39. Profilo di rilascio *in vitro* delle LPP contenenti Rhod. Pannello A) LPP preparate al 15% (p/v) di PLGA in DCM. Pannello B) LPP preparate al 20% (p/v) di PLGA in DCM con diversi additivi (DPPC o DOTAP).

Considerando che tali sistemi sono stati intesi per la veicolazione polmonare di farmaci, è stato fondamentale valutarne le caratteristiche di aerosolizzazione *in vitro* mediante l'utilizzo del MSLI (60 l/min) dopo rilascio della polvere da un DPI respiro-attivato. Come gli esperimenti condotti con le LPP contenenti insulina, è stato impiegato il Turbospin®, in quanto caratterizzato da una resistenza intermedia ($0,08 \text{ cm(H}_2\text{O)}^{1/2} \cdot \text{min} \cdot \text{l}^{-1}$). Come osservato nel primo capitolo, tale caratteristica rappresenta un ottimo equilibrio tra la capacità inspiratoria del

paziente e l'effetto del flusso di aria sulla disaggregazione delle particelle (i.e. bassa variabilità inter-individuale) (Frijlink, 2004; Newman, 2002; Meakin, 1996).

I valori di ED, FPF e MMADsp sono riportati nella tabella 12. Fatta eccezione per le LPP 15_Rhod, che presentano una ED molto bassa ($27,4 \pm 6,7\%$), la ED delle formulazioni sviluppate è superiore all'80% in tutti i casi. Tale fenomeno è ragionevolmente attribuibile alla presenza di DPPC o DOTAP nelle polveri. L'aggiunta dell'eccipiente lipofilo, infatti, è considerata una strategia in grado di modulare le proprietà di flusso della polvere prevenendo fenomeni di aggregazione particellare (Vanveber, 1999; Bosquillon, 2001). In tutti i casi, il MMADsp è compreso tra 6-7 μm , confermando la stima teorica. Per le formulazioni contenenti DPPC o DOTAP, inoltre, una FPF pari a circa il 40% indica che più della metà della polvere presenta un MMADsp maggiore di 5 μm e, quindi, può distribuirsi lungo l'albero bronchiale.

Tabella 12. Proprietà aerosolizzanti *in vitro* delle LPP contenenti Rhod.

Formulazione	ED ^a (% \pm SD ^b)	FPF ^a (% \pm SD ^b)	MMADsp ^a (% \pm GSD ^c)
15_Rhod	27,4 \pm 6,7	51,9 \pm 7,2	6,1 \pm 1,7
DPPC15_Rhod	80,1 \pm 1,0	38,7 \pm 2,9	7,6 \pm 1,3
DPPC20_Rhod	97,1 \pm 3,9	44,9 \pm 1,6	6,8 \pm 1,2
DOTAP15_Rhod	59,8 \pm 12	44,7 \pm 1,5	6,0 \pm 1,2
DOTAP20_Rhod	81,1 \pm 0,4	46,3 \pm 0,4	6,4 \pm 1,2

^a ED: Dose emessa; FPF: Frazione Particellare Fine; MMADsp: Diametro Aerodinamico Medio Sperimentale.

^b Deviazione standard dei valori calcolati su tre differenti lotti.

^c Deviazione standard geometrica.

3.6.3 Preparazione e caratterizzazione delle LPP contenenti dec-ODN

Sulla base degli incoraggianti risultati ottenuti dallo studio preliminare di tipo tecnologico-formulativo, sono state sviluppate LPP a base di PLGA contenenti il dec-ODN (dec-ODN LPP). A tal fine, è stato introdotto quale eccipiente di natura lipofila nella fase polimerica la DPPC.

Le dec-ODN LPP sono state preparate con ottima resa mediante la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente a partire da una fase organica contenente PLGA al 15% p/v.

Dall'analisi SEM è evidente che le condizioni formulative adottate, permettono di ottenere una popolazione omogenea di particelle sferiche particolarmente porose (Figura 40A). Osservando la singola microsfera, inoltre, si riesce ad apprezzare la struttura dei pori superficiali, che si presentano come pori molto piccoli, regolari ed uniformemente distribuiti lungo l'intera superficie (Figura 40B). L'analisi CLSM di una formulazione di LPP analoghe preparate in presenza di PLGA funzionalizzato con una sonda fluorescente, quale la fluoresceina isotiocianato destrano (FITC), conferma la macroporosità interna del sistema (Figura 40C).

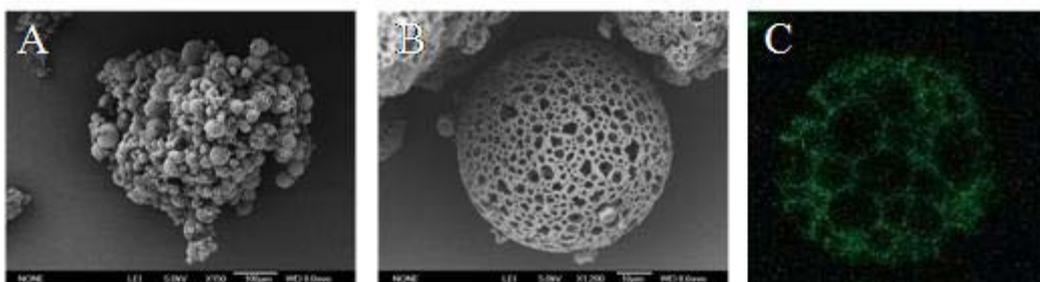


Figura 40. Analisi morfologica delle LPP contenenti dec-ODN: A) immagine SEM di un'intera popolazione; B) immagine SEM di una singola microsfera; C) immagine CLSM delle LPP preparate a partire da PLGA-FITC.

Come si evince dalla tabella 13, i valori di diametro geometrico medio ($32 \pm 4,8 \mu\text{m}$), densità apparente ($\leq 0,1 \text{ g/ml}$) e diametro aerodinamico medio teorico ($5,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$) delle dec-ODN LPP non sono molto lontani da quelli ottenuti per le corrispondenti LPP contenenti Rhod, a conferma del fatto che le proprietà di flusso delle LPP non sono variate in presenza di dec-ODN.

Particolarmente interessante, invece, è l'elevata efficienza di incapsulazione ottenuta per questo tipo di sistema (più dell'80% di dec-ODN incapsulato) che, come sottolineato precedentemente presenta una scarsa capacità di incapsulare farmaci idrofili in ragione della loro struttura porosa (Ahmed, 2008). Alla luce dei risultati ottenuti con le Rhod, appare chiaro che il tasso di incapsulazione è fortemente influenzato dalle caratteristiche intrinseche (chimico/fisiche) del farmaco incapsulato. Tale effetto, infatti, è ragionevolmente attribuibile all'elevata densità di carica del dec-ODN che può, quindi, instaurare interazioni di tipo elettrostatico con gli eccipienti di natura polimerica e lipidica presenti nelle polveri.

Tabella 13. Caratteristiche delle dec-ODN LPP.

	dec-ODN LPP
Diametro geometrico medio (d) ^a ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	$32,8 \pm 4,2$
Densità apparente (ρ) ($\text{g/ml} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	$0,04 \pm 0,02$
MMAD _t ^c ($\mu\text{m} \pm \text{SD}^{\text{b}}$)	$5,5 \pm 1,2$
Incapsulazione reale (nmol/mg di LPP)	0,14
Efficienza di incapsulazione (%)	$80,3 \pm 7,9$

^a Diametro medio geometrico determinato mediante granulometria laser.

^b Deviazione standard dei valori calcolati su tre differenti lotti.

^c Diametro aerodinamico medio stimato sulla base dell'equazione (1).

Considerando che le LPP sviluppate sono intese per il rilascio modificato del dec-ODN, sono stati eseguiti studi di rilascio *in vitro* del dec-ODN dalle dec-ODN LPP mediante il metodo della dialisi a pH e temperatura fisiologica (pH 7,2 e 37°C) (Figura 41). Le dec-ODN LPP mostrano un tipico andamento trifasico caratterizzato da un *burst* iniziale pari al $7,61 \pm 3,53\%$, seguito da una fase di rilascio molto lenta che si completa in circa trenta giorni. L'effetto *burst* è comunemente attribuito alla rapida liberazione del farmaco presente sulla superficie o nella zona immediatamente adiacente ad essa (Washington, 1996). Sebbene in questo caso il sistema è molto poroso, il *burst* notevolmente ridotto può essere attribuito alla presenza di un terzo componente, la DPPC che, distribuendosi lungo la superficie delle particelle, inibisce la perdita di farmaco nell'arco dei primi 30 minuti d'incubazione (Feng, 2001).

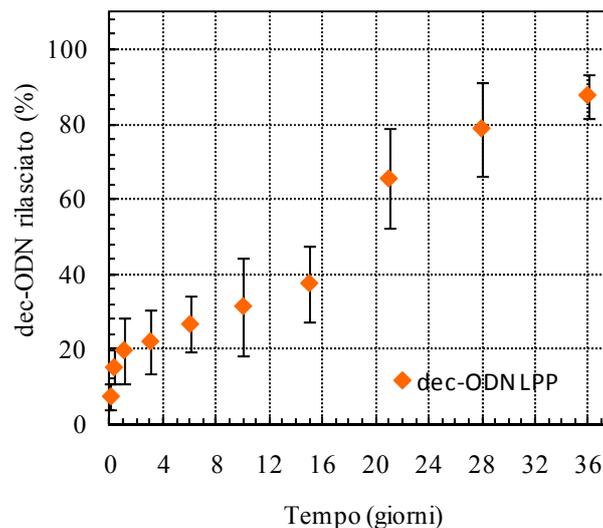


Figura 41. Profilo di rilascio *in vitro* del dec-ODN dalle dec-ODN LPP valutati in PBS a pH 7,2 e 37°C.

La potenzialità delle dec-ODN LPP nella veicolazione polmonare del dec-ODN è stata confermata *in vitro* dagli studi di deposizione con MSLI. La ED, la FPF e il MMADsp sono riportati in tabella 14. Le dec-ODN LPP presentano un'elevata disperdibilità, infatti più del 95% della polvere è stata emessa durante

l'aerosolizzazione per ogni esperimento, come riflesso delle ottime proprietà aerodinamiche. La distribuzione omeogena della polvere all'interno dei quattro stadi del MSLI suggerisce, inoltre, che le LPP possono distribuirsi *in vivo* lungo bronchi e bronchioli. Tale potere è confortato da un MMAD_{sp} di 6 µm.

Tabella 14. Caratteristiche delle dec-ODN LPP.

	dec-ODN LPP
ED ^a (% ± SD ^b)	95,9 ± 9,2
FPF ^a (% ± SD ^b)	49,0 ± 2,6
MMAD _{sp} ^a (µm ± SD ^b)	5,9 ± 1,3

^a ED: Dose emessa; FPF: Frazione Particellare Fine; MMAD_{sp}: Diametro Aerodinamico Medio Sperimentale.

^b Deviazione standard dei valori calcolati su tre differenti lotti.

^c Deviazione standard geometrica.

3.6.3.1 Studio di deposizione in vivo delle LPP

Studi di deposizione *in vivo* delle LPP sviluppate, condotti in collaborazione con il Dipartimento di *Farmacologia Sperimentale* di questa Università, sono stati finalizzati a chiarire il loro destino nell'albero respiratorio. Per poter analizzare il tessuto polmonare mediante microscopia in fluorescenza, è stata impiegata la sonda fluorescente Rhod. Nella figura 42 sono, quindi, riportate le immagini in fluorescenza ottenute dopo somministrazione intratracheale delle DPPC15_Rhod. Dalle immagini si evidenzia la presenza di *spot* rossi, attribuibili alle LPP, nella trachea, nei bronchi e nei bronchioli; sono, invece assenti negli alveoli, a conferma che il diametro aerodinamico delle LPP sviluppate è tale da consentire una distribuzione omogenea nel tratto respiratorio desiderato. D'altra parte, l'assenza di polvere negli alveoli riduce il rischio di una ridotta biocompatibilità del dec-ODN legata ad un suo eventuale assorbimento sistemico. Esperimenti di controllo, effettuati mediante somministrazione intratracheale di LPP non cariche hanno, inoltre, confermato che il tessuto non mostra fenomeni di autofluorescenza nel canale del rosso.

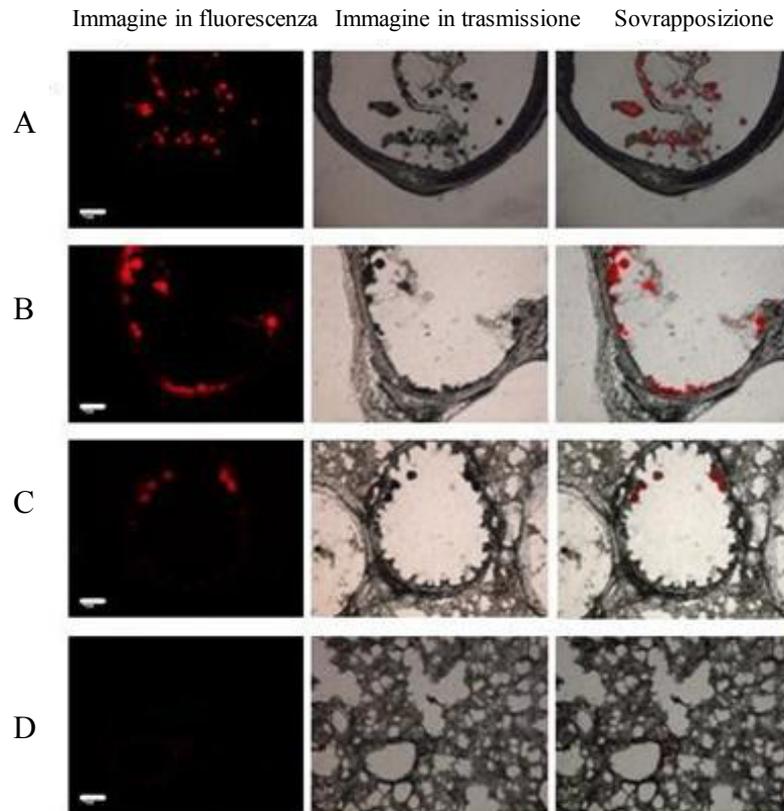


Figura 42. Localizzazione delle DPPC15_Rhod nel polmone del ratto. DPPC15_Rhod (rosso) in sezioni da 50 μm della A) trachea; B) bronco principale; C) bronco lombare; D) dotti alveolari.

3.6.3.2 Studio di attività delle dec-ODN LPP in vitro

3.6.3.2.1 Effetto sull'attivazione del fattore NF- κ B

L'attività delle dec-ODN LPP è stata confermata da studi *in vitro* condotti in collaborazione con il Dipartimento di *Farmacologia Sperimentale* di questa Università. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule epiteliali bronchiali umane IB3-1 e S9 a seguito di stimolazione con LPS per 24 e 72 ore.

L'effetto del dec-ODN rilasciato dalle dec-ODN LPP o dec-ODN *naked* sull'attività di legame del fattore NF- κ B al DNA è stato valutato mediante esperimenti di EMSA su estratti nucleari di cellule IB3-1 stimulate con LPS per 24 e 72 ore.

La stimolazione delle cellule con LPS determina un incremento significativo di complessi DNA/proteina, indice dell'attivazione del fattore NF- κ B. Il trattamento delle cellule con il dec-ODN rilasciato dalle LPP sviluppate (0,5 μ M) determina una diminuzione significativa dell'attività di legame del fattore NF- κ B al DNA ($38,52 \pm 11,20\%$ e $63,22 \pm 1,51\%$ a 24 e 72 ore, rispettivamente; $n = 3$). Dec-ODN *naked*, alla stessa concentrazione, riduce l'attività di legame del fattore NF- κ B al DNA solo a 24 ore ($50,25 \pm 9,17\%$; $n = 3$). Dec-ODNMut rilasciato da LPP e *blank* LPP non mostrano alcun effetto (Figura 43A). Le cellule S9 presentano lo stesso profilo delle cellule IB3-1 (Figura 43C). La caratterizzazione del complesso NF- κ B/DNA è stata determinata mediante esperimenti di competizione e supershift su estratti nucleari di cellule IB3-1 (Figura 43B) e S9 (Figura 43D) stimulate con LPS per 24 ore. La specificità di legame del complesso NF- κ B/DNA è stata confermata dalla completa competizione da parte di un eccesso (circa 50 volte molare) dello stesso ODN non marcato. In contrasto, un pari eccesso molare di un ODN con la sequenza consenso per NF- κ B mutata o la sequenza consenso per il fattore di trascrizione Sp-1 non mostra alcun effetto sull'attività di legame al DNA. La composizione del complesso DNA/proteina, indotto da LPS, è stata analizzata mediante aggiunta di anticorpi contro le subunità del fattore NF- κ B p50 e p65. Sia l'anticorpo anti-p50 che anti-p65

determina una caratteristica migrazione ritardata della banda suggerendo che il complesso DNA/proteina è costituito prevalentemente da dimeri di p50 e p65.

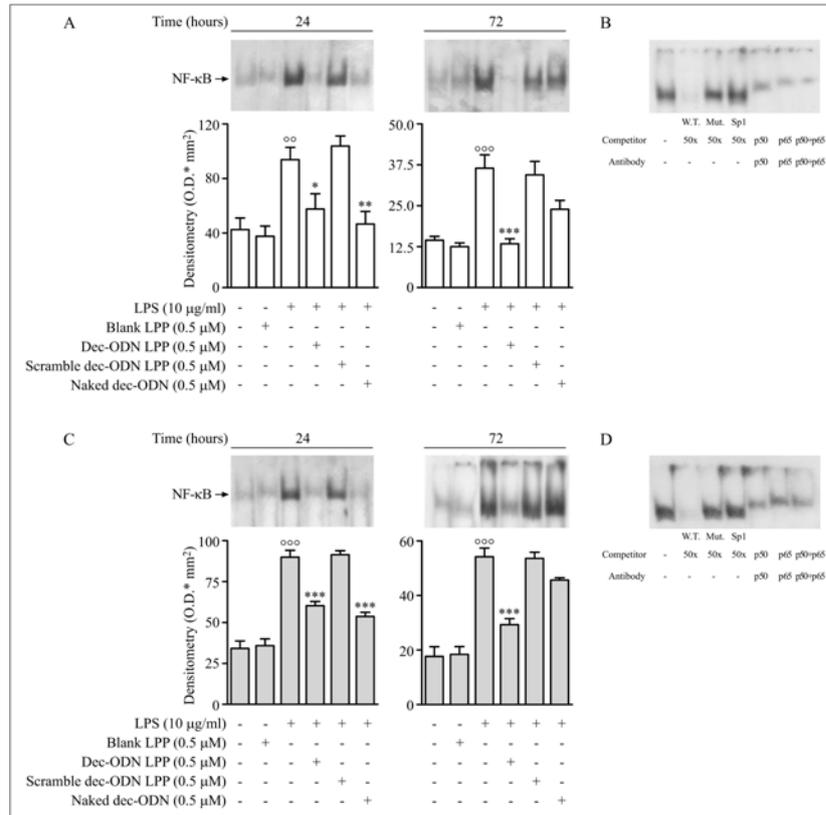


Figura 43. EMSA rappresentativo dell'attività di legame del fattore NF- κ B al DNA in estratti nucleari di linee cellulari IB3-1 (A) ed S9 (C) stimulate con LPS per 24 e 72 ore in presenza o in assenza di dec-ODN rilasciato da LPP e dec-ODN *naked*. I risultati in (A e C) provengono da un unico esperimento e sono rappresentativi di tre esperimenti separati. I dati densitometrici sono espressi come media \pm S.E.M. di tre esperimenti separati. ^{oo} $p < 0,01$, ^{ooo} $p < 0,001$ vs. cellule non stimulate, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. LPS da solo. Caratterizzazione del complesso NF- κ B/DNA in estratti nucleari di cellule IB3-1 (B) e S9 (D) stimulate con LPS per 24 ore. Nella reazione di competizione, gli estratti nucleari sono stati incubati con il probe di ODN W.T. radiomarcato in assenza o presenza di: lo stesso oligonucleotide non marcato (W.T., 50x); un oligonucleotide contenente la sequenza di NF- κ B mutata (Mut., 50x); un oligonucleotide contenete la sequenza di consenso per Sp-1 (Sp-1, 50x). Negli esperimenti di supershift gli estratti nucleari erano incubati con anticorpi anti-p50 e anti-p65, 15 minuti prima dell'incubazione con il probe W.T.

3.6.3.2.2 *Effetto sull'espressione di geni IL-6 e IL-8*

L'effetto del dec-ODN rilasciato dalle dec-ODN LPP o dec-ODN *naked* sull'espressione di geni IL-6 e IL-8 è stato valutato mediante esperimenti di RP-PCR su estratti nucleari di cellule IB3-1 stimulate con LPS per 24 e 72 ore. La stimolazione delle cellule IB3-1 con LPS (10 µg/ml) per 24 e 72 ore determina un incremento significativo dell'espressione di IL-6 e IL-8 se comparata con i livelli delle cellule non stimulate. Il trattamento delle cellule con dec-ODN rilasciato da LPP (0,5 µM) riduce, in maniera significativa, i livelli di mRNA di IL-6 e IL-8 ($74,12 \pm 1,16\%$ e $68,01 \pm 0,67\%$, a 24 ore, rispettivamente; $83,74 \pm 0,27\%$ e $82,79 \pm 0,94\%$, a 72 ore, rispettivamente; n=3). Dec-ODN *naked*, alla stessa concentrazione, riduce l'espressione di IL-6 e IL-8 solo a 24 ore ($50,13 \pm 0,81\%$ e $39,51 \pm 0,55\%$, rispettivamente; n=3). Dec-ODNMut rilasciato da LPP e *blank* LPP non mostrano alcun effetto (Figura 44A e 45A). Le cellule S9 mostrano lo stesso profilo delle cellule IB3-1 (Figura 44B e 45B). Tutti i trattamenti, alle concentrazioni utilizzate, da soli o in combinazione con LPS non modificano la vitalità cellulare (>95%).

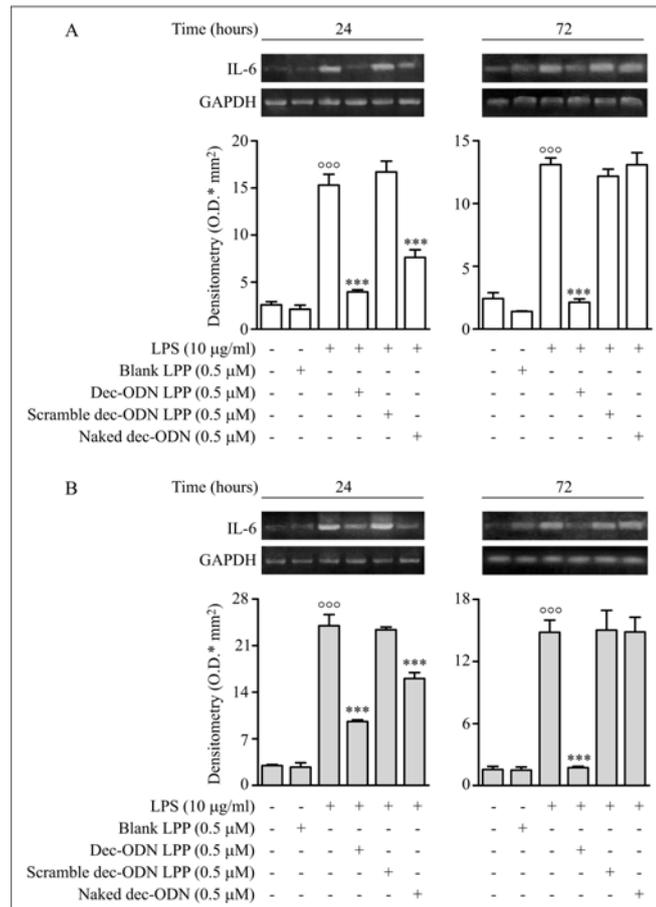


Figura 44. Reverse Transcription PCR mostra i livelli di mRNA di IL-6 cellule in IB3-1 (A) e S9 (B) stimulate con LPS (10 µg/ml) per 24 e 72 ore. I risultati in (A e B) provengono da un unico esperimento e sono rappresentativi di tre esperimenti separati. L'espressione del GAPDH è riportata come controllo. I dati densitometrici sono espressi come media ± S.E.M. di tre esperimenti separati. ^{ooo} p < 0,001 vs. cellule non stimulate, ^{***} p < 0,001 vs. LPS da solo.

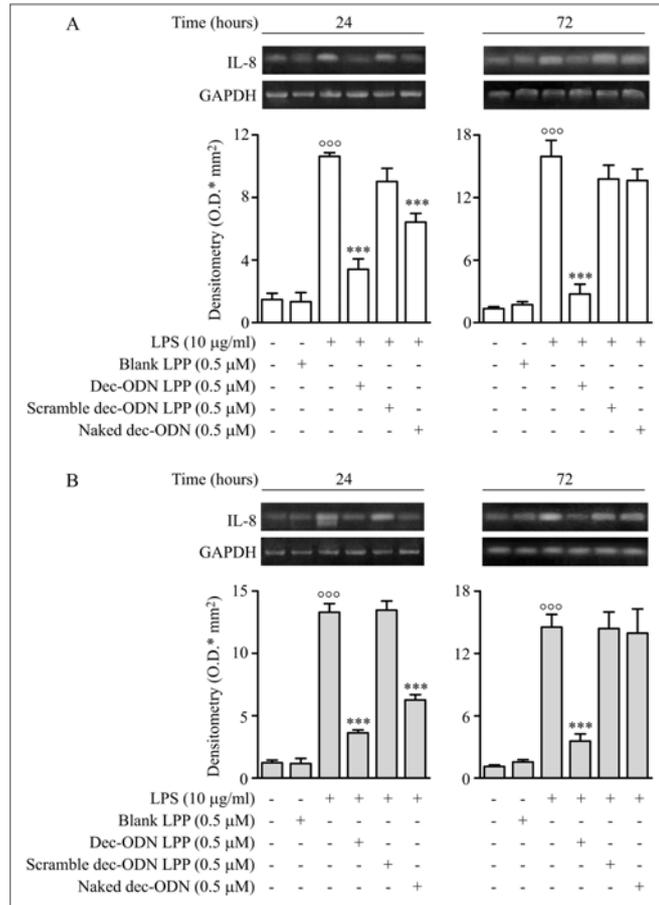


Figura 45. Reverse Transcription PCR mostra i livelli di mRNA di IL-8 in cellule IB3-1 (A) e S9 (B) stimulate con LPS (10 µg/ml) per 24 e 72 ore. I risultati in (A e B) provengono da un unico esperimento e sono rappresentativi di tre esperimenti separati. L'espressione del GAPDH è riportata come controllo. I dati densitometrici sono espressi come media ± S.E.M. di tre esperimenti separati. °°° p < 0.001 vs. cellule non stimulate, *** p < 0.001 vs. LPS da solo.

3.7 Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state sviluppate *Large Porous Particles* (LPP) a base di PLGA per il rilascio controllato al polmone di un dec-ODN diretto contro NF- κ B. I risultati sperimentali dimostrano che l'aggiunta alla formulazione iniziale di un sale effervescente e di un eccipiente di natura lipidica consente di ottenere sistemi microparticellari porosi in grado di incapsulare efficacemente e rilasciare in maniera controllata macromolecole idrofile, quali ODNs. Uno studio approfondito delle proprietà aerosolizzanti, in accordo ai saggi presenti nelle Farmacopee vigenti, ha suggerito che le LPP dovrebbero potenzialmente distribuirsi a livello di bronchi e bronchioli. Tali dati sono stati confermati da studi di biodistribuzione in polmoni di ratto che confermano le eccellenti proprietà aerosolizzanti delle LPP ed il loro potenziale nel veicolare per via polmonare il dec-ODN in pazienti FC. Sono stati studiati, poi, gli effetti del dec-ODN nudo e rilasciato dalle LPP sull'espressione dell'mRNA di IL-6 e IL-8 così come sull'attività di legame di NF- κ B al DNA in cellule umane bronchiali epiteliali normali e con la mutazione Δ F508 CFTR, stimulate con LPS da *P. Aeruginosa*. È stato osservato che la stimolazione con LPS causava un aumento sia dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e IL-8 che dell'attività di legame di NF- κ B al DNA e che entrambi gli effetti erano significativamente inibiti dal trattamento con il dec-ODN rilasciato da LPP a 24 e 72 ore. L'ODN decoy nudo, invece, mostrava tali effetti soltanto a 24 ore. Nel loro insieme, i risultati raggiunti suggeriscono un enorme potenziale delle LPP respirabili contenenti il dec-ODN per il controllo dell'infiammazione cronica indotta da FC.

4. Lista delle abbreviazioni

ODN=oligonucleotide; **ODN decoy**=oligonucleotide decoy; **dec-ODN**=oligonucleotide decoy diretto contro il fattore NF- κ B; **PLGA**=acido poli(lattico-co-glicolico); **CRS**=*Controlled Release System*; **MDI**=inalatori pressurizzati dosatori; **DPI**=inalatore di polvere secca; **MSLI**=*Multi stage liquid impinger*; **DPPC**=dipalmitoilfosfatidilcolina; **COPD**=ostruzione cronica polmonare; **LPP**=*Large Porous Particles*; **CS**=cloruro di sodio; **AB**=bicarbonato di ammonio; **MMAD**=diametro aerodinamico medio; **MMAD_t**=diametro aerodinamico medio teorico; **MMAD_{sp}**=diametro aerodinamico medio sperimentale; **FPF**=Frazione particellare fine; **ED**=dose emessa; **GSD**= deviazione standard geometrica; **CD**=dicroismo circolare; **SILF**=fluido polmonare simulato; **SSLF**=fluido polmonare surfattante simulato; **MS**=muco simulato; **STZ**=streptozocina; **FC**=fibrosi cistica; **CFTR**=regolatore della conduttanza transmembrana in fibrosi cistica; **LPS**=lipopolisaccaride; **DOTAP**=1,2-dioleoil-3-trimetilammonio-propano; **Rhod**=Rodamina B isotiocianato destrano; **RT-PCR**=*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*; **EMSA**=*Electrophoretic Mobility shift assay*. **CD**= ciclodestrina.

5. Bibliografia

Abra R.M., Mibalko P.J., Shreier H., *The effect of lipid composition upon the encapsulation and in vitro leakage of metaproterol sulfate Of 0.2 μm diameter, extruded, multilamellar liposomes.* Journal of Controlled Release. 14 (1990) 71-78.

Acharya A.P., Clare-Salzler M.J., Keselowsky B.G., *A high-throughput microparticle microarray platform for dendritic cell-targeting vaccines.* Biomaterials. 30(2009) 4168-77.

Adjei, L A., Carrigan P.J., *Pulmonary bioavailability of LH-RH analogs: some pharmaceutical guidelines.* Journal Biopharmaceutics Science. 3 (1992) 247–254.

Ahmed A.R., Bodmeier R., *Preparation of preformed porous PLGA microparticles and antisense oligonucleotides loading.* European Journal of Paemaceutics and Biopharmaceutics. 71 (2009) 264-270.

Ajwete A.L., Gupta P.K., Eds., *Delivery of Biotherapeutics by Inhalation Aerosol. Inhalation Delivery of Therapeutic Proteins and Peptides.* Marcel Dekker (1197)151-231.

Allen T.M., *Liposomal drug formulations: rationale for development and what we can expect for the future.* Drugs. 56 (1998) 747-756.

Anderson J.M., Shive M.S., *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres.* Advanced Drug Delivery Review. 28 (1997) 5–24.

Arnold M.M., Gorman E.M., Schieber L.J., Munson E.J., Berkland C., *Nanocipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles.* Journal of Controlled Release. 121 (2007) 100.

Bala I., Hariharan S., Ravi K. M.N.V., *PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art.* Critical Review Therapeutics Drug Carrier System. 21 (2004) 387–422.

Barnett A. H. *Exubera inhaled insulin: a review.* International Journal Clinical Pract. 58 (2004) 394-401.

Batycky R.P., Hanes J., Langer R., Edwards D.A., *A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres.* Journal Pharmaceutical Science. 86 (1997) 1464-1477.

Beatriz San Roma'n , Juan M. I. , Sara G., Tsapis N., Gamazo E., *Co-encapsulation of an antigen and CpG oligonucleotides into PLGA microparticles*

by *TROMS technology*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70 (2008) 98–108.

Bell J.H., Hartley P.S., Cox J.S., *Dry Powder Aerosol. I. A New powder inhalation device*. *Journal Pharmaceutical Science*. 60 (1971) 1559-1564.

Ben-Jebria A., Chen D., Eskew M.L., Vanbever R., Langer R., Edwards D.A., *Large porous particles for sustainedx protection from carbhacol-induced broncho-constiction in guinea pigs*. *Pharmaceutical Research* 16 (1999) 555-61.

Benoit J.P, Marchais H., Rolland H., Vande V. V. *Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology*. In S. Benita (Eds.), *Microencapsulation*. Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 36-62.

Bidani A.W. Ng, A., Heming T.A., *Innate host defense of the lung: effects of lung-lining fluid pH*. *Lung*. 182 (2004) 297-317.

Biondi M., Ungaro F., Quaglia F., Netti P.A. *Controlled drug delivery in tissue engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60 (2007) 229-42.

Bittner B., Ronneberger B., Zange R., Volland C., Anderson J.M., Kissel T., *Bovine serum albumin loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: the influence of polymer purity on particle characteristics*. *Journal of Microencapsulation*. 15 (1998) 495–514.

Blaiser M.M., Phipps A.M., Kellaway W.I., *Preparation and subsequent degradation of poly(L-lactic acid) microspheres suitable for aerosolization: a physic-chemical study*. *International Journal Pharmaceutics*. 151 (1997) 145-153.

Bosques C.J., Greibenow K., *Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-coglycolide) microspheres results in release of native protein*. *Journal of Controlled Release*. 76 (2001) 199–208.

Bosquillon C., Lombry C., Prêt V., Vanbever R., *Comparison of particle sizing techniques in the case of inhalation dry powders*. *Journal of Controlled Release*. 70 (2001) 329-339.

Bosquillon C., Preat V., Vanbever R., *Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats*. *Journal of Controlled Release*. 96 (2004) 233–244.

Bot A.I, Tarara T.E., Smith D.J., Bot S.R., Woods C.M., Wee J.G., *Novel lipid-based hollow-porous microparticles as a platform for immunoglobulin delivery to the respiratory tract*. *Pharmaceutical Research*. 17(2000) 275-283.

Boxerbaum B., *Pediatr Infect Dis*, 1 (1982) 381-387.

- Brain J.D., Valberg P.A., *Deposition of aerosol in the respiratory tract*. Am Rev. Respiratory Disease. 120 (1979) 1325-1373.
- Brain J.D., *Inhalation, deposition, and fate of insulin and other therapeutic proteins*. Diabetes Technology Therap. 9 (Suppl 1). (2007) S4–S15.
- Brange J., Ribel U., Hansen J., Dodson G., Hansen M., Havelund S., Melberg S., Norris F., Norris K., Snel L., Sorensen A., Voigt H. *Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications*. Nature 333 (1988) 679.
- Brange J., Langkjaer L., *Insulin structure and stability*. Pharmaceutical Biotechnology 5 (1993) 315-350.
- Brange J., Langkjaer L., *Insulin formulation and delivery*. Pharmaceutical Biotechnology. 10 (1997) 343-409.
- Brange J., Anderse L., Laursen E.D., Meyn G., Rasmussen E., *Toward understanding insulin fibrillation*. Journal Pharmaceutical Science. 86 (1997) 517–525.
- Brannon-Peppas L, Vert M. 2000. In: Wise DL, Handbook of Pharmaceutical *Controlled Release Technology*. MerceL Dekker Inc, 99.
- Brewster M.E., Loftson T., *Cyclodextrin as pharmaceutical solubilizer*. Advanced Drug Delivery Review. 59 (2007) 645-666.
- Brinda S., Cefalu W.T., *Exubera , inhale therapeutics systems*. Current Opinion Invest Drugs. 3 (2002) 758-762.
- Brown L., Munoz C., Siemer L., Edelman E., Kost J., Langer R. *Sustained insulin release from implantable polymers*. Diabetes 32 (1983) 35-47.
- Bukar J., Patton J.S., Eldon M.A., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled insulin*. Clinical Pharmacokinetics. 43 (2004) 781–801.
- Burch S. G., Erbland, M. L., Gann, L. P., Hiller, F. C., *Plasma nicotine levels after inhalation of aerosolized nicotine*. Am. Rev. Respiratory Disease 140 (1989) 955–957.
- Burke P.A. *Controlled release protein therapeutics: effect of process and formulation on stability*. In D.L. Wise (Eds.), Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology. Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 661-692.
- Burrows E., Southern K., Noone P., *Sodium channel blockers for cystic fibrosis*. Cochrane Database System Review. 3 (2006) CD005087.

- Canton R., Cobos N., De Gracia J., Baquero F., Honorato J., Gartner S., Alvaerz A., Salcedo A., Oliver A., Garcia-Quetglas E., *Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients*. Clinical Microbiology Infections. 11 (2005) 690.
- Carrasquillo K.G., Stanley A. M., Juan C. Carroa A., De Je'susa P., Costantino H.R., Carlos Bosques J., Griebenowa K., *Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein*. Journal of Controlled Release 76 (2001) 199-208.
- Cefalu W.T., Geland R.A., Kourides I.A., *Treatment of type 2 diabetes mellitus with inhaled human insulin: a 3-month, multicenter trial*. Diabetes 47 (1998) A61.
- Cefalu W.T., *Concept, strategies, and feasibility of noninvasive insulin delivery*. Diabetes Care. 27 (2004) 239–246
- Chawla A.T., Hinberg I., Johnson D. *Aggregation of insulin, containing surfactant, in contact with different materials*. Diabetes 34 (1985) 420-424.
- Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K., *Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes*. Journal Drug Target. 14 (2006) 557–566.
- Cleland JL, Duenas ET, Park A, Daugherty A, Kahn J, Kowalski J., *Development of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere formulations containing recombinant human vascular endothelial growth factor to promote controlled release basic fibroblast growth factor microspheres*. Journal Biomed. Mater. ResA 65 (2003) 489-497.
- Cohen S, Alonso M.J., Langer R., *Novel approaches to controlled release antigen delivery*. International Technology Assessment Health Care. 10(1994) 121-30.
- Collins F.S., Wilson J.M., *Cystic fibrosis. A welcome animal model*. Nature. 358 (1992) 708.
- Contreras L.G., Fiegel J., Telko M.J, Elbert K., Hawi A., Thomas M., VerBerkmoes J., Germishuizen W.A., Fourie P.B., Hickey A.J., Edwards D., *Inhaled Large Porous Particles of Capreomycin for Treatment of tuberculosis in guinea pig model*. Antimicrobiology Agent Chemother. 51 (2007) 2830-6.
- Cook R.O., Pannu R.K., Kellaway I.W., *Novel sustained release microsphere for pulmonary drug delivery*. Journal of Controlled Release. 104 (2005) 79-90.
- Cortesi R., Esposito F., Luca G., Nastruzzi C., *Production of Liphosferes as carriers for bioactive compounds*. Biomaterials. 23 (2002) 2283-2294.

Costantino H.R., Langer R., Klibanov A. *Aggregation of a lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: Effect of moisture and stabilization by excipients*. Bio/Technol. 13 (1995) 493-496.

Couvreur P., Prieto M.J., Puisieux F., Raques B., Fattal E., *Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides*. Advanced Drug Delivery. 28 (1997) 85-96.

Couvreur P., Puisieux F., *Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins*. Advanced Drug Delivery Reviews. 10 (1993)141-162.

Crotts G. Park T.G., *Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues*. Microencapsulation. 15 (1998) 699-713.

Cryan A. S., *Carrier-based strategies for targeting Protein and Peptide Drugs to the Lung*. AAPS Journal 7 (2005) E20-E41.

Csaba N., *PLGA:polaxamer and PLGA:polaxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery*. Biomacromolecules. 6 (2005) 271–278.

Cunningham M.J. Genomics and proteomics. *The new millennium of drug discovery and development*. Journal of Pharm. Toxicol. Met. 44 (2000) 291-300.

Cutting G.R., *Modifier genetics: cystic fibrosis*. Annual Reviews Genomics Human Genetic. 6 (2005) 237-60.

Dailey L.A., Jekel N., Fink L., Gessler T., Schmehl T., Wittmar M., Kissel T., Seeger W., *Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 251 (2006) 100-108.

Darrington, R.T., Anderson, B.D. *Evidence for a common intermediate in insulin deamidation and covalent dimer formation: effects of pH and aniline trapping in dilute acidic solutions*. Journal Pharmaceutical Science. 84 (1995) 275-282.

Davis S.S., Illum L. *Polymeric microspheres as drug carriers*. Biomaterials. 9 (1988) 111-115.

De Rosa G., Quaglia F., Bochot A. , Ungaro F., Fattal E. *Long term release and improved intracellular penetration of oligonucleotide-polyethylenimine complexes entrapped in biodegradable microspheres*. Biomacromolecules 4 (2003) 529–536.

De Rosa G, Maiuri MC, Ungaro F, De Stefano D, Quaglia F, La Rotonda MI Carnuccio R.J., *Enhanced intracellular uptake and inhibition of NF-kappaB activation by decoy oligonucleotide released from PLGA microspheres*. Gene Medicine. 7 (2005) 771-81.

De Rosa G., La Rotonda M.I., Quaglia F., Ungaro F. *Use of Additives in the Design of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microspheres for Drug Delivery*. Handbook of Particulate Drug Delivery, 2008.

De Stefano D., De Rosa G., Maiuria M.C., Ungaro F., Quaglia F., Iuvone T., Cinelli M.P., La Rotonda M.I., Carnuccio R., *Oligonucleotide decoy to NF- κ B slowly released from PLGA microspheres reduces chronic inflammation in rat*. Pharmacological Research. 60 (2009) 33–40.

Densmore CL., *Advances in noninvasive pulmonary gene therapy*. Current drug Delivery. 3 (2006) 55-63.

Dershwitz M., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled versus intravenous morphine in healthy volunteers. Anesthesiology 3 (2000) 619–628.

Dinwiddie R., *Anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis*. Journal Cystic Fibrosis. 4 Suppl 2 (2005) 45-8.

Dokka S., Toledo D., Shi X., Castranova V., Rojanasakul Y., *Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes*. Pharmaceutical Research. 17 (2000) 521-525.

Duchene D., Loftson T., *Cyclodextrin and their pharmaceutical application*. International Journal of Pharmaceutics. 329 (2007) 1-11.

Edwards D.A., Hanes J., Caponetti G., Hrkach A., Jebria B., Eskew M.L., Mintzes J., Deaver D., Lotan N., Langer R., *Large Porous particles for pulmonary drug delivery*. Science. 276 (1997) 1868-1871.

Edwards D., Abdelazizi B.J., Langer R., *Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles*. J.Appl. Physiol. 85 (1998) 379-385.

Ehrhadt C., Fiegel J., Fuchs S., *Drug absorption by the respiratory mucosa: cell culture models and particulate drug carriers*. J. Aerosol Med. 15 (2002) 131-139.

Ettinger M.J., Timasheff S.N., *Optical activity of insulin. I. On the nature of the circular dichroism bands*. Biochemistry. 10 (1971) 824–831.

Everard M.L., Devadason S.G., Summers Q.A., *Factors affecting Total and “Respirable” Dose Delivered by a Salbutamol Metered Dose Inhaler*. Thorax. (1995) 746-749.

Evora C., Soriano C., Rogers R.A., Shakesheff K.M., Hanes J., Langer R., *Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2 dipalmitoylphosphatidylcholine*. Journal of Controlled Release. 51 (1998) 143-152.

Feng S., Huang G *Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers*. Journal of Controlled Release. 71 (2001) 53-69.

Ferrari S., Geddes D.M., Alton E.W., *Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis*. Advanced Drug Delivery Reviews. 54 (2002) 1373-93.

Ferraris S., Zannini G., *Further study on the possibility of using carbocysteine in cystic fibrosis*. Minerva Pediatric. 35 (1983) 1145-1150.

Fiegel J., Ehrhardt C., Schaefer U.F., Lehr C.M., Hanes J., *Large Porous Particle Impingement on Lung Epithelial Cell Monolayers—Toward Improved Particle Characterization in the Lung*. Pharmaceutical Research. 20 (2003) 788-796.

Florence A.T., Attwood D. *Peptidi e Proteine*. In. *Le basi chimico-fisiche della tecnologia farmaceutica. Edizione italiana*. Edises, Napoli, 2002. pp 493-526.

Fraschini F., D'Orsi S., Falchi M., Fraticelli G., Scaglione F., *Current Therapy Research*. 40 (1986) 941-948.

Freitas S., Merkle H.P., Gander B., *Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology*. Journal Controlled Release. 102 (2005) 313–332.

Frijlink H.W., De Boer A.H., *Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery*. Expert Opinion Drug Delivery. 1 (2004) 67-86.

Giovagnoli S., Blasi P., Schoubben A., Rossi C., Ricci M., *Preparation of large porous particles biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery*. International Journal Pharmaceutics. 333 (2007) 103-111.

Giovannini M., Fiocchi A., *Mucologia Bronchiale e Relative Patologie*, Luigi Allegra Pier Carlo Braga (1990), Dompè Farmaceutici.

Giunchedi P., Conti B., Genta I., Conte U., Puglisi G., *Emulsion spraydrying for the preparation of albumin-loaded PLGA microspheres*. Drug Dev. Ind. Pharm. 27 (2001) 745–750.

Giteau A, Venier-Julienne M.C., Aubert-Pouëssel A., Benoit J.P., *How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?* International Journal of Pharmaceutics. 350 (2008) 14-26.

- Gonda, I. *Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract*. Critical Reviews Ther. Drug Carrier Syst. 6 (1990) 273–313.
- Greene C.M., Carroll T.P., Smith S.G., Taggart C.C., Devaney J., Griffin S., O’neill S.J., McElvaney N.G., *TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells*. Journal Immunology. 174 (2005) 1638-46.
- Grenha A., Remudan-Lopez C., Carvalho E.L.S., Seijo B., *Microsphere containing lipidic/chitosan nanoparticles complexes for pulmonary delivery of therapeutic proteins*. European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 69 (2008) 83-93.
- Griesenbach U., Ferrari S., Geddes D.M., Alton E.W., *Gene Therapy progress and prospects*. Gene Therapy. 9 (2002) 1344-1350.
- Hamishehkar H, Emami J, Najafabadi A.R., Gilani K., Minaiyan M., Mahdavi H., Nokhodchi A., *The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method*. Colloids Surf B Biointerfaces. 74 (2009) 340-9.
- Heller S., Kozlovski P, Kurtzhals P., *Insulin’s 85th anniversary—An enduring medical miracle*. Diabetes Research and Clinical Practice. 78 (2007) 149–158.
- Hogg J.C., *Response of the lung to inhaled particles*. Med. J. Aust. 142 (1985) 675-678.
- Hunter A.C., Moghimi S.M., *Therapeutic synthetic polymers: a game of Russian roulette?*. Drug Discovery Today. 7 (2002) 998-1001.
- Islam N., Gladkib E., *Dry powder inhalers (DPIs)—A review of device reliability and innovation*. International Journal of Pharmaceutics. 360 (2008) 1-11.
- Jain L., Chen X.J., Malik B., Al-Khalili O., Eaton D.C. *Antisense oligonucleotides against the alpha-subunit of ENaC decrease lung epithelial cation-channel activity*. Am J.Physiol. 276 (1999) L1046.
- Jain R.A, *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. Biomaterials 21 (2000) 2475-90.
- Jalil R, Nixon JR. *Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties*. Journal of Microencapsulation. 7 (1990) 297-325.
- Javot L., Lecompte T., Rabiskova M., Maincent P., *Encapsulation of low molecular weight heparins: influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio*. Journal of Controlled Release. 139 (2009) 8-14.

- Jhon W., Christman, Ruxana T., Sadikot T., S.Blackwell, Chest, 117 (2000) 1482-1487.
- Jiang H.L., Jin J.F., Hu Y.Q., Zhu K.J., *Improvement of protein loading and modulation of protein release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres by complexation of proteins with polyanions*. Journal of Microencapsulation. 21 (2004) 615–624.
- Jiang W, Gupta R.K., Deshpande M.C., Schwendeman S.P., *Biodegradable poly(lactico-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens*. Advanced Drug Delivery Reviews. 57 (2005) 391-410.
- Jones B.G., Dickinson P.A., Gumbleton M., *The inhibition of phagocytosis of respirable microspheres by alveolar and peritoneal macrophages*. International Journal of Pharmaceutics. 236 (2002) 65-79.
- Joseph D., Brain Sc. D., *Inhalation, Deposition, and Fate of Insulin and Other Therapeutic Proteins*., Diabetes Technology & Therapeutics. 9 (2007) S4-S15.
- Kang S., Brange J., Burch A., Volund A., Owens D.R., *Subcutaneous insulin absorption explained by insulin's physicochemical properties. Evidence from absorption studies of soluble human insulin and insulin analogues in humans*. Diabetes Care. 14 (1991) 942-948.
- Kang F., Singh J., *Effect of additives on the release of model protein from PLGA microspheres*. AAPS PharmSci.Tech. 2 (2001) 1–7.
- Kesser C.K., David E.G., Geller M.D., *New Aerosol Delivery Device for Cystic Fibrosis*. Respiratory Care. 54 (2009) 755-768.
- Kim K.H., Chung H.J., Park T.G., *Biodegradable polymeric microspheres with "open/closed" pores for sustained release of human growth hormone*. Journal of Controlled Release. 112 (2006) 167-174.
- Kim T.K., Yoon J.J., Lee D.S., Park T.G., *Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres*. Biomaterials. 27 (2006) 152-159.
- Kissel T., Pistel F., *Effect of salts addition on the microencapsulation of protein using W/O/W double emulsion technique*. Journal of Microencapsulation. 17 (2000) 467-483.
- Kitchell J.P., Wise D.L., *Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymermatrix systems*. Methods Enzymol. 112 (1985) 436-48.
- Know M.J, Bae J.H., Kim J.J., Na K., Lee E.S. *Long acting porous microparticles for pulmonary protein delivery*. International Journal of Pharmaceutics. 333 (2007) 5-9.

- Koushik K., Dhanda D.S., Cherevu P.S.N., Kompella U.B., *Pulmonary Delivery of Deslorelin: Large Porous PLGA Particles and HP β CD Complex*. *Pharmaceutical Research*. 21 (2004) 1119-1125.
- Kube D., Sontich U., Fletc F., Davis P.B., *Proinflammatory cytokine responses to P. aeruginosa infection in human airway epithelial cell lines*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 280 (2001) L493.
- Kumar T.R., Soppimath K., Nachaegari S.K., *Novel delivery technologies for protein and peptide therapeutics*. *Current Pharm. Biotechnology*. 7 (2006) 261–276.
- Kwon Y.M., Baudys M., Knutson K., Kim S.W., *In situ study of insulin aggregation induced by water-organic solvent interface*. *Pharmaceutical Research*. 18 (2001) 1754-1759.
- Lai L.Y., Metha G.P., Thacker A., Yoo S.D., Mamara P.J., De Luca P.P., *Sustained bronchodilation with isoproterenol poly(glycolide-co-lactide) microspheres*. *Pharmaceutical Research*. 10 (1993) 145-153.
- Laube B.L., *Treating diabetes with aerosolized insulin*. *Chest* 120 (2001) 99S–106S
- Leahy J. Cefalu W.T. *Insulin Therapy*. Marcel Dekker, New York, (2002).
- Leayrod T.P., Burrows J.L., French F., Seville P.C., *Modified release of beclometasone dipropionate from chitosan-based spray-dried respirable powder*. *Powder Technology*. 187 (2008) 231-238.
- Lee H.J. *Biopharmaceutical properties and pharmacokinetics of peptide and protein drugs*. In M. Taylor and G. Amidon (Eds.), *Peptide-based drug design*. American Chemical Society, Washington D.C. (1995) 69-97.
- Lee E.S., Kwon M.J., Bae J.H. *Protein release behavior from porous microparticles with lysozyme/hyaluronate ionic complex*. *Colloids Surf B. Biointerfaces*. (55) 2007 125-130.
- Lemaire V., Belair J., Hildgen P., *Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process*. *International Journal of Pharmaceutics*. 258 (2003) 95–107.
- Lewis K.J., Irwin W.J., Akhtar S., *Development of a sustained-release biodegradable polymer delivery system for site-specific delivery of oligonucleotides: characterization of P(LA-GA) copolymer microspheres in vitro*. *Journal of Controlled Release*. 37 (1995) 173.
- Li J.D., Feng W., Gallup M., *Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for Pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95 (1998) 5718.

Liu, W.R., Langer R., Klibanov A.M., *Moisture-induced aggregation of lyophilized protein in the solid state*. Biotechnol. Bioeng. 37 (1991) 177-184.

Liu L.S., Won Y.J., Cooke,P.H., Coffin D.R., Fishman M.L., Hicks K.B., Ma P.X., *Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications*. Biomaterials. 25 (2004) 3201–3210.

Lougheed W.D., Albisser A.M., Martindale H.M., Chow J.C., Clement, J.R. *Physical stability of insulin formulations*. Diabetes. 32 (1983) 424-432.

Lu D., Garcia-Contreras L., Xu D., Kurtz S.L., Liu J., Braunstein M., McMurray D.N., Hickey A.J., .Pharmaceutical Research. 10 (2007) 1834-43.

Mackey J.E., Anbar R.D., *High-dose ibuprofen therapy associated with esophageal ulceration after pneumonectomy in a patient with cystic fibrosis: a case report*. BMC, Pediatr. 4 (2004) 19.

Malik D.K., Baboota S., Ahuja A., Hasan S., Ali J., *Recent advances in protein andpeptide drug delivery systems*. Current Drug Delivery. 4 (2007) 141–151.

Manning M.C., Patel K., Borchardt R.T., *Stability of protein pharmaceuticals*. Pharmaceutical Research. 6 (1989) 903-18.

Martínez-Sancho R., Herrero-Vanrell S., *Optimisation of aciclovir poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study*. International Journal of Pharmaceutics. 273 (2004) 45–56.

Meakin B.J., Woodcock P.M., Segu A., Niccolai, F., Vecchio C., *Evaluation of the resistance to airflow through Turbospin in comparison with dry powder inhalers available on the market*. Boll. Chim. Farmaceutico-Anno135 125 (1996) 107-109.

Meyer J.D., Ho B., Manning M.C., *Effects of conformation on the chemical stability of pharmaceutically relevant polypeptides*. Pharmaceutical Biotechnology. 13 (2002) 85-107.

Miyazaki M., Mukai H., Iwanaga K., Morimoto K., Kakemi M., *Pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling of human insulin: validity of pharmacological availability as a substitute for extent of bioavailability*. Journal of Pharm. Pharmacol. 53 (2001)1235–1246.

Molimard M., Raheison C., Lignot S., Depont F., Abouelfath A., Moore N., *Assessment of handling of inhaler devices in real life: an observational study in 3811 patients in primary care*. Journal of Aerosol Medicine. 16 (2003) 249-254.

- Morishita M., Goto T., Nakamura K., Lowman A.M., Takayama K., Peppas N.A., *Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats*. Journal of Controlled Release. 110 (2006) 587–594.
- Moss O.R., *Simulants of Lung Interstitial Fluid*. Health Physiology. 36 (1979) 447-448.
- Mundargi R.C., Babu V.R., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi M.T., *Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives*. Journal of Controlled Release. 125 (2008) 193-209.
- Newhouse Michael T. P., Hirst H., Sarma P. Duddu, Yulia H. Walter, Thomas E. Tarara, Andrew R. Clark and Jeffrey G. Weers, *Inhalation of a Dry Powder Tobramycin PulmoSphere Formulation in Healthy Volunteers*. Chest. 124 (2003) 360-366.
- Newman, S. P. Agnew, J. E., Pavia, D., Clarke, S.W. *Inhaled aerosols: lung deposition and clinical applications*. Clin. Phys. Physiol. Meas. 3 (1982) 1–20.
- Newman S.P., Hollingworth A., Clark A.R., *Effect of different modes of inhalation on drug delivery from a dry powder inhaler*. International Journal of Pharmaceutics. 102 (1994) 127–132.
- Newman S.P., Busse W.W., *Evolution of dry powder inhaler design, formulation, and performance*. Respiratory Medicine. 96 (2002) 293.
- Nielsen L., Frokjaer S., Brange J., Uversky V.N., Fink A.L., *Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants*. Biochemistry. 40 (2001) 8397-8409.
- O’Riordan T.G., Palmer R.B, Smaldone G.C., *Aerosol Deposition in Mechanically Ventilated Patients: Optimizing Nebulizer Delivery*. Amer. J. Resp. Crit. Care Med. 149 (1994) 214-219.
- Oliva A., Farina J., Llabres M., *Analysis of Peptides and Proteins: Evaluation of Purity, Stability, and Structural Characterization of Insulin*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 23 (1997) 915-927.
- Oliva A., Fariña J.B., Labrés M., *Development of two high-performance liquid chromatographic methods for the analysis and characterization of insulin and its degradation products in pharmaceutical preparations*. J. Chrom. B. 749 (2000) 25-34.
- Otulana T., Thippawong J., *Systemic delivery of small molecules: product development issues focused on pain therapeutics*. Respir. Drug Deliv. VIII1 (2002) 97–104.

- Owens D.R., *New horizons — alternative routes for insulin therapy*. Nature Reviews Drug Discovery. 1 (2002) 529–540.
- Patton J. S., *Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs*. Advanced Drug Delivery Reviews. 19 (1996) 3–36.
- Patton J.S., Bukar J., Nagarajan S., *Inhaled insulin*. Advanced Drug Delivery Reviews. 35 (1999) 235–247.
- Patton J.S., Fishburn C.S., Weers J.G. *The lung as a port of entry for systemic drug delivery*. Proc. Am. Thorac. Soc.1 (2004) 338–344.
- Patton J. S., Byron R. P., *Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs*. Nature. 6 (2007) 67-74.
- Paul J., *Dry Powder Inhalers: An Overview*. Respiratory Care. 50 (2005) 1304-1312.
- Perez C., Griebenow K., *Effect of salts on lysozyme stability at the water–oil interface and upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres*. Biotechnology Bioengineering. 82 (2003) 825–832.
- Perets A., Baruch Y., Weisbuch F., Shoshany G., Neufeld G., Cohen S., *Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating*. Wiley Periodicals Inc.(2003) 490-496.
- Pistel K. F., Kissel T., *Effects of addition salts on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique*. Journal of Microencapsulation. 17 (2000) 467-483.
- Pocker Y., Biswas S.B., *Conformational dynamics of insulin in solution. Circular dichroic studies*. Biochemistry. 19 (1980) 5043-5049.
- Prescott W.A., Johnson C.E., *Antiinflammatory therapies for cystic fibrosis: past, present, and future*. Pharmacotherapy. 25 (2005) 555.
- Quaglia F., De Rosa G., Granata E., Ungaro F., Fattal E., La Rotonda M., *Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying*. Journal of Controlled Release. 86 (2003) 267-278.
- Rajeev A. J., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. Biomaterials. 21 (2000) 2475-2490.
- Ravi Kumar M.N.V., *Nano and microparticles as controlled drug delivery devices*. Journal of Pharmaceutics and Pharmaceut. Sci. 3 (2000) 234-258.

Rawat A., Majumder Q. H., Ahsan F., *Inhalable large porous microspheres of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation*. Journal of Controlled Release. 128 (2008) 224-232.

Richardson T.P., Peters M.C., Ennett A.B., Mooney D.J. *Polymeric system for dual growth factor delivery*. Nature Biotechnology. 19 (2001) 1029-1034.

Robbins e Cotran, *Le Basi Patologiche delle malattie*, vol.1., Patologia generale (Ed. VI) Kumar-Abbas-Fausto.

Rowe S.M., Sorscher E.J., Miller S., *Cystic Fibrosis*. Journal of Medicine. 352 (2005) 1992-2001.

Rudt S., Wesemeyer H., Muller R. H., *In vitro phagocytosis assay of nano-and microparticles by chemiluminiscence.IV. Effect of surface modification by coating of particles with poloxamine and Antarox CO on the phagocytic uptake*. Journal of Controlled Release. 25 (1993) 123-138.

Rupp W.M., Barbosa J.J., Blackshear P.J., McCarthy H.B., Rohde T.D., Goldenberg F.J., Rublein T.G., Dorman F.D., Buchwald H. *The use of an implantable insulin pump in the treatment of type II diabetes*. N. Engl. J. Med. 307 (1982) 265-270.

Saadane A., Soltys J., Berger M., *Acute Pseudomonas challenge in cystic fibrosis mice causes prolonged nuclear factor-kappa B activation, cytokine secretion, and persistent lung inflammation*. J Allergy Clin Immuno. 117 (2006) 1163.

Salama R., Hoe S., Chan H.K., Traini D., Young P.M., *A theoretical model of erosion and characterization of controlled release co-spray dried drug-polymer microparticles for inhalation: influence of polymer concentration on physical and in vitro characteristics*. European Journal of Pharm. Biopharm. 69 (2008) 486-495.

Salama R., Traini D., Chan H. K., Young P. M., *Recent Advanced in Controlled Release Pulmonary Therapy*. Current Drug Delivery. 6 (2009) 404-414.

Sazani P., Kole R., *Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing*. Journal Clinical Invest. 112 (2003) 481-6.

Schade D.S., Eaton R.P., Edwards W.S., Doberneck R.C., Spencer W.J., Carlson G.A., Bair R.E., Love J.T., Urenda R.S., Gaona J.I., *A remotely programmable insulin delivery system*. J. Amer. Med. Assoc. 247 (1982) 1848-1853.

Schungens C., Laruelle N., Grandfils C., Jerome R., Teyesse P., *Effect of emulsion stability on the morphology and porosity of semycrystalline poly L-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation*. Journal of Controlled Release. 31 (1994) 161-176.

Schwendeman S.P., Cardamone M., Kibanov A., Langer R., *Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microspheres*. In S. Cohen and H. Bernstein (Eds.), *Microparticulate Systems for the delivery of proteins and vaccines*. Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 1-49.

Shah S., Fung K., Brim S., Rubin, B.K., *An in vitro evaluation of the effectiveness of endotracheal suction catheters*. *Chest*. 128 (2005) 3699–3704.

Shao P.G., Bailey L.C., *Stabilization of pH-induced degradation of porcine insulin in biodegradable polyester microspheres*. *Pharmaceutical Dev. Technol.* 4 (1999) 633-642.

Shao P.G., Bailey L.C. *Porcine insulin biodegradable polyester microspheres: stability and in vitro release characteristics*. *Pharmaceutical Development Technology*. 5(1) (2000) 1-9.

Sharif S., Wheeler A.W., O'Hagan D.T., *Biodegradable microparticles as a delivery system for the allergens of Dermatophagoides pteronyssinus (house dust mite): I. Preparation and characterization of microparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*. 119 (1995) 239-46.

Sharma H.W., Perez J.R., Higgins-Sochaski K., Hsiao R., Narayanan R., *Transcription factor decoy approach to decipher the role of NF-kappa B in oncogenesis*. *Anticancer Research*. 16 (1996) 61.

Sharma R., Saxena D., Dwivedi A.K., *Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis*. *Pharmaceutical Research*. 18 (2001) 1405-10.

Smith J., Wood E., Dornish M., *Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions*. *Pharmaceutical Research*. 21 (2004) 43-49.

Stark B., Andrae F., Mosgoeller W., Edelsberger M., Gaubitzer F., Koehler G., Prass R., *Liposomal vasoactive intestinal peptide for lung application: Protection from proteolytic degradation*. *European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 70 (2008) 153-164.

Stern M., Ulrich K., Geddes D.M., *Poly (D, L-lactide-co-glycolide)/DNA microspheres to facilitate prolonged transgene expression in airway epithelium in vitro, ex vivo and in vivo*. *Gene Therapy*. 10 (2003) 1282-1288.

Steckel H., Brandes H.G., *A novel spray-drying technique to produce low density particle for pulmonary delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*. 278 (2004) 187-195.

Stivaktakis N, Nikou K, Panagi Z, Beletsi A, Leondiadis L, Avgoustakis K., *PLA and PLGA microspheres of β -galactosidase: Effect of formulation factors on protein antigenicity and immunogenicity*. Wiley InterScience (2004).

Suarez S., O' Hara P., Kazantseva M., Newcomer C.E., Hopfer R., McMurray D.N., Hickey A. J., *Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: screening in an infectious disease model*. Pharmaceutical Research. 18 (2001) 1315-19.

Sumby B., Slater A., Atkins P.J., Prime D., *Review of dry powder inhalers*. Adv Drug Delivery Reviews. 26 (1997) 51-58.

Tabata Y., Ikada Y., *Effect of size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage*. J. Biomed. Mater. Res. 22 (1988) 837-842.

Talon J., Fitz-Gerald J., Singh R., *Nano-microparticles for improved lung targeting of glucocorticoides in vitro and in vivo characteristics*. Respiratory Drug Delivery. (2000) 67-74.

Tauzin B., Report: *Biotechnology Medicines in Development*, Pharmaceutical Research and Manufacturers Association. Washington DC. (2006).

Tomoda K., Kojima S., Kajimoto M., Watanabe D., Nakajima T., Kimiko M., *Effects of pulmonary surfactant system on rifampicin release from rifampicin-loaded PLGA microspheres*. Colloids and Surfaces B. 45 (2005) 1–6.

Uchida T., Nagareya N., Sakakibara S., Konishi Y., Nakai A., Nishikata M., Matsuyama K., Yoshida K., *Preparation and characterization of polylactic acid microspheres containing bovine insulin by a w/o/w emulsion solvent evaporation method*. Chem. Pharm. Bull. 45 (1997) 1539-1543.

Ungaro F., Biondi M., Indolfi L., De Rosa G., La Rotonda M.I., Quaglia F., Netti P. *Bioactivated polymer scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials- Topics in Tissue Engineering. 2005, Vol 2. Eds. N. Ashammakhi & R.L. Reis © 2005.

Ungaro F., De Rosa G., Miro A, Quaglia F., La Rotonda M. I., *Cyclodextrins in the production of large porous particles: Development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs*. European J. Pharmaceutical Science 28 (2006) 423-432.

Ungaro F., d'Emmanuele R. , Giovino C., Miro A., Sorrentino R., Quaglia F., La Rotonda MI., *Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improve aerosolization properties: In vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs*. Journal of Controlled Release. 135 (2009) 25-34.

Vanbever R., Mintzes J.D., Wang J., Nice J., Chen D., Batycky R., Langer R., Edwards, D.A. *Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation*. Pharmaceutical Research. 16 (1999) 1735–1742.

Van Campen L., Venthoye G., *Inhalation, dry powder* Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker Inc., (2002) 1529-1544.

- Van de Weert M., Hennink W.E., Jiskoot W. *Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles*. Pharm. Res. 17 (2000) 1159-1167.
- Vanbever R., Mintzes J. D., Wang J., Nice J., Chen D., Batycky R., *Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation*. Pharmaceutical Research. 16 (1999) 1735-1742.
- Wada R., Hyon S.H., Ikada Y. *Lactic Acid Oligomer Microspheres Containing Hydrophilic Drugs*. Journal Pharmaceutical Science. 79 (10) (1989) 919-924.
- Waeckerle-Men Y, Groettrup M., *PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines*. Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 475– 482.
- Walter R., Moelling K., Pavlovic J., Merkie HP., Journal of Controlled Release. 61 (1999) 361.
- Walter E., Dreher D., Kok M., Thiele L., Kiama S.G., Gehr P., Merkle H.P., *Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells*. Journal of Controlled Release. 76 (2001) 149-168.
- Wang D., Robinson D.R., Kwon G.S., Samuel J., *Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery*. Journal of Controlled Release. 57 (1999) 9–18.
- Wang J., Jebria B.A., Edwards D.A., *Controlled release inhalation aerosol*. In. Respiratory Drug delivery. (1997) 187-192.
- Wang W. *Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals*. International Journal of Pharmaceutics. 185 (1999) 129-188.
- Wang W. *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals*. International Journal of Pharmaceutics. 203 (2000) 1-60.
- Wang Z., *In vivo evaluation of a novel electrically conductive polypyrrole/poly(D,L-lactide) composite and polypyrrole-coated poly(D,L-lactide-coglycolide) membranes*. J. Biomed. Mater. Res. A 70A (2004) 28–38.
- Washington C. *Drug release from microparticulate systems*. Microencapsulation. Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 155-182.
- Wenk E, Meinel A.J., Wildy S., Merkle H.P., Meinel L., *Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering*. Biomaterials. 30 (2009) 2571-2581.
- Weibel E. R., *Morphometry of the Human Lung*. Academic, 1963.

Woodford N., Ellington. M.J., *The emergence of antibiotic resistance by mutation*. Clinical Microbiology Infection. 13 (2007) 5-18.

Wu XS. *Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers*. In: Wise et al., editors. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. New York: Marcel Dekker. 1995. p. 1015-54.

Yamada K., Kamada N., Odomi M., Okada N., Nabe T., Fjiita T., Kohno S., Yamamoto A., *Carragenanas can regulate the pulmonary absorption of antiasthmatic drugs and their retention in the rat lung tissues without any membrane damage*. International Journal of Pharmaceutics. 293 (2005) 63-72.

Yamamoto A., Umemori S., Muranishi S., *Absorption enhancement of intrapulmonary administered insulin by various absorption enhancers and protease inhibitors in rats*. Journal Pharm. Pharmacol. 46 (1994) 14–18.

Yamamoto A., Fujita T., Muranishi S., *Pulmonary absorption enhancement of peptides by absorption enhancers and protease inhibitors*. Journal of Controlled Release. 41 (1996) 57–67.

Yang Y., Bajai N., Xu P., Ohn K., Tsifansky D., Yeo Y., *Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery*. Biomaterials. 30 (2009) 1-7.

Zannou E.A., Streng W.H., Stella V.J, *Osmotic properties of sulfobutylether and hydroxypropyl cyclodextrins*. Pharmaceutical Research. 18 (2001) 1226.

Ziady A.G., Davis P.B., *Current prospects for gene therapy of cystic fibrosis*. Curr Opin Pharmacol. 6 (2006) 515-21.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Fondazione Italiana per la Fibrosi Cistica (FFC#5/2007) con il Contributo della “Delegazione FFC di Torino” per il supporto finanziario.