



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*

UNIVERSITÀ DEGLI
STUDI DI SALERNO



FONDO SOCIALE EUROPEO

Programma Operativo Nazionale 2007/2013

“Ricerca Scientifica, Sviluppo Tecnologico, Alta Formazione”

Regioni dell'Obiettivo 1 – Misura III.4

“Formazione superiore ed universitaria”

Nanostructured vectors for the transport of active molecules through biological membranes for pharmaceutical and nutraceutical applications

Sabrina Bochicchio

Abstract PhD

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di sviluppare vettori nanostrutturati aventi le caratteristiche desiderate (in termini di dimensione, carica superficiale, carico, abilità di rispondere agli stimoli e stabilità) attraverso la progettazione di nuovi processi di produzione messi a punto per l'incapsulamento di agenti nutraceutici e terapeutici.

Una revisione preliminare dei processi utilizzati per la produzione di liposomi, presenti in letteratura, ha messo in evidenza che la maggior parte dei metodi, convenzionali e innovativi adottati, presenta numerosi inconvenienti come piccoli volumi di prodotto in output (direttamente legati all'impossibilità di scalare il processo), consumi energetici elevati, lunghi tempi di produzione insieme con l'uso di solventi tossici e altre condizioni drastiche.

Alla luce dei risultati riscontrabili in letteratura e allo scopo di produrre vettori nanostrutturati attraverso processi sostenibili, sono state progettate e sviluppate due nuove tecniche. Queste, accomunate dalla tecnologia degli ultrasuoni come strumento di intensificazione di processo, sono state utilizzate nelle operazioni di riduzione delle dimensioni e nelle operazioni di omogeneizzazione delle particelle, al fine di ottenere una migliore performance del processo, migliorando l'efficienza e riducendo il consumo energetico.

Dapprima, utilizzando gli ultrasuoni come risorsa energetica alternativa, è stato sviluppato un processo che permette la riduzione della dimensione delle particelle, questo è stato successivamente accoppiato con il metodo convenzionale Thin Film Hydration (TFH). Tale tecnica porta alla formazione di un film lipidico generato, successivamente all'evaporazione del solvente, attraverso l'utilizzo di un evaporatore rotante. Il film essiccato viene quindi idratato, portando alla spontanea formazione di vescicole micrometriche caratterizzate dalla presenza di diversi bilayer. Quindi il metodo è stato rivisitato aggiungendo il processo assistito da ultrasuoni sviluppato al fine di produrre, in modo versatile, strutture aventi la dimensione desiderata (su scala micro/nano) a partire da quelle micrometriche.

Le sezioni principali che compongono il set-up necessario per l'utilizzo di questo protocollo innovativo sono quattro: una sezione di alimentazione, una sezione di evaporazione del solvente, una sezione di produzione/omogeneizzazione dei liposomi e una sezione di recupero. In particolare, la sezione di omogeneizzazione è composta da una punta di sonicazione di 3 mm di diametro (frequenza operativa 20 kHz) che agisce su aliquote di campione contenenti le vescicole micrometriche.

Successivamente alla realizzazione dell'apparato di produzione su scala di laboratorio, è stata studiata la fenomenologia alla base della formazione dei vettori ed è stato quindi proposto e testato un modello matematico, dinamico, in grado di descrivere la curvatura di un bilayer lipidico sotto l'effetto di energia ultrasonica.

A tal proposito, partendo da vescicole micrometriche, l'energia ultrasonica viene utilizzata per rompere il bilayer lipidico in piccoli frammenti che si richiudono in strutture sferiche a formare vescicole più piccole. Infine, è stato studiato il ruolo dei diversi parametri di processo che caratterizzano la tecnica messa a punto.

Una volta stabilita la sua affidabilità e grazie al suo grande potenziale nel ridurre il tempo di produzione, senza compromettere l'integrità dei sistemi liposomiali prodotti (in termini di struttura e carico), lo strumento di intensificazione, basato sull'utilizzo degli ultrasuoni, è stato utilizzato anche per l'operazione di omogeneizzazione dei liposomi durante la produzione di vescicole attraverso un approccio microfluidico. Infatti, per produrre volumi più elevati di vettori lipidici, potenzialmente su scala di produzione, direttamente con dimensioni nanometriche, è stato progettato e fabbricato un apparato simil-microfluidico, superando così le limitazioni dei piccoli volumi di produzione tipici delle tecniche convenzionali utilizzate su scala di laboratorio.

Le sezioni principali che compongono l'apparato realizzato sono cinque: una sezione di alimentazione, una sezione di pompaggio, una sezione di produzione, una sezione di omogeneizzazione e una sezione di recupero. In particolare, la sezione di omogeneizzazione è composta da una punta di sonicazione da 6 mm (frequenza operativa 20 kHz) direttamente immersa nella soluzione idroalcolica contenente i nanoliposomi. Come in precedenza, anche per questo nuovo set-up adottato, sono stati studiati gli aspetti fenomenologici coinvolti nella formazione dei vettori. In particolare, la riproduzione della fenomenologia legata alla formazione delle vescicole attraverso un approccio microfluidico è stata ottenuta mediante l'utilizzo di espedienti costruttivi (diametro millimetrico di tubi, pompe peristaltiche, ago di iniezione).

Nello specifico, la formazione dei vettori nanostrutturati avviene all'interfaccia tra la fase alcolica e quella acquosa, quando queste iniziano a diffondere in una direzione normale al flusso di liquido; variazioni delle condizioni di flusso determinano variazioni della dimensione della sezione di inserimento della fase organica che si riflette sulle caratteristiche dimensionali delle vescicole stesse.

A tale proposito, tenendo conto che dimensione e distribuzione dimensionale sono parametri chiave determinanti le prestazioni dei liposomi come sistemi di trasporto in entrambe le applicazioni, farmaceutiche e nutraceutiche, è stato dimostrato un controllo dei parametri di processo (flussi volumetrici e concentrazione dei lipidi) sulle caratteristiche dimensionali finali dei nanoliposomi prodotti.

In particolare, è stato osservato che aumentando il rapporto tra la portata volumetrica dell'acqua e quella della soluzione lipidi-etanolo, aumenta la distribuzione dimensionale dei liposomi; al contrario, l'energia ultrasonica fa aumentare l'omogeneizzazione del bulk idroalcolico e, come previsto sulla base di studi precedenti condotti su volumi più piccoli, l'applicazione del protocollo di sonicazione in duty cycle ha favorevolmente promosso una migliore distribuzione dimensionale delle vescicole.

Questo risultato è stato anche confermato lavorando a parità di portata ma a diverse concentrazioni lipidiche. Infine, l'apparato simil-microfluidico sviluppato, funzionante a condizioni ambiente e in assenza di solventi tossici, rende il processo di produzione dei nanoliposomi un processo sicuro e a basso costo, altamente produttivo grazie all'uso degli ultrasuoni, mezzo scalabile utilizzabile per l'intensificazione di processo.

Utilizzando i due set-up sperimentali sviluppati, al fine di rispondere a specifiche richieste applicative (nutraceutiche e farmaceutiche), sono state formulate e prodotte diverse classi di strutture liposomiali. Attraverso lo strumento degli ultrasuoni, utilizzato dapprima accoppiato al metodo tradizionale THF e, successivamente, come parte integrante della sezione di omogeneizzazione dell'apparato simil-microfluidico, diverse molecole attive sono state incapsulate con successo nei vettori nanostrutturati lipidici. In tal modo sono state risolte le criticità legate alla loro somministrazione in forma nuda e al loro trasporto attraverso le membrane biologiche.

In particolare, sono stati prodotti nanoliposomi contenenti vitamine con differenti caratteristiche di idrofobicità (α -tocoferolo, ergocalciferolo, vitamina B12) e solfato ferroso, con proprietà molto interessanti per il mercato nutraceutico, ottenendo nanoliposomi carichi, stabili, con elevate efficienze di incapsulamento e buone caratteristiche dimensionali.

Nello specifico, per le produzioni di vitamine-nanoliposomi, sono state prodotte vescicole neutre di dimensione micrometrica, da 2.9 μm a 5.7 μm , ottenendo, dopo la sonicazione in duty cycle, piccole vescicole dalla dimensione media compresa nell'intervallo 40 - 51 nm. È stata ottenuta un'elevata efficienza di incapsulamento (e.e.) in entrambe le vescicole, quelle micrometriche con un e.e. % di $72,0 \pm 00$ % per la vitamina B12, $95,0 \pm 7,07$ % per l' α -tocoferolo e $81,5 \pm 2,12$ % per l' ergocalciferolo. Per le vescicole più piccole è stata invece osservata una e.e. % del $56,2 \pm 8,51$ % per la vitamina B12, $76,3 \pm 14,02$ % per α -tocoferolo e $57,5 \pm 13,9$ % per l'ergocalciferolo (maggiore è l'idrofobicità della vitamina, maggiore è l'efficienza di incapsulamento).

Infine, un confronto tra il carico di vitamina B12 realizzabile con la tecnica sviluppata e il carico di vitamina ottenibile rompendo i liposomi preformati vuoti (approccio convenzionale) ha mostrato un aumento dell'efficienza di incapsulamento nelle piccole vescicole dal 40 % al 56,2 %, confermando l'efficacia della tecnica messa a punto.

Per quanto riguarda i nanoliposomi contenenti solfato ferroso, la loro produzione massiva è stata possibile grazie all'approccio simil-microfluidico con un preciso controllo sulle dimensioni e sulla distribuzione dimensionale delle particelle. In particolare, è stato studiato l'effetto di diversi rapporti in peso tra il ferro e i componenti complessivi della formulazione (0.06, 0.035, 0.02 e 0.01 peso/peso di ferro/componenti totali) sull'efficienza di incapsulamento delle vescicole ottenendo, con l'ultima formulazione testata, un'elevata efficienza di incapsulamento (fino al 97 %).

In generale, utilizzando il metodo simil-microfluidico sviluppato sono stati ottenuti nanoliposomi carichi negativamente, contenenti solfato ferroso, caratterizzati da una buona capacità dimensionale (127-135 nm per i liposomi non sonicati e 48-76 nm per quelli sonicati) ottenendo un'elevata resa di processo se confrontato con le classiche tecniche utilizzate su scala di laboratorio (THF e iniezione di etanolo).

Un'applicazione di tipo farmaceutico ha riguardato la produzione di nanoliposomi anionici contenenti un peptide di nuova sintesi (KRX29), potenziale agente terapeutico per la cura dell'infarto, e nuovi farmaci a base di acidi nucleici (NABDs), utilizzati nella terapia genica.

Per quanto riguarda la produzione di nanoliposomi contenenti KRX29, sono state ottenute particelle micrometriche di 7,2-11,7 μm , successivamente dimensionate con l'impiego del processo sviluppato basato sull'utilizzo degli ultrasuoni, realizzando così vescicole dalla dimensione di 22 - 35 nm.

È stato studiato l'effetto della carica superficiale dei liposomi sia sull'incapsulamento del peptide che sull'efficienza di recupero dell'agente terapeutico stesso; è stata raggiunta un'efficienza di incapsulamento superiore (circa 100% sia in piccole che in grandi vescicole) utilizzando la formulazione con il rapporto in carica più alta (13: 1 (-/+)). Viceversa, la migliore capacità di recuperare il peptide intrappolato è stata ottenuta per i sistemi carichi (sia in piccole che in grandi vescicole) utilizzando la formulazione dal rapporto in carica inferiore (1: 1 (-/+)). Come il rapporto in carica, anche la concentrazione del peptide ha mostrato un'influenza sull'efficienza di incapsulamento dei liposomi.

Riguardo la produzione di complessi NABDs-liposomi, dapprima sono stati condotti test preliminari utilizzando molecole di dsDNA simulanti, in struttura, le sequenze di siRNA, una classe di farmaci a base di acidi nucleici molto utilizzati nella terapia genica. Sono stati testati diversi rapporti in carica dsDNA / DOTAP (3: 1, 5: 1 e 7: 1 (+/-)), al fine di ottenere l'efficienza di incapsulamento del dsDNA più elevata nel vettore più piccolo possibile. Il fosfolipide DOTAP è stato utilizzato per la sua carica positiva. Le attività svolte hanno confermato la versatilità della tecnica assistita da ultrasuoni per la produzione di micro (2,2-2,9 μm) e nano vettori lipidici (28-56 nm) contenenti NABDs. In particolare, la variazione del rapporto in carica (+/-) da 3: 1 a 7: 1 (+/-) cambiando la quantità di lipidi positivi (DOTAP) utilizzati nella formulazione dei liposomi, ha permesso di ottenere un incremento della e.e. che è stata rispettivamente del 64% e del 100% per le piccole e grandi vescicole.

Partendo da questi test preliminari, sono stati prodotti complessi siRNAs-nanoliposomi per l'inibizione dell'espressione del fattore E2F1, una proteina che sembra essere over-espressa in presenza di cancro al colon. Tali complessi sono stati studiati come un potenziale trattamento del cancro al colon-retto associato alle malattie infiammatorie del tratto gastro-intestinale. Con la tecnica TFH/sonicazione sono stati ottenuti nanoliposomi con dimensioni comprese nel range 33-38 nm che presentano il 100 % di efficienza di incapsulamento dei siRNAs. I nanoliposomi carichi prodotti hanno mostrato una citotossicità molto bassa nelle cellule se confrontata con l'agente di transfezione commerciale Lipofectamine® 2000 e un ottimo uptake in tessuti di mucosa colica umana. Un notevole effetto sull'espressione di E2F1 dopo la trasfezione dei complessi siE2F1-1324-nanoliposoma è stata dimostrata anche in un modello umano, dinamico, come

quello che caratterizza il microambiente del tessuto del colon (ad esempio, nel paziente 4, è stata ottenuta una riduzione dell'espressione di E2F1 del 80,5 % rispetto al tessuto basale); è stata infine osservata una chiara tendenza di rispondere in modo paziente – dipendente.

Tutti i risultati conseguiti evidenziano la potenzialità dei nanoliposomi progettati nel trasportare e rilasciare in maniera controllata diverse molecole attive sia per scopi farmaceutici che nutraceutici. In generale, gli approcci formulativi e quelli propri dell'ingegneria chimica adottati in questa tesi per la produzione di vettori nanostrutturati aumentano rispettivamente la qualità del prodotto (nanoparticelle con caratteristiche personalizzate) e rendono il processo più attraente in termini di una maggiore sicurezza e riduzione dei costi.