



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
SSD CHIM/09

OCULAR DRUG CARRIERS
**NANOSTRUTTURATI PER IL TRATTAMENTO
DELLE PATOLOGIE DEGENERATIVE
DELLA RETINA**

IL DOTTORE
FLAVIA BONGIOVÌ

IL COORDINATORE
CH.MA PROF.SSA PATRIZIA DIANA

IL TUTOR
CH.MA PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI

CICLO XXX
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2018.

INDICE

1. Introduzione	pag. 4
1.1 Cenni di anatomia e fisiologia oculare	pag. 4
1.2 Le retinopatie: cenni di fisiopatologia e trattamenti terapeutici	pag. 13
1.2.1 Degenerazione maculare legata all'età	pag. 15
1.2.2 Retinopatia diabetica	pag. 16
1.2.3 Edema maculare	pag. 18
1.2.4 Retinite pigmentosa	pag. 18
1.2.5 Terapie farmacologiche per il trattamento delle retinopatie	pag. 19
1.3 Gli <i>Ocular Drug Delivery Systems</i> e le differenti vie di somministrazione	pag. 23
1.3.1 Le Micelle Polimeriche	pag. 32
1.3.2 Le Nanoparticelle Polimeriche	pag. 41
1.4 L'acido ialuronico	pag. 53
2. Scopo della tesi	pag. 56
3. Risultati e discussione	pag. 63
3.1 Micelle polimeriche a base di HA _{LMW}	pag. 63
3.2 Micelle polimeriche a base di HA _{MINI}	pag. 66
3.2.1 Micelle polimeriche HAC ₁₆	pag. 66
3.2.2 Micelle polimeriche HA-EDA-C ₁₆ , HA-EDA-C ₁₆ -PEG e HA-EDA-C ₁₆ -CRN	pag. 82
3.3 Nanoparticelle polimeriche a base di HA _{XS}	pag. 106

4. Conclusioni	pag. 119
5. Parte sperimentale	pag. 123
5.1 Materiali	pag. 123
5.2 Strumentazioni	pag. 124
5.3 Acido ialuronico LMW (240 kDa)	pag. 126
5.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei derivati HA _{LMW} C ₁₈ e HA _{LMW} C ₁₆	pag. 126
5.3.2 Preparazione e caratterizzazione delle micelle polimeriche HA _{LMW} C ₁₆ e HA _{LMW} C ₁₆ /DEX	pag. 127
5.3.3 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA _{LMW} -EDA-C ₁₈	pag. 128
5.4 L'acido ialuronico MINI (<10 kDa) e i derivati HAC ₁₆	pag. 129
5.4.1 Sintesi e caratterizzazione dei derivati HAC ₁₆	pag. 129
5.4.2 Preparazione e caratterizzazione delle micelle HAC ₁₆	pag. 129
5.4.3 Studio di rilascio <i>in vitro</i> dei corticosteroidi dalle micelle	pag. 130
5.4.4 Studio di trasmittanza delle micelle HAC ₁₆	pag. 131
5.4.5 Studio di citocompatibilità <i>in vitro</i>	pag. 131
5.4.6 Studi di permeazione trans-corneale	pag. 132
5.4.6.1 Permeazione trans-corneale <i>in vitro</i>	pag. 132
5.4.6.2 Permeazione trans-corneale <i>ex vivo</i>	pag. 132
5.5 Acido ialuronico MINI (<10 kDa) e i derivati HA-EDA-C ₁₆ , HA-EDA-C ₁₆ -PEG e HA-EDA-C ₁₆ -CRN	pag. 134
5.5.1 Sintesi e caratterizzazione dei derivati HA-EDA-C ₁₆	pag. 134
5.5.2 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA-EDA-C ₁₆ -PEG	pag. 134
5.5.3 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA-EDA-C ₁₆ -CRN	pag. 135
5.5.4 Preparazione e caratterizzazione delle micelle vuote e cariche di imatinib	pag. 136
5.5.5 Studio di trasmittanza <i>in vitro</i> delle micelle HA-EDA-C ₁₆ , HA-EDA-C ₁₆ -PEG e HA-EDA-C ₁₆ -CRN	pag. 137

5.5.6	Studio di rilascio <i>in vitro</i> dell'imatinib dalle micelle	pag. 137
5.5.7	Studio di citocompatibilità <i>in vitro</i>	pag. 137
5.5.8	Studi di permeazione trans-corneale	pag. 138
5.5.8.1	Permeazione trans-corneale <i>in vitro</i>	pag. 138
5.5.8.2	Permeazione trans-corneale <i>ex vivo</i>	pag. 139
5.5.9	Studio di <i>sprouting</i> vascolare	pag. 140
5.6	L'acido ialuronico XS (100 kDa) e i derivati HAXS-EDA-C ₁₈ e HAXS-EDA-C ₁₈ -RGDC	pag. 141
5.6.1	Sintesi e caratterizzazione del derivato HAXS-EDA-C ₁₈	pag.141
5.6.2	Sintesi e caratterizzazione del derivato HAXS-EDA-C ₁₈ -RGDC	pag.141
5.6.2.1	Sintesi dell'estere N-idrossisuccinimidico dell'acido maleimidobutirrico (MLB-NHS)	pag. 141
5.6.2.2	Grafting del peptide RGDC	pag. 142
5.6.3	Produzione e caratterizzazione delle nanoparticelle HAXS-EDA-C ₁₈ e HA-EDA-C ₁₈ -RGDC vuote e cariche di imatinib	pag. 142
5.6.4	Studio di rilascio <i>in vitro</i> dell'imatinib dalle nanoparticelle HAXS-EDA-C ₁₈	pag. 144
5.6.5	Studio di citocompatibilità <i>in vitro</i>	pag. 144
5.6.6	Studio di <i>sprouting</i> vascolare	pag. 145
5.7	Analisi Statistica	pag. 145
6.	Bibliografia	pag. 146

1. INTRODUZIONE

1.1 Cenni di anatomia e fisiologia oculare

L'occhio è un organo pari dalla forma sferoidale, con un diametro medio di 24 mm e un peso di 7.5 g [1]. È l'organo di senso principale dell'apparato visivo; la sua funzione è la captazione delle radiazioni luminose (fotoni appartenenti allo spettro del visibile) provenienti dal mondo esterno e di trasformarle in impulsi nervosi, che a livello corticale saranno utilizzati a scopi percettivi. La piccola porzione anteriore è deputata alla percezione degli stimoli luminosi, mentre la porzione posteriore è responsabile della rilevazione e trasduzione della luce. Ciascun bulbo oculare occupa la cavità orbitale, struttura ossea a forma di piramide quadrangolare, ed è mantenuto in situ grazie alla presenza di una massa di tessuto adiposo, dei muscoli estrinseci dell'occhio, dei nervi cranici e dei vasi sanguigni diretti all'occhio e alle porzioni adiacenti dell'orbita. Altri annessi oculari sono le palpebre, la congiuntiva e l'apparato lacrimale (Figura 1).

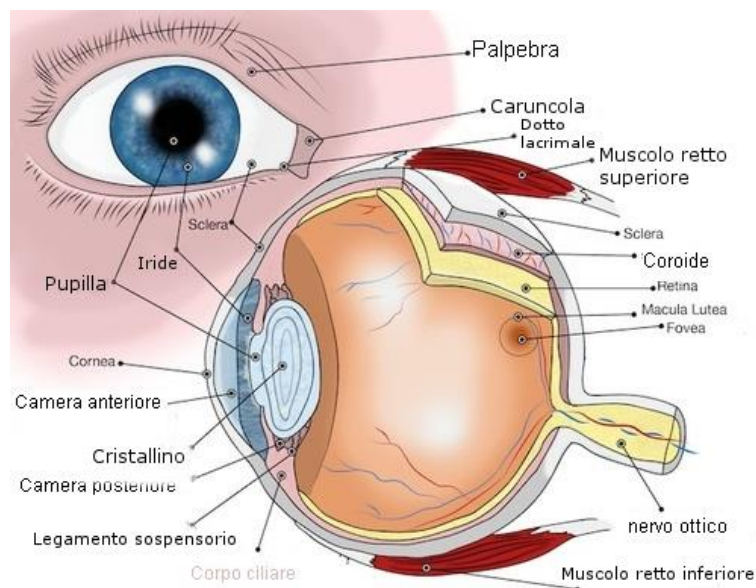


Figura 1. Struttura anatomica dell'occhio e annessi oculari

Le **palpebre** sono due veli muscolo-membranosi che rivestono anteriormente l'orbita con una funzione protettiva. In ogni palpebra distinguiamo la faccia anteriore cutanea, la faccia posteriore rivestita dalla congiuntiva palpebrale e il bordo libero. Nello spessore delle palpebre ci sono le ghiandole di Meibomio, di Zeiss e di Moll che umidificano e lubrificano la superficie anteriore del globo oculare producendo in particolare materiale lipidico.

La **congiuntiva** è una membrana mucosa che riveste la superficie posteriore delle palpebre riflettendosi all'indietro e rivestendo poi la superficie anteriore del globo oculare, delimitando uno spazio virtuale detto sacco congiuntivale. Può essere suddivisa in congiuntiva palpebrale, congiuntiva dei fornici e congiuntiva bulbare. In generale, è formata dall'epitelio (cellule mucipare, melanociti) e dalla sostanza propria; annesse alla congiuntiva abbiamo molte ghiandole, sierose (Krause, Wolfring) e mucose (Henle, Manz). Ha una funzione meccanica (scorrevolezza delle palpebre sul bulbo), difensiva (aspecifica: azione detergente, lisozima; specifica: IgA e IgG), nutrizionale (contribuisce al mantenimento dell'equilibrio metabolico), emuntoria (contribuisce all'eliminazione dei metaboliti).

L'**apparato lacrimale** è costituito dalle vie lacrimali, che hanno il compito di convogliare le lacrime nella cavità nasale, e dalle ghiandole lacrimali, preposte alla secrezione di diversi elementi del film lacrimale. Il **film lacrimale** (o liquido lacrimale) è una pellicola trasparente e fluida che ricopre le strutture oculari esterne, distribuendosi sulla superficie corneale e congiuntivale grazie ai movimenti volontari e involontari di ammiccamento. Il film lacrimale è composto da uno strato mucoso (interno), sieroso (intermedio), lipidico (esterno, evita una eccessiva evaporazione) [2]. Lo strato mucoso, secreto dalle cellule di Goblet ed intimamente associato con il glicocalice delle cellule epiteliali, è costituito da glicoproteine, proteine, lipidi, elettroliti, enzimi, mucopolisaccaridi ed acqua [2]. Le componenti principali sono le mucine, delle glicoproteine ad elevato peso molecolare (da 0.2 a oltre 50 MDa); sono responsabili dell'estensione, della stabilità e della coesione del film lacrimale [3]. Il core proteico contiene una serie di regioni centrali ripetute di sequenze di prolina, treonina e serina (*PTS region*); le catene polisaccaridiche sono legate al core proteico mediante legami O-glicosidici tra la porzione zuccherina dell'N-acetilgalattosammina e l'idrossile dei residui serinici e treoninici [4]. La mucina è carica negativamente a pH fisiologico per esposizione delle porzioni di fucosio o di acido sialico (acido N-acetilneuramminico, $pK_A=2.6$). In soluzione, aggregati lineari formati da oligomeri di mucina sono stabilizzati dalla formazione di legami ad idrogeno tra residui glucidici adiacenti; una combinazione di *crosslinking*, data da ponti disolfuro e legami idrofobici, e di network, formati da grovigli di molecole organizzate a spirale, forma infine la struttura terziaria della mucina [5]. Lo strato mucoso è molto sensibile all'idratazione e forma uno strato gelatinoso con proprietà reologiche viscoelastiche. Questo facilita il movimento delle palpebre e protegge l'epitelio corneale sottostante da eventuali traumi e agenti esterni. Infatti il muco intrappola batteri, detriti e corpi estranei formando un "filo di

muco” che verrà trasportato durante il battito delle palpebre nell’angolo interno dell’occhio e quindi espulso [2]. Dall’altra parte il muco può fissare sostanze cationiche perché attratte dalla carica negativa delle mucine [6].

Lo strato sieroso intermedio del film lacrimale è uno strato acquoso costituito da sali inorganici, glucosio, urea, retinolo, acido ascorbico, varie proteine, immunoglobuline, lisozima, lattoferrina e glicoproteine [7]. Lo strato lipidico superficiale (100 nm), secreto dalla ghiandola di Meibomio e di Zeiss, è costituito invece da esteri sterolici, triacilgliceroli, fosfolipidi, steroli liberi e acidi grassi liberi. I lipidi giocano un importante ruolo nel ridurre la velocità di evaporazione del fluido pre-lacrimale in modo tale che la normale osmolarità del fluido possa essere mantenuta uguale a quando il flusso lacrimale è fermo (Figura 2) [8].

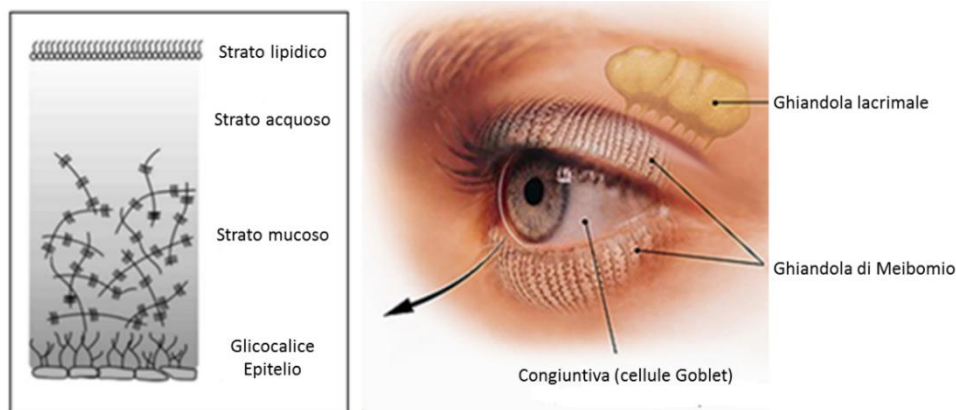


Figura 2. Rappresentazione schematica del film lacrimale pre-corneale e distribuzione delle ghiandole accessorie oculari

Il **film lacrimale** ha funzioni ottiche (distribuendosi sulla superficie corneale la rende liscia ed omogenea), metaboliche (nutrimento della cornea), lubrificanti, di difesa e di pulizia.; è caratterizzato da uno spessore di circa 3-10 μm , il volume residente è pari a 10 μl [9]. L’osmolarità è pari a 310-350 mOsm/kg ed è regolata da principali ioni inorganici come Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- e da proteine. Il valore normale di pH lacrimale è intorno a 7.4; in condizioni patologiche o in età avanzata il valore di pH può variare ed essere compreso tra 5.2 e 9.3. Inoltre, il liquido lacrimale mostra un comportamento reologico non-Newtoniano e la viscosità è intorno a 3mPa s [10]. La tensione interfacciale è dipendente dalla presenza di mucine solubili e lipidi. La velocità del drenaggio lacrimale nell’area pre-corneale è pari a 1.45 min^{-1} .

Il **bulbo oculare** è un organo veramente delicato e complesso; è composto da tre tonache distinte che dall'esterno all'interno sono la tonaca fibrosa, la tonaca vascolare e la tonaca nervosa.

La **tonaca fibrosa** è lo strato più esterno ed offre supporto meccanico, protezione fisica e contiene le formazioni necessarie al processo di messa a fuoco delle immagini. La maggior parte della superficie oculare è ricoperta dalla sclera (il "bianco dell'occhio") costituita da tessuto connettivo fibroso denso con fibre collagene ed elastiche. La superficie anteriore della sclera contiene piccoli vasi sanguigni e nervi; la cornea, parte della tonaca fibrosa, è strutturalmente in continuità con la sclera (il limbo corneale è il bordo tra le due) ed è deputata alla focalizzazione della luce e il direzionamento di questa sulla retina.

La **cornea** istologicamente è costituita da 5 strati, che dall'esterno all'interno sono: l'epitelio corneale di tipo pavimentoso pluristratificato (5-7 strati) in continuità con quello congiuntivale; la membrana di Bowman, con uno spessore di circa 12 μm , costituita da un intreccio di fibre collagene e rare cellule di Schwann; lo stroma, costituito da lamelle immerse in una sostanza fondamentale, da cheratociti, e talvolta da cellule di Schwann; la membrana di Descemet (spessore di circa 12 μm), formata esclusivamente da fibrille collagene e dotata di elevata elasticità, anche se non presenta fibre elastiche; l'endotelio (spessore di 6 μm), costituito da cellule poligonali, ricche di mitocondri, disposte in un unico strato, che nell'insieme appaiono come un mosaico. La cornea è ricca di terminazioni nervose ma non è vascolarizzata; le cellule epiteliali traggono ossigeno e nutrimento dalle lacrime che scorrono sulla superficie, mentre le cellule endoteliali dall'umor acqueo che riempie la camera anteriore (Figura 3).

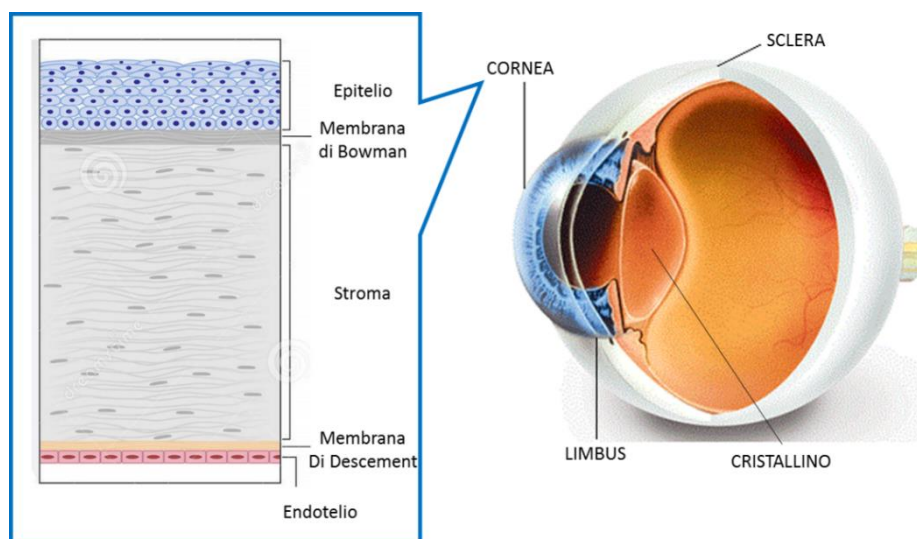


Figura 3. Elementi della tonaca fibrosa; a sinistra in dettaglio la struttura della cornea

Posteriormente alla cornea si trova il **cristallino**, la lente biconvessa dell'occhio, circondato dalla zonula di Zinn, formato da strati concentrici di cellule e rivestito da una capsula di tessuto connettivo fibroso denso (cristalloide). È mantenuto in posizione dai legamenti sospensori originati sul corpo ciliare della coroide. La funzione principale del cristallino, svolta modificando la propria forma, consiste nel mettere a fuoco l'immagine sui fotorecettori della retina.

La **tonaca vascolare (uvea)** rappresenta la via di accesso per i vasi che irrorano l'occhio, regola la quantità di luce in entrata, controlla la forma del cristallino e secerne e riassorbe l'umor acqueo. È costituita da uno strato pigmentato (iride) e dal corpo ciliare nella porzione anteriore, e dalla coroide nel segmento posteriore. L'**iride** regola la quantità di luce che entra nell'occhio; è costituita da vasi sanguigni, cellule pigmentate e dalla muscolatura intrinseca dell'occhio che permettono la variazione del diametro della pupilla, ovvero l'apertura centrale dell'iride. Il **corpo ciliare** è costituito anteriormente dalla corona ciliare (o *pars plicata*), caratterizzata da una serie di piccoli rilievi radiali (processi ciliari) separati l'un l'altro dalle vallecule dalle quali dipartono fibre che si dirigono al cristallino formando l'apparato zonulare di Zinn (zonula ciliare o apparato sospensore del cristallino), un sistema di fibre tese fra il cristallino e il corpo ciliare. L'epitelio dei processi ciliari è deputato alla produzione dell'umor acqueo. Posteriormente invece il corpo ciliare è caratterizzato dall'orbicolo ciliare (o *pars plana*) la cui superficie interna appare del tutto simile a quella corioidea. La faccia esterna del corpo ciliare, specialmente nella regione della corona ciliare, è costituita dal muscolo ciliare, le cui cellule muscolari lisce sono disposte in fasci esterni orientati longitudinalmente (muscolo di Brucke), in fasci più interni a disposizione anulare (muscolo di Müller) e in fasci intermedi a decorso obliquo (fibre radiali). La **coroide** è un vasto intreccio di melanociti e di vasi capillari, essenziali per il nutrimento e l'ossigenazione della porzione più esterna della retina (Figura 4).

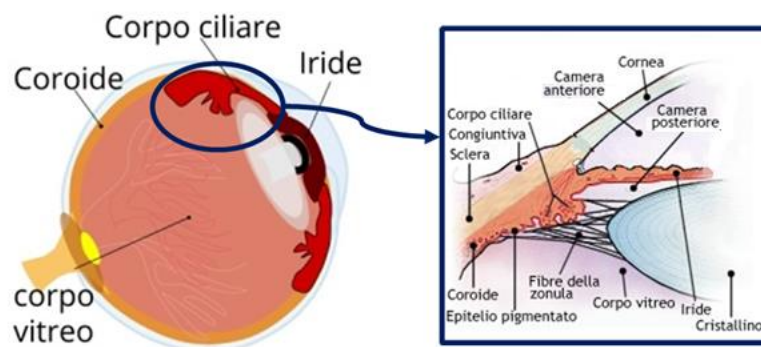


Figura 4. Elementi della tonaca vascolare; a destra, la rappresentazione dettagliata del corpo ciliare

La **tonaca nervosa**, o retina, è formata dallo strato pigmentato esterno, con la funzione di assorbire la luce, e dallo strato nervoso interno (neuroretina) che contiene i fotorecettori, i neuroni associati, che elaborano ed integrano in fase preliminare le informazioni visive, e i vasi sanguigni. Lo **strato pigmentato** è costituito da un monostrato di cellule specializzate con caratteristiche epiteliali, ancorate alla membrana basale della coroide e ricche di pigmento scuro (fucsina); queste costituiscono l'**epitelio pigmentato retinico (EPR)**. Forma un vero e proprio schermo alla luce, impedendo il propagarsi della stessa agli strati sottostanti. Queste cellule si mostrano a sezione esagonale e sono provviste, dalla parte rivolta verso la retina, di numerosi e sottili prolungamenti o frange, che si insinuano fra i coni ed i bastoncelli. È di fondamentale importanza per gli scambi metabolici tra i fotorecettori e la coroide sottostante. La sua integrità è, quindi, condizione essenziale per il buon funzionamento del complesso equilibrio retinico; infatti, in molte patologie retiniche è compromesso proprio questo strato.

La **neuroretina** è costituita da circa 130 milioni di fotorecettori, ciascuno dei quali controlla una determinata posizione retinica; si distinguono in coni e bastoncelli. I coni sono estremamente differenziati (3 tipi: blu, verde, rosso) e la loro stimolazione in varie combinazioni permette la discriminazione dei diversi colori; forniscono immagini più nitide ma richiedono una luce più intensa. Ogni cono è connesso ad una singola cellula nervosa: tale forma di collegamento fa sì che i coni siano deputati alla visione diurna, a quella dei colori e del contrasto. I bastoncelli sono molto più sensibili agli stimoli luminosi e rendono possibile la visione in ambienti poco illuminati. Più bastoncelli scaricano il proprio impulso ad una sola cellula neuronale sottostante; ne consegue che lo stimolo generato non è così strutturato e preciso come quello dei coni. Infatti l'acutezza visiva cala notevolmente in condizioni di scarsa luminosità. Coni e bastoncelli si distribuiscono in modo non uniforme: i bastoncelli formano un'ampia banda intorno alla periferia retinica, mentre nel polo posteriore troviamo i coni concentrati soprattutto nella macula lutea (priva di bastoncelli), in cui l'immagine giunge dopo aver attraversato la cornea e il cristallino. La macula lutea (o più comunemente macula) è una piccola zona centrale della retina, vicina alla papilla ottica (detta anche punto cieco, che è l'origine del nervo ottico). Ha un diametro di circa mezzo centimetro ed al centro presenta una depressione, detta fovea. La macula lutea è priva di vasi sanguigni poiché questi verrebbero ad ostacolare il passaggio e la captazione della luce; si tratta di una zona estremamente delicata e facilmente

aggredibile da fenomeni patologici e degenerativi. La più alta concentrazione di coni si ha nella fovea, che rappresenta quindi la sede della visione più discriminata.

In generale, la neuroretina è composta da 9 strati sovrapposti che, andando dalla superficie esterna (applicata allo strato pigmentato retinico) fino alla superficie interna (applicata al corpo vitreo) sono:

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1°: dei coni e dei bastoncelli | 6°: plessiforme interno |
| 2°: membrana limitante esterna | 7°: delle cellule multipolari |
| 3°: dei granuli esterni | 8°: delle fibre nervose |
| 4°: plessiforme esterno | 9°: membrana limitante interna. |
| 5°: dei granuli interni | |

Dopo aver attraversato le strutture oculari del segmento anteriore ed il corpo vitreo, i raggi luminosi sono convogliati sulla fovea centrale per una massima acuità visiva, la percezione dei colori e la sensibilità al contrasto. Quindi, la luce passa l'intero spessore della retina e colpisce i coni e i bastoncelli, da cui si propagherà la trasmissione visiva alle fibre nervose sovrastanti (Figura 5).

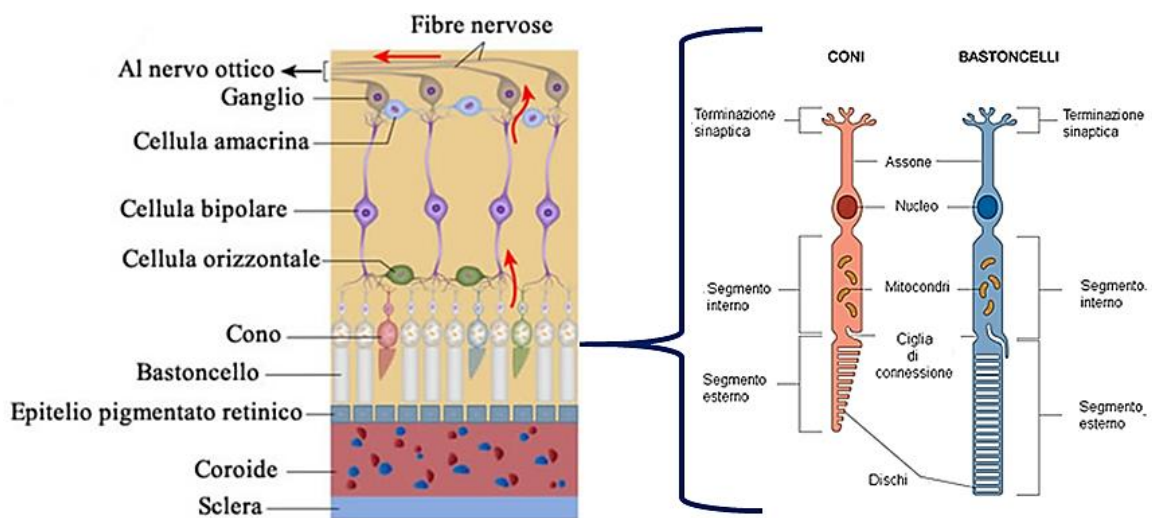


Figura 5. Propagazione dell'impulso nervoso attraverso la neuroretina (freccia in rosso); a destra in dettaglio, la struttura dei coni e bastoncelli

L'occhio è ulteriormente suddiviso in camera anteriore, camera posteriore e camera vitrea; tutte queste strutture sono responsabili della rifrazione della luce all'interno dell'occhio. Sia la camera anteriore che posteriore contengono l'umor acqueo, fluido incolore prodotto dal corpo ciliare e secreto nella camera posteriore; dopo aver attraversato la pupilla, raggiunge la camera anteriore e poi diffonde all'interno di essa. L'umor acqueo è costituito da fattori di crescita, soluti organici (amminoacidi, glucosio, acido ascorbico), elettroliti e

altre proteine, necessario per il nutrimento dei tessuti avascolarizzati nel segmento anteriore e per il mantenimento della pressione intraoculare (14-22 mmHg).

La camera vitrea è costituita dall'umor vitreo (o corpo vitreo), una matrice extracellulare altamente idratata (98% di acqua), incolore e trasparente, di consistenza gelatinosa, e composta da fibrille, acido ialuronico, collagene, proteine, acido ascorbico, sali inorganici e glucosio. L'umor vitreo costituisce circa i quattro quinti del volume dell'intero globo oculare, con un peso di circa 3.9 g (3.8 ml) e un peso specifico di 1.005 g/ml. Essendo trasparente, l'umor vitreo rappresenta un vero e proprio mezzo di rifrazione (indice di rifrazione pari a 1.338) consentendo la trasmissione della luce fino alla retina (funzione diottrica). L'umor vitreo contribuisce a stabilizzare la forma dell'occhio, funge da supporto alla posizione posteriore del cristallino e della retina, premendo lo strato nervoso su quello pigmentato. Inoltre favorisce la diffusione dei nutrienti e protegge dai microtraumi provenienti dal mondo esterno. Il corpo vitreo è rivestito da una membrana trasparente detta membrana ialoidea (o membrana vitrea). Anteriormente è possibile individuare una depressione centrale detta fossetta patellare o fossa ialoidea, in cui alloggia la superficie posteriore del cristallino.

Da un punto di vista macroscopico, il corpo vitreo è caratterizzato da fasci incrociati di sottili fibre collagene (tipo II e IX) che costituiscono un vero e proprio reticolo che permette di svolgere la funzione meccanica di sostegno [11]. All'interno di questa fitta rete di fibre collagene, diversi glicosaminoglicani quali l'acido ialuronico (HA), l'eparan solfato (HS) ed il condroitin solfato (CS) sono presenti nel gel vitreale in concentrazioni più basse rispetto al collagene [12]. Le variazioni di numero di fibre di collagene e la loro organizzazione rendono il vitreo più o meno denso. In particolare, la massa è più fluida centralmente, mentre a livello della base le fibre aderiscono strettamente alla retina. A causa dell'eterogenea distribuzione delle macromolecole all'interno del vitreo e anche a causa dei cambiamenti composizionali legati all'età, la concentrazione in HA riscontrata nel vitreo umano rientra nel range 65-400 µg/ml (50-570 µg/ml per il corpo vitreo bovino) [13,14]. Nel gel vitreale troviamo inoltre una popolazione cellulare specifica costituita dagli ialociti, relativamente più abbondanti nella porzione periferica. Queste cellule svolgono diverse funzioni metaboliche; possiedono la struttura enzimatica in grado di produrre l'acido ialuronico, e sono deputati alla fagocitosi dei prodotti di scarto del vitreo. Inoltre, nell'occhio è possibile individuare due barriere fisiche che proteggono l'intero bulbo oculare dalle sostanze estranee provenienti dall'esterno: la barriera emato-acquosa (BAB, *Blood-Aqueous Barrier*) e la barriera emato-retinica (BRB, *Blood-Retinal Barrier*).

La BAB è presente nel segmento anteriore dell'occhio, e solo una ristretta classe di molecole penetra dal sangue all'umor acqueo. È costituita dal corpo ciliare e dall'iride: in particolare, l'epitelio ciliare non pigmentato del corpo ciliare e le cellule endoteliali vascolari dell'iride sono caratterizzate da *tight junction* che determinano la formazione di una barriera [15]. La BAB contribuisce alla nutrizione e alla funzionalità della cornea e del cristallino. Le alterazioni di questa barriera sono solitamente indotte da infiammazioni oculari, interventi intraoculari, traumi o patologie vascolari. In queste condizioni patologiche, l'umor acqueo diventa torbido a causa del riversamento di proteine plasmatiche e di cellule infiammatorie. Tuttavia la BAB non è considerata una barriera completa poiché presenta dei capillari fenestrati nello stroma del corpo ciliare, attraverso cui piccole molecole possono entrare nella circolazione iridea (Figura 6) [16].

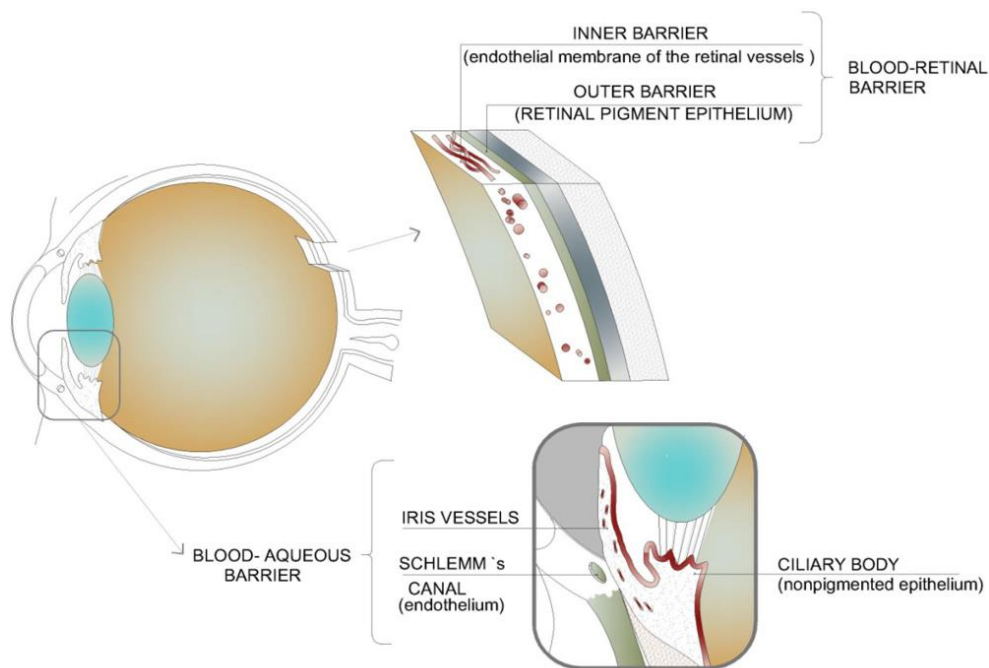


Figura 6. Blood-Aqueous Barrier (BAB) e Blood-Retinal Barrier (BRB) [17]

La BRB è costituita dalle *tight junction* presenti nelle cellule endoteliali dei vasi retinici (BRB interna) e quelle presenti nelle cellule epiteliali pigmentate retiniche (BRB esterna). La BRB interna rende la retina impermeabile alle molecole con un peso molecolare maggiore di 20-30 kDa; è simile anatomicamente alla barriera emato-encefalica, poiché presenta periciti e cellule della glia. I periciti sono deputati al mantenimento della stabilità vascolare e al controllo della proliferazione endoteliale [18]; le cellule della glia presenti sono le cellule di Muller, necessarie per il mantenimento del pH e del bilancio ionico, e gli

astrociti, con il compito di regolare lo sviluppo della vascolatura retinica [19]. La grande densità di giunzioni strette, la presenza di periciti e di cellule della glia rendono l'interno della BRB altamente efficace nel limitare il trasporto dei farmaci dal sangue alla retina [20].

1.2 Le retinopatie: cenni di fisiopatologia e trattamenti terapeutici

Con il termine retinopatie si fa riferimento a un vasto gruppo di patologie che interessano la retina; sono patologie particolarmente gravi e possono causare la perdita della vista.

Le patologie della retina con una più alta incidenza nella società moderna sono la degenerazione maculare legata all'età, la retinopatia diabetica, l'edema maculare e la retinite pigmentosa. Sono caratterizzate da un'alterazione della componente vascolare oculare, con una maggiore espressione di diversi fattori da parte delle cellule endoteliali retiniche tra cui il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) [21]. Queste patologie condividono i meccanismi fisiopatologici della neoangiogenesi, portando generalmente ad un accumulo di fluido ed emorragia nella retina, e successivamente al distacco della retina ed alla degenerazione/morte dei fotorecettori [22,23].

Fisiologicamente, nell'ambiente oculare il VEGF svolge un ruolo di protezione e di regolazione del flusso sanguigno all'EPR e ai fotorecettori. Inoltre, è presente un sofisticato equilibrio tra fattori pro-angiogenici e fattori anti-angiogenici, che controlla strettamente la formazione di nuovi vasi sanguigni; ovviamente ci sarà una prevalenza verso i fattori anti-angiogenici, come ad esempio il fattore derivato dall'epitelio pigmentato (PEDF, *Pigment Epithelium-Derived Factor*) [24]. Il PEDF è espresso dall'EPR ed ha una potente attività anti-VEGF [25].

Un importante fattore che può spingere questo delicato equilibrio verso la proangiogenesi è l'ipossia. In condizioni patologiche, la riduzione del flusso ematico corio-capillare e della circolazione retinica, gli stress ossidativi, gli insulti ischemici (ipossia), l'espressione del fattore ipossia-inducibile 1 α (HIF-1 α , *hypoxia inducible factor 1 α*), il grado di crescita e il *leakage* dei neo-vasi, l'aumento dei recettori Flt-1 e Flk-1 delle cellule endoteliali (appartenenti alla famiglia delle tirosin-chinasi) e l'alterazione della membrana di Bruch inducono l'incremento dell'espressione del VEGF nell'EPR, con l'innescare di processi bio-istochimici patologici [26]. Infatti, il VEGF è responsabile di una serie di effetti proangiogenici contraddistinti dalla vasodilatazione, dall'aumento della permeabilità

vasale, dal rilascio di enzimi proteolitici che invadono e condizionano il rimodellamento tissutale con prevenzione dell'apoptosi endoteliale (Figura 7) [26].

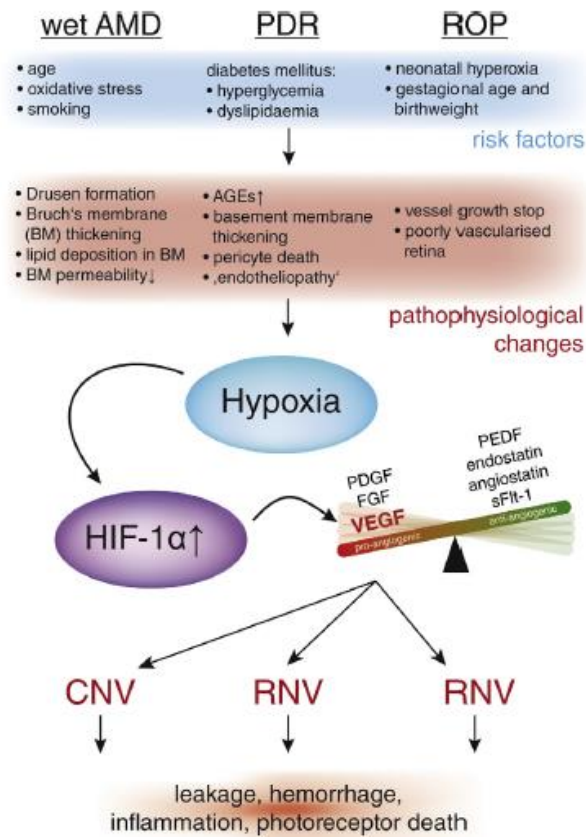


Figura 7. Rappresentazione schematica dell'ipossia come fattore chiave nella formazione di lesioni neovascolari. Le condizioni ipossiche inducono un'up-regulation del HIF-1 α che a sua volta induce un incremento dell'espressione del VEGF, inclinando il bilancio angiogenico verso la pro-angiogenesi; questo induce una neovascolarizzazione patologica [BM (*Bruch's Membrane*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), CNV (*Choroidal Neo-Vascularization*), RNV (*Retinal Neo-Vascularization*)] [27]

Nell'uomo esistono diverse isoforme di VEGF, distinte per il numero di amminoacidi che le costituiscono (Figura 8). Tra queste, la forma maggiormente rappresentata a livello oculare è l'isoforma VEGF165. Il VEGF-A è il più potente mediatore dell'angiogenesi retinale e corioideale; legandosi ai recettori posti sulla membrana endoteliale vasale promuove la migrazione e la proliferazione delle stesse cellule, con formazione di nuovi vasi e con un aumento della permeabilità vasale retinica [28]. Si è visto infatti che nella neovascolarizzazione corioideale (CNV) l'espressione del VEGF165 è 20 volte maggiore rispetto alla condizione basale fisiologica. Per tale motivo, il trattamento delle retinopatie con l'impiego di farmaci ad azione anti-VEGF ha un razionale pertinente.

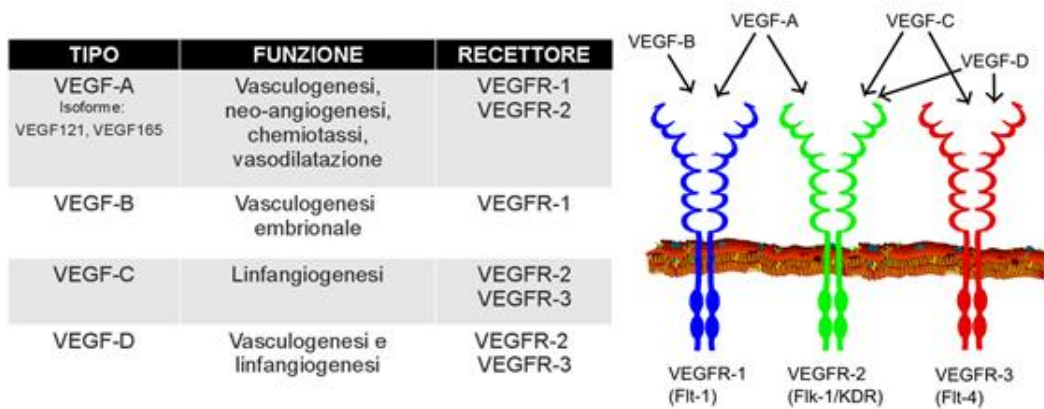


Figura 8. Classificazione delle isoforme del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e rappresentazione delle strutture recettoriali

1.2.1 Degenerazione maculare legata all'età

La degenerazione maculare legata all'età (DMLE, *Age Related Macular Degeneration* AMD) è una malattia cronica e progressiva legata all'invecchiamento che colpisce la macula; è la principale causa di perdita grave della visione centrale dopo i 65 anni [29].

La degenerazione maculare è caratterizzata nella fase iniziale da alterazioni pigmentate associate alla formazione di *drusen* piccole o intermedie, cioè piccoli depositi rotondeggianti giallastri nella membrana di Bruch di sostanze derivate da un alterato metabolismo delle cellule retiniche. Infatti, in queste condizioni, il fisiologico passaggio di ossigeno e nutrienti dalla coroide alla retina diventa difficoltoso, e i prodotti del metabolismo cellulare si accumulano a formare depositi sotto l'epitelio pigmentato stesso.

È possibile distinguere due forme di degenerazione maculare, entrambe associate ad alterazioni del microcircolo capillare. La forma secca o atrofica (85-90% dei casi) è caratterizzata dalla presenza di *drusen* con successiva alterazione atrofica dell'epitelio pigmentato retinico e della coriocapillare ad esse adiacenti, fino al costituirsi di un quadro clinico denominato atrofia geografica. A questo segue l'atrofia dei fotorecettori; la perdita visiva sarà tanto più grave quanto più estese e centrali sono le lesioni.

La forma umida, definita essudativa o neovascolare (10-15% dei casi), quella più grave e a più rapida evoluzione, è solitamente secondaria alla degenerazione maculare secca, ed è caratterizzata da un processo di neoangiogenesi. La formazione di nuovi vasi è la causa di essudazione sierosa e di emorragie retiniche. Il processo neovascolare-essudativo interessa elettivamente l'area centromaculare; quindi la funzione visiva centrale ne risulta gravemente compromessa (Figura 9) [30].

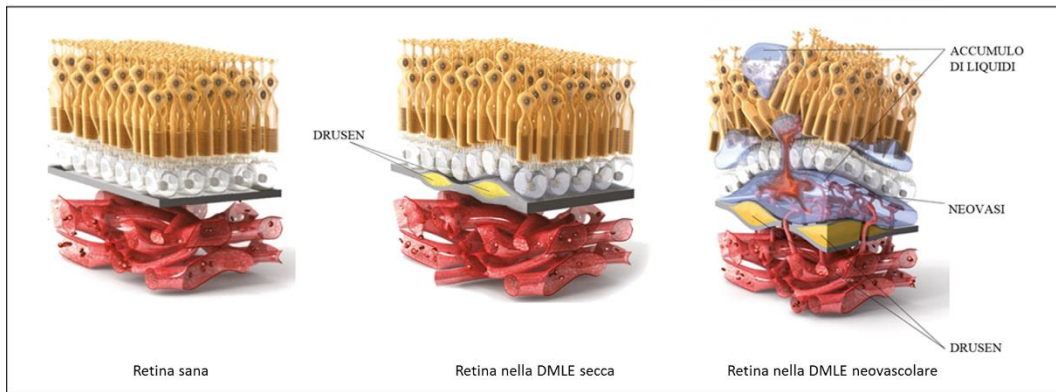


Figura 9. Rappresentazione della retina nell'occhio sano e nella DMLE secca e neovascolare

Il trattamento della DMLE prevede diversi approcci, scelti in base alla gravità della patologia in atto; la prevenzione rappresenta senza alcun dubbio la strategia primaria. La terapia fotocoagulativa (laser termico) ha attualmente indicazioni molto limitate ed è solitamente destinata a quei casi in cui la lesione appare localizzata al di fuori della porzione centrale della macula (neovascolarizzazioni extrafoveali). La terapia fotodinamica è invece il trattamento di elezione; la verteporfina (pigmento fotosensibile) è iniettata endovena e va ad aderire all'endotelio dei vasi neoformati. La verteporfina depositata è successivamente attivata con un laser non termico e la reazione che ne consegue porta alla chiusura per trombosi dei vasi anomali; la retina sana adiacente non è danneggiata.

1.2.2 Retinopatia diabetica

La Retinopatia Diabetica (RD) è la più frequente complicanza del diabete mellito, un disordine metabolico causato da un'insufficienza assoluta o relativa di insulina [31]. Alla base della RD vi è un danno vascolare, causato principalmente da cambiamenti biochimici legati all'iperglicemia (esocitosi cellulare di VEGF, istamina, ICAM-1) con conseguente aumento della permeabilità vascolare, e da uno stato di grave ipossia tissutale con iper-espressione di VEGF, citochine infiammatorie e specie reattive all'ossigeno. Nei casi più gravi, il paziente va in contro a cecità a causa dell'insorgenza di edema maculare e neovascolarizzazione vitreoretinica secondaria [31], [32].

La RD è distinta in base alla gravità della patologia come RD non proliferante e RD proliferante (Figura 10). La RD non proliferante è a sua volta classificata in precoce, moderata e severa; senza le cure opportune può evolvere in RD proliferante [33]. Nella fase precoce, la RD è caratterizzata da un visibile danno ai piccoli vasi retinici; in

particolare, questi vasi sviluppano dei rigonfiamenti *balloon-like* ovvero dei microaneurismi. Col progredire della patologia (stadio moderato), parte dei vasi danneggiati si blocca causando un alterato flusso di nutrienti e ossigeno nella parte danneggiata della retina. Il numero dei vasi bloccati aumenta nella RD non proliferante severa: diverse aree della retina non ricevono quindi l'opportuno nutrimento e ossigeno, con lo sviluppo di un processo ischemico. Il tessuto ischemico induce quindi la produzione di fattori di crescita specifici per indurre lo sviluppo di nuovi vasi, allo scopo di ristabilire l'apporto di ossigeno. Il processo di neovascolarizzazione che si manifesta è la caratteristica della RD proliferante. Questi neovasi sono formati da capillari con una parete molto fragile, quindi possono rompersi facilmente causando un'emorragia vitreale (emovitreo). In seguito può apparire una reazione fibrovascolare con formazione di membrane che possono penetrare nel vitreo, provocare una trazione retinica e un distacco della retina. Nei casi più gravi vi può essere l'insorgenza di un glaucoma neovascolare.

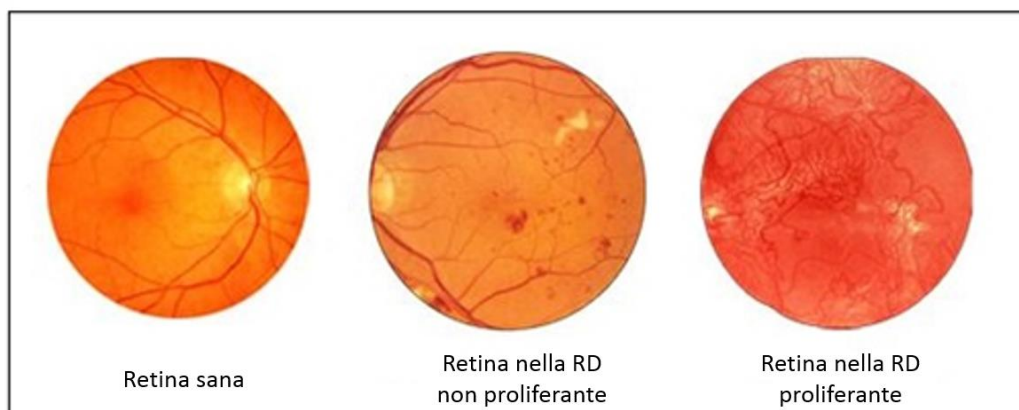


Figura 10. Rappresentazione della retina nell'occhio sano e nella RD non proliferante e proliferante

Il trattamento della RD prevede essenzialmente una terapia laser mirata alle alterazioni microvascolari responsabili dell'edema, al fine di ottenere l'obliterazione delle stesse. Il trattamento laser è eseguito ambulatorialmente, dopo aver instillato alcune gocce di anestetico locale, e generalmente non necessita alcun ricovero. La fotocoagulazione laser non sempre è risolutiva ma migliora decisamente la prognosi visiva. In associazione a questo trattamento, il paziente dovrebbe osservare un'adeguata attività fisica giornaliera, per mantenere un buon controllo metabolico, un'opportuna dieta associata all'assunzione di ipoglicemizzanti orali o insulina, e alla terapia farmacologica destinata a migliorare il flusso ematico, nonché l'aggregazione piastrinica ed altro.

1.2.3 Edema maculare

L'edema maculare è una condizione patologica caratterizzata da un accumulo improprio di liquidi a livello maculare che causa un'espansione localizzata degli spazi extracellulari e/o intracellulari della retina. In particolare, i fluidi possono accumularsi all'interno delle cellule retiniche (cellule di Muller) dando vita ad un edema citotossico caratterizzato da un rigonfiamento cellulare, oppure nello spazio interstiziale (tra lo strato plessiforme esterno e lo strato dei granuli interni) con un edema extracellulare che determina la compressione cellulare [34]. L'edema maculare spesso insorge in una condizione patologica pre-esistente quale retinopatia diabetica, DMLE, occlusioni vascolari retiniche, oppure come effetto secondario indesiderato di un intervento chirurgico. Può essere generalmente considerato il risultato di un processo infiammatorio: l'ipossia retinica induce il rilascio di sostanze pro-infiammatorie (citochine, prostaglandine, IL-6, IL-8, MCP-1), con conseguente incremento dei livelli di VEGF, della permeabilità vascolare e quindi formazione di edema maculare ed essudati intraretinici.

L'edema maculare cistoide è caratterizzato da un accumulo di liquido che ha l'aspetto di numerose cisti a disposizione radiale intorno al centro maculare; nel momento in cui si infiltra il liquido sieroso, gli strati della macula si allontanano tra loro. Inoltre, l'edema maculare diabetico rappresenta la più comune causa di perdita della vista nei pazienti diabetici. La rottura della BRB gioca un ruolo chiave nella comparsa della patologia: determina appunto la formazione dell'edema e secondariamente la disfunzione dei fotorecettori [35]. Dal punto di vista anatomico l'edema maculare è stato classificato in focale e diffuso. La forma focale è caratterizzata da un edema più localizzato, proveniente da focolai di microaneurismi spesso circondati da essudati duri. L'edema maculare diabetico diffuso è invece la conseguenza di una generalizzata dilatazione e aumento della permeabilità del letto capillare della retina al polo posteriore.

Il trattamento terapeutico eseguito nell'edema maculare è classicamente il laser focale o a griglia, talvolta associato ad un'opportuna terapia farmacologica.

1.2.4 Retinite pigmentosa

Per retinite pigmentosa si intende un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di malattie ereditarie caratterizzate da una degenerazione progressiva della retina in entrambi gli occhi. Generalmente si assiste ad una disfunzione progressiva e diffusa dei bastoncelli, con sequenziale degenerazione dei coni e dell'EPR. Si verifica una perdita dell'acutezza

visiva, un progressivo restringimento del campo visivo che può progredire fino all'ipovisione e, nei casi più gravi, alla cecità.

Secondo le statistiche internazionali, colpisce circa una persona su 4000; attualmente si ritiene che coinvolga una sessantina di geni, tra cui i più rilevanti nella eziogenesi sono il gene della rodopsina (RP), il gene USH2A ed il gene RPGR. La patologia può essere ereditata come tratto autosomico dominante (30-40%), autosomico recessivo (50-60%), o legato al cromosoma X (5-15%). In alcuni casi la malattia si trasmette in modo sporadico, senza che siano presenti alterazioni genetiche in altri membri della famiglia.

Ad oggi, non esistono terapie e trattamenti risolutivi. La retinite pigmentosa è trattata esclusivamente per rallentare il progredire della patologia. In particolare, i trattamenti prevedono l'impiego di vitamina A, di acido docosaesaenoico o dell'ossigeno terapia (OTI) [36–38].

Diversi studi mirano allo sviluppo di un'efficace terapia genica, all'integrazione nutrizionale ed alla neuroprotezione, al trapianto di epitelio pigmentato retinico, di fotorecettori o di cellule staminali nonché all'impiego di microimpianti (es. retina artificiale) in grado di stimolare elettricamente la retina, il nervo ottico o la corteccia visiva.

1.2.5 Terapie farmacologiche per il trattamento delle retinopatie

Negli ultimi anni, lo sviluppo di nuove strategie farmacologiche ha permesso di ottenere un miglioramento nel trattamento delle diverse retinopatie. Le principali classi di farmaci attualmente utilizzati sono gli antagonisti del VEGF e i corticosteroidi. Questi farmaci sono utilizzati da soli o in terapie combinate; convenzionalmente sono iniettati nel corpo vitreo.

Gli **inibitori del VEGF** (farmaci antiangiogenici o anti-VEGF) utilizzati in oftalmologia per il trattamento delle retinopatie sono il pegaptanib (Macugen[®]), ranibizumab (Lucentis[®]), bevacizumab (Avastin[®]) e aflibercept (Eyelea[®]) (Figura 11).

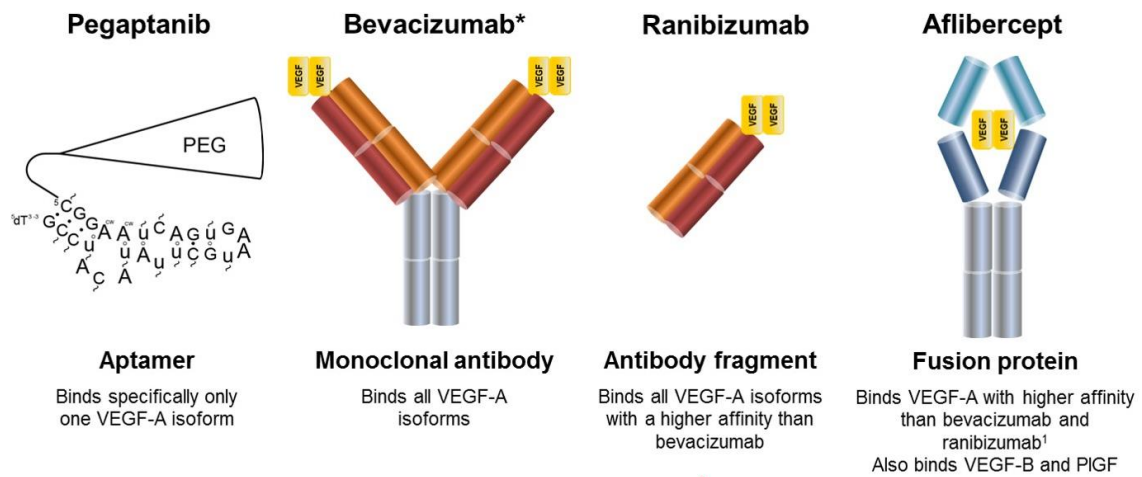


Figura 11. Inibitori del VEGF: pegaptanib, bevacizumab, ranibizumab e aflibercept

Il primo farmaco ad essere utilizzato è stato il **pegaptanib** (Macugen[®]), che nel dicembre 2004 è stato approvato dall'FDA (*Food and Drug Administration*) per il trattamento della DMLE [39,40]. È un aptamero (un piccolo frammento di RNA, costituito da 28 basi), un oligonucleotide peghilato di sintesi. Gli aptameri generalmente non inducono una risposta immunologica; tuttavia la molecola è stata funzionalizzata con due molecole di PEG allo scopo di rallentare la degradazione da parte delle endo- ed eso-nucleasi, e quindi di aumentarne l'emivita [26]. Il pegaptanib ha un'elevata affinità specifica per il VEGF165, impedendone il legame con il recettore VEGFR2, bloccando sia la formazione di vasi anomali che l'aumento della permeabilità vascolare. L'efficacia nel rallentare il peggioramento visivo è stata dimostrata; tuttavia non è in grado di apportare miglioramenti statisticamente significati della capacità percettiva nella maggior parte dei pazienti trattati [39].

L'FDA ha approvato nel 2006 il **ranibizumab** (Lucentis[®]) per il trattamento delle retinopatie. Il ranibizumab è un frammento Fab (*fragment antigen binding*) di un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato, con un peso molecolare di 48 kDa; è caratterizzato da un piccolo raggio idrodinamico, e possiede un'elevata capacità di penetrare gli strati retinici e di bloccare le forme attive del VEGF-A, inibendo la crescita vascolare e riducendo la permeabilità vasale [41]. Come il pegaptanib, anche il ranibizumab è somministrato attraverso iniezione intravitreale, al fine di ottenere un massimo effetto inibitorio sul VEGF degli strati corio-retinici e di limitare l'inibizione del VEGF sistemico, quindi senza interferire con il suo ruolo fisiologico nei tessuti extraoculari. Tuttavia l'emivita del Lucentis[®] è limitata (3 giorni); è necessaria quindi una esecuzione periodica dell'iniezione intravitreale al fine di tenere sotto controllo il decorso della malattia.

Il **bevacizumab** (Avastin[®]) è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato con un peso molecolare di 149 kDa, in grado di legare diverse isoforme del VEGF (165, 121, 110). È utilizzato solitamente nel trattamento della patologia cancerosa sistemica; l'interesse in campo oftalmologico per le patologie retiniche a carattere neoangiogenico ha previsto il suo impiego off-label nei casi di DMLE neovascolare e nella retinopatia diabetica [42]. Il vantaggio di questo farmaco è un minor impatto economico, rispetto ai farmaci citati precedentemente.

L'**aflibercept** (Eyelea[®]) è un nuovo farmaco anti-VEGF con un peso molecolare di 151 kDa. È in grado di legare tutte le isoforme di VEGF-A con una più alta affinità rispetto agli altri inibitori citati [43]. Nel 2014 l'aflibercept è stato approvato dall'FDA per il trattamento dell'edema maculare diabetico [44].

Generalmente, i farmaci anti-VEGF dovrebbero essere somministrati in tre dosi iniziali (*loading phase*, fase di caricamento), mentre le dosi successive dovrebbero essere somministrate all'occorrenza in base alla valutazione del visus e alle caratteristiche della lesione evidenziabili mediante fluorangiografia e tomografia a coerenza ottica (OCT). Tuttavia non è ancora certo se una terapia prolungata con anti-VEGF somministrati per via intravitreale influenzi l'omeostasi e la funzionalità neuronale. La somministrazione per iniezione intravitreale è infatti invasiva e correlata a serie complicanze quali, ad esempio, endoftalmiti e distacco di retina. Gli anti-VEGF sono attualmente utilizzati "off label" nel trattamento della retinopatia diabetica, con gravi rischi per il paziente. In letteratura è stata riportata l'efficacia clinica della terapia iniettiva antiangiogenica con bevacizumab in alcuni casi di RD proliferante severa ad alto rischio con proliferazioni neovascolari intravitreali associate ad emovitreo [45,46]. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato il ruolo efficace dei farmaci anti-VEGF somministrati mediante iniezione nel corpo vitreo per il trattamento dell'edema maculare.

I **corticosteroidi** possiedono una potente attività anti-infiammatoria. Sono utilizzati nel trattamento della retinopatia diabetica in quanto sono in grado di reprimere i geni ed i fattori di trascrizione proinfiammatori, inducono apoptosi nei leucociti reclutati al sito di infiammazione [32,47]; inoltre agiscono riducendo la rottura dei vasi retinici, la permeabilità vascolare e l'espressione del VEGF, inibendo l'azione delle metalloproteinasi della matrice e impedendo così la formazione di nuovi vasi sanguigni [48,49]. Questa attività farmacologica supporta l'uso dei corticosteroidi per le retinopatie a carattere neovascolare; il desametasone, il triamcinolone acetone e il flucinolone acetone sono i

maggiormente utilizzati, e possono essere somministrati secondo diverse strategie tra cui la via peribulbare, sub-tenone e intravitreale (iniezione o impianto) (Figura 12) [50].

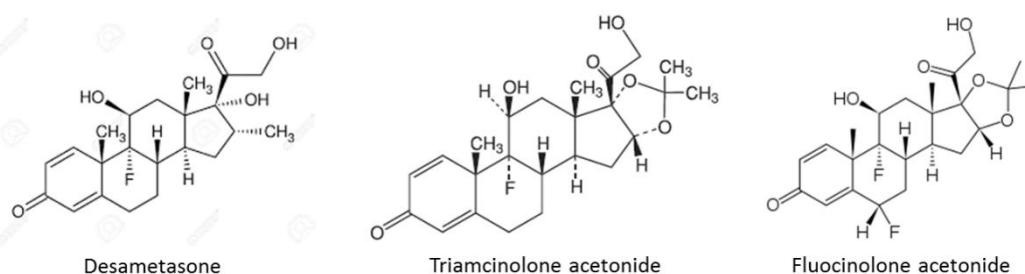


Figura 12. Corticosteroidi utilizzati nel trattamento delle retinopatie neovascolari: formule di struttura del desametasone, triamcinolone acetone, fluocinolone acetone

Il **desametasone** (DEX) è un corticosteroide con un'attività anti-infiammatoria maggiore rispetto al triamcinolone acetone, ma rispetto a quest'ultimo possiede un'emivita più bassa nel corpo vitreo (minore di 4 ore) [51]. Per tal motivo si è ricorso all'impiego di medicinali a rilascio sostenuto quali gli inserti intravitreali. Ozurdex[®] è un impianto intravitreale approvato dall'FDA per il trattamento dell'edema maculare diabetico e per le uveiti retiniche, rendendo così non necessarie le iniezioni ripetute intravitreali [52,53]. Gli impianti di desametasone (0.7 mg) costituiti da copolimeri di acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) hanno mostrato un'efficacia nel trattamento dell'edema maculare diabetico [54]. Posurdex[®], un altro sistema a rilascio sostenuto di desametasone impiantabile nel corpo vitreo, ha mostrato una potenza anti-infiammatoria sette volte maggiore rispetto al triamcinolone ed al fluocinolone. In tal modo la dose di desametasone necessaria risulta essere più bassa per ottenere un effetto terapeutico. Infatti un trial clinico di Fase II riporta che il Posurdex[®] (0.7 mg) può essere utilizzato per il trattamento di un edema maculare persistente; studi clinici di Fase III sono stati condotti per valutare la sicurezza e l'efficacia dell'impianto per il trattamento dell'edema maculare diabetico.

Il **triamcinolone acetone** (TA) è un corticosteroide di sintesi comunemente usato per il trattamento della RD attraverso un'iniezione intravitreale. Dal 1970, la somministrazione intravitreale del TA è stata utilizzata come terapia adiuvante per prevenire la proliferazione di tessuto cicatriziale a seguito di interventi di distacco di retina allo scopo di migliorare l'outcome visivo [55]. Il triamcinolone acetone ha mostrato un profilo di sicurezza accettabile in diversi modelli animali, tanto che dal 1999 è stato proposto per il trattamento dell'edema maculare diabetico [56,57]. I risultati ottenuti hanno dimostrato infatti l'efficacia del farmaco nel migliorare l'acuità visiva nei pazienti con edema maculare

diabetico dovuto a RD [58]. La somministrazione intravitreale di 4 mg di TA induce una riduzione della progressione della RD e della comparsa degli effetti avversi secondari quali cataratta e glaucoma, oltreché una riduzione della pressione intraoculare [59,60]. Tuttavia, il principale svantaggio di questo farmaco iniettato nel corpo vitreo è costituito da una breve emivita.

Il **fluocinolone acetone** (FA) è uno dei corticosteroidi più interessanti per la sua alta lipofilia e potenza [61]. Il Retisert® è un inserto intravitreale non-biodegradabile, che richiede la sclerotomia nella regione della *pars plana* per l'impianto; contiene 0.59 mg di farmaco e consente un rilascio protratto in tre anni (0.59 µg/giorno) [62]. È stato inizialmente approvato per il trattamento di uveiti croniche, successivamente per il trattamento dell'edema maculare diabetico. Diversi trial clinici hanno dimostrato un miglioramento visivo, sebbene il *device* sia associato ad un alto rischio di sviluppo di cataratta e incremento della pressione intraoculare [63]. Iluvien® (0.19mg) è un inserto intravitreale non-biodegradabile approvato dall'FDA per l'edema maculare diabetico; viene somministrato per iniezione nel corpo vitreo con un ago da 23-25 gauge e mostra il vantaggio di rilasciare 0.2 µg/giorno limitando la comparsa di effetti avversi secondari [64]. Entrambi gli inserti richiedono la rimozione chirurgica.

1.3 Gli Ocular Drug Delivery Systems e le differenti vie di somministrazione

Gli ultimi decenni sono stati caratterizzati da un significativo progresso riguardante lo sviluppo di *ocular drug delivery systems* (*ocular DDS*). In particolare, l'interesse crescente verso la nanomedicina è attribuibile al considerevole sviluppo riscontrato nell'ambito delle nanotecnologie, della chimica dei polimeri e dell'ingegneria chimica [65]. Uno studio specifico è richiesto nel settore dell'*ocular drug delivery* in quanto è necessario migliorare la somministrazione di farmaci idrofobici, acidi nucleici e proteine per oltrepassare le barriere oculari, ottenere un'elevata efficacia terapeutica e parallelamente aumentare la qualità della vita dei pazienti [66]. A tale scopo, diversi materiali naturali o sintetici sono stati studiati ed utilizzati per progettare sistemi carrier in grado di limitare la tossicità e aumentare la selettività tissutale dei farmaci incorporati [66,67].

Il trattamento di diverse patologie del tratto posteriore richiede terapie di lunga durata, solitamente con l'impiego di metodiche invasive a causa delle limitazioni della via sistemica e topica nel raggiungimento dei livelli terapeutici di farmaco nel vitreo o nella

retina senza ottenere effetti secondari indesiderati [68]. Il mantenimento per lunghi periodi delle concentrazioni terapeutiche dei farmaci all'interno del vitreo o alla retina può essere ottenuto attuando diverse strategie. A questo scopo, negli ultimi decenni molti ricercatori si stanno impegnando nello sviluppo di varie formulazioni a rilascio sostenuto, inclusi gel, microparticelle, nanoparticelle e liposomi. Microparticelle e nanoparticelle introdotte nell'umor vitreo o nello spazio perioculare possono consentire la veicolazione di biomolecole per periodi lunghi, se confrontati con il farmaco non veicolato [69–73]. I liposomi sono ampiamente studiati, per il rilascio sostenuto intravitreale e sub-congiuntivale, da diversi gruppi di ricerca [74–77]. Gli inserti oculari solidi e i film polimerici sono dei sistemi utilizzabili per ottenere un rilascio di farmaco per lunghi periodi e in maniera controllata, in quanto hanno dimostrato un'abilità nel rilascio sostenuto alla parte posteriore dell'occhio [78,79].

Un perfetto esempio che ci fa comprendere la necessità di migliorare il *drug delivery* oculare è costituito dall'impiego dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) (indometacina, diclofenac e altri) per il trattamento delle patologie infiammatorie oculari. Sebbene dagli studi *in vitro* si evince una rilevante azione terapeutica, gli studi *in vivo* hanno dimostrato un'insufficiente efficacia causata essenzialmente da una scarsa ritenzione ed accumulo al sito target dopo una somministrazione oculare topica [80]. D'altro canto, somministrazioni intravitreali ripetute di questi farmaci determinano un accumulo nel tessuto oculare sano portando alla comparsa di effetti avversi, discomfort e offuscamento della vista [81,82]. Nel caso della DMLE, i FANS sono ampiamente utilizzati per ridurre sia l'infiammazione che l'edema maculare cistoide [83]. A causa della loro lipofilia, la somministrazione intravenosa e intravitreale è ugualmente problematica e complicata; per aumentarne la solubilità vengono generalmente somministrati con dei *solubilization enhancers* come le idrossipropil- β -ciclodestrine, il dietilenglicole monoetiletere (Transcutol P), l'amido ottenilsuccinato, l' α -tocoferil PEG succinato, il polisorbato 80 [84,85]. Gli effetti secondari riscontrati sono dovuti anche all'accumulo degli eccipienti utilizzati. Pertanto gli obiettivi chiave dell'*ocular drug delivery* sono: (I) migliorare la penetrazione del farmaco attraverso le barriere oculari, (II) controllare il meccanismo di rilascio del farmaco e (III) migliorare il riconoscimento tissutale grazie alla presenza di molecole target sulla superficie del nanocarrier.

Diversi nanosistemi sono stati formulati e studiati per l'*ocular drug delivery*, tenendo sempre in considerazione le caratteristiche di base: il carrier deve essere in grado di

interagire stabilmente con il farmaco ed in maniera reversibile, oltreché avere un ottimale tempo di ritenzione *in situ* (Figura 13).

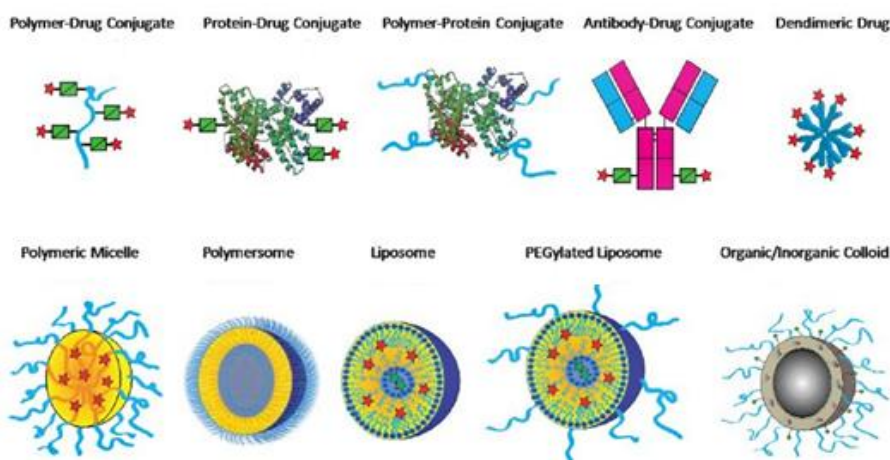


Figura 13. Schematizzazione dei più rilevanti nanosistemi di *drug delivery* utilizzati in ambito oftalmico [86]

L’FDA ha approvato l’impiego di impianti polimerici per il trattamento di patologie del segmento posteriore dell’occhio, quali il Vitrasert[®], il Retisert[®], l’Iluvien[®] e l’Ozurdex[®]. Per la somministrazione intravitreale di questi impianti è richiesto il coinvolgimento di personale medico specializzato; tale via di somministrazione pone il paziente a rischio di insorgenza di effetti secondari indesiderati come cataratta e/o glaucoma [84]. Quindi, considerando la fattibilità di una somministrazione topica per la veicolazione di farmaci al segmento posteriore dell’occhio, utilizzando nanosistemi si può notevolmente migliorare la terapia farmacologica, minimizzando i costi e soprattutto le complicazioni.

Per ottenere un sistema di *drug delivery* che sia efficace per il trattamento delle diverse patologie oculari, i tecnologici farmaceutici devono considerare la dinamicità anatomica e le diverse barriere oculari. Come già precedentemente accennato, l’occhio è caratterizzato da diverse barriere protettive che lo rendono impervio a potenziali sostanze dannose, quali microrganismi e tossine. Tuttavia prevengono anche l’ingresso e la diffusione di molecole di farmaco; pertanto la somministrazione di farmaci oculari è particolarmente impegnativa poiché queste barriere effettivamente schermano, limitano e eliminano le formulazioni dopo somministrazione. Secondo la prospettiva tecnologica del *drug delivery*, l’occhio può essere suddiviso in quattro parti: l’area pre-corneale (congiuntiva e palpebra), la cornea, il segmento anteriore (iride, corpo ciliare e cristallino) e il segmento posteriore (retina e corpo vitreo) [20,65,87,88].

Il drenaggio lacrimale che avviene nell'area pre-corneale causa un'eliminazione evidente del farmaco somministrato o del sistema carrier applicato topicamente. La goccia instillata nella parte inferiore del sacco congiuntivale ha generalmente un volume di circa 50 μl , ovvero il doppio rispetto al volume ospitabile dal sacco congiuntivale (circa 25 μl). Il riflesso meccanico di ammiccamento determina l'esclusione di gran parte del volume iniziale, permettendo solo ad una percentuale inferiore al 5% della dose somministrata di raggiungere il tessuto intraoculare. Infatti, la perdita del farmaco a causa del drenaggio lacrimale è circa 500-700 volte maggiore rispetto alla velocità di assorbimento del farmaco nella camera anteriore [89]. Inoltre, la complessa anatomia del film lacrimale, con il suo strato oleoso esterno che ritarda l'evaporazione dell'acqua, impedisce l'assorbimento del farmaco nella cornea e nella sclera [7]. La formulazione somministrata avrà quindi un tempo di residenza *in situ* molto breve, che varia dai 4 ai 23 minuti circa. Pertanto, un collirio dovrebbe essere formulato in modo tale da non essere percepito come corpo estraneo (limitata irritazione oculare) così da limitare l'ammiccamento; il farmaco che è trattenuto sulla superficie oculare entrerà verosimilmente a contatto con la cornea sottostante. L'epitelio corneale ha un ruolo fondamentale nel limitare l'assorbimento trans-corneale delle molecole di farmaco; costituisce una vera e propria barriera selettiva ed è caratterizzata da una velocità di permeazione compresa tra 10^{-5} e 10^{-7} $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ [90]. Mentre le piccole molecole lipofile di farmaco sono trasportate passivamente attraverso il pathway trans-cellulare, le molecole idrofile invece permeano attraverso le tight junction seguendo il pathway paracellulare. Lo stroma corneale essendo idrofilo impedisce il trasporto delle molecole lipofile, mentre quelle idrofile generalmente diffondono liberamente attraverso lo stroma. Complessivamente, l'efficacia della via trans-corneale è limitata a causa delle costanti di velocità di assorbimento relativamente basse ($1-5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) [91], con un cut-off di peso molecolare di 400-600 Da che costituisce un'importante limitazione nella permeabilità delle molecole di farmaco [92].

Contrariamente alla struttura corneale, l'elevata permeabilità della congiuntiva può essere attribuita innanzitutto all'elevata area che ricopre (17 volte maggiore rispetto alla membrana corneale) ed al fatto che i larghi spazi paracellulari (230 volte più grandi rispetto a quelli presenti nella cornea) facilitano il passaggio delle grandi molecole idrofile [93]. Queste caratteristiche hanno messo in risalto le potenzialità della via sclero-congiuntivale per la veicolazione intraoculare di macromolecole quali proteine, peptidi e acidi nucleici. Tuttavia, i vasi linfatici e sanguigni presenti a livello congiuntivale

eliminano significativamente le molecole di farmaco ovviamente per via sistemica, rendendo meno efficace questa via di somministrazione [94].

La via trans-sclerale potrebbe essere utilizzata per veicolare molecole con un elevato peso molecolare e raggio idrodinamico alla retina e al vitreo, utilizzando ovviamente dei sistemi di *drug delivery* appropriati. Le molecole idrofile di farmaco permeano attraverso i pori della sclera facilmente e senza difficoltà rispetto alle lipofile. Inoltre, il diametro idrodinamico e la carica superficiale delle molecole sono fattori discriminanti per la permeazione della sclera [95]. Infine, le barriere emato-oculari contribuiscono attivamente e maggiormente alla protezione dell'occhio, limitando l'ingresso dei farmaci nel segmento posteriore soprattutto in seguito ad una somministrazione perioculare e sistemica.

In generale, le forme di dosaggio convenzionali (soluzioni, sospensioni, emulsioni, unguenti, lozioni, inserti oculari, lenti a contatto) sono ampiamente utilizzate per il trattamento di varie patologie oculari. Tali formulazioni non sono in grado di oltrepassare le barriere statiche e dinamiche dell'occhio e di raggiungere il segmento posteriore dell'occhio; il farmaco non è direzionato efficientemente al sito bersaglio poiché resta bloccato al sito di somministrazione causando il fallimento della terapia farmacologica. I tecnologi farmaceutici hanno pertanto focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di diversi *ocular drug delivery nanosystems* allo scopo non solo di garantire una migliore efficacia farmacologica ma anche una diminuzione degli effetti avversi [6]. I prerequisiti base di una formulazione oculare convenzionale dovrebbero essere sempre considerati attentamente, come il corretto utilizzo di bagnanti, tamponi, colloidi protettori e antimicrobici; inoltre per ogni farmaco in sospensione deve essere garantito un'appropriata dimensione particellare e un opportuno range dimensionale, una limitata irritazione, un'adequata biodisponibilità e compatibilità con il tessuto oculare [96]. Teoricamente, un ideale DDS oculare dovrebbe essere un sistema formulato in forma di *eye drops*, in modo da non offuscare la vista, non irritare, da non richiedere più di una/due somministrazioni al giorno e aumentare la compliance del paziente [6]. Tuttavia sono state messe a punto diverse strategie di somministrazione: le strategie non invasive si basano sull'impiego di una somministrazione oculare topica, mentre quelle invasive si basano sull'impiego delle vie intraoculari. In entrambe le circostanze potranno essere utilizzati diversi sistemi di *drug delivery* quali gli *in situ gelling systems*, microsfele, nanoparticelle polimeriche, micelle polimeriche ecc. [97]; questi ovviamente saranno progettati con caratteristiche nettamente differenti, in funzione delle strutture oculari con cui dovranno interagire e della tipologia di somministrazione impiegata.

Per quanto riguarda la somministrazione non invasiva, in letteratura sono presenti diversi studi che riportano i tentativi di trattamento di patologie del segmento posteriore sfruttando la somministrazione topica di farmaci [98]; tuttavia è necessario utilizzare diverse strategie per migliorare il successo di una formulazione oftalmica convenzionale, prolungando la ritenzione del farmaco nel film lacrimale e migliorarne dunque l'assorbimento attraverso la cornea. La formulazione può contenere polimeri viscosizzanti (derivati della cellulosa, acido ialuronico e altri) al fine di ridurre la velocità del drenaggio naso-lacrimale e aumentare lo spessore del film lacrimale, poiché questi polimeri sono in grado di richiamare acqua *in situ* e stabilizzare lo strato acquoso del film lacrimale stesso. Un'altra strategia è costituita dall'impiego di polimeri mucoadesivi in grado di interagire con la mucina pre-corneale; tali polimeri sono generalmente idrocolloidi macromolecolari dotati di gruppi funzionali opportuni e di una determinata densità di carica superficiale in modo da garantire la massima interazione con lo strato di mucina grazie a legami covalenti, elettrostatici e ad idrogeno. Tra questi polimeri ricordiamo polimeri sintetici, come l'acido poliacrilico, e polimeri naturali come l'acido ialuronico che, oltre alle proprietà mucoadesive, presenta un'elevata capacità di inglobare acqua e un comportamento pseudoplastico [99].

Le strategie descritte per le formulazioni convenzionali possono essere applicate facilmente alle nanotecnologie oculari: in tal modo le potenzialità dei sistemi carrier sono accentuate dall'impiego di polimeri mucoadesivi. I nanosistemi costituiti da polimeri mucoadesivi sono in grado di migliorare e prolungare la permanenza del carrier nel sito di azione/sito di somministrazione. Inoltre, grazie alle loro dimensioni nanometriche, la permeazione dei nanosistemi attraverso il corpo vitreo è facilitata in modo tale da incrementare la quota di farmaco veicolata nel segmento posteriore oculare. Il complesso nanosistema/farmaco potrebbe essere progettato per una somministrazione oculare topica in forma di collirio. Con l'impiego di polimeri mucoadesivi sarebbero inoltre necessarie somministrazioni meno frequenti a causa di una maggiore permanenza del farmaco *in situ*, aumentando così la compliance dei pazienti. Inoltre, la dimensione delle particelle somministrate per via oftalmica al di sotto di 1000 nm permette di evitare la sensazione di fastidio durante e dopo la somministrazione.

Gli *in situ gelling systems* sono dei sistemi che dopo somministrazione nel cul-de-sac congiuntivale subiscono una transizione sol-gel in risposta ad uno stimolo ben preciso (pH, temperatura, forza ionica, ecc ...) [100]. Possono essere facilmente somministrati come *eye drops*, con un dosaggio accurato e riproducibile. Il sistema è in grado di prolungare il

tempo di ritenzione *in situ* e di conseguenza fornire un rilascio sostenuto di farmaco. Come altri vantaggi ricordiamo la semplice processabilità, il facile scale-up industriale, e il semplice processo di sterilizzazione; inoltre i polimeri impiegati presentano un comportamento pseudoplastico che determina durante l'ammiccamento una diminuzione in viscosità, un aumento dell'adesione alla superficie oculare e incremento della tolleranza da parte del paziente [101].

Le microsfele sono particelle monolitiche costituite da una matrice polimerica solida o porosa, con un diametro medio di 1-1000 μm . Sono dei sistemi in grado di garantire un rilascio sostenuto e/o controllato di farmaco, quindi possono anche aumentare la biodisponibilità dei farmaci attraverso le cellule epiteliali [102]. Possono essere utilizzate per migliorare il drug delivery di farmaci al segmento anteriore e posteriore dell'occhio, sia attraverso strategie non invasive che invasive, quindi utilizzando la via di somministrazione topica ma anche la via intravitreale o sub-congiuntivale. Kapanigowda e collaboratori riportano la somministrazione oculare topica di microsfele cariche di valacyclovir per il trattamento della porzione anteriore dell'occhio [103]; Herrero-Vanrel hanno invece progettato delle microsfele cariche di 5-fluorouracile e PKC412 (un inibitore delle chinasi) da iniettare secondo una via invasiva [104].

In generale, le nanoparticelle (10-1000 nm) sono in grado di veicolare passivamente (grazie alle loro dimensioni nanometriche) o attivamente (ligando-mediato) i farmaci al segmento posteriore dell'occhio, con un'efficacia maggiore rispetto alle forme di dosaggio convenzionali [105]. Negli ultimi anni diverse formulazioni contenenti nanoparticelle cariche di farmaco sono state utilizzate per il trattamento delle varie patologie del segmento posteriore oculare. In particolare sono state progettate formulazioni a base di nanoparticelle polimeriche, liposomi, micelle e dendrimeri [106]; recentemente anche le nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) e i carrier lipidici nanostrutturati (NLCs) sono state considerate delle valide alternative agli interventi chirurgici invasivi per il trattamento di diverse patologie degenerative della retina, in quanto posseggono un'elevata sicurezza ed efficacia, e un ottimale profilo farmacocinetico [105].

A causa della complessità dell'anatomia oculare, l'iniezione intraoculare (ovvero l'impiego di strategie invasive di somministrazione) rappresenta in molti casi la strategia di elezione per ottenere un'ottimale efficacia terapeutica per patologie retiniche e coroideali. Il percorso del farmaco all'interno della struttura oculare è in tal modo ridotto: è possibile bypassare l'epitelio corneale e le altre barriere oculari che fungono da ostacolo, permettendo di aumentare la biodisponibilità del farmaco *in situ*. Tra le diverse strategie

messe a punto, l'iniezione sub-congiuntivale è largamente utilizzata per patologie perioculari quali dermatite atopica, eczema da contatto e verruche palpebrali e prevede un'iniezione profonda nella congiuntiva bulbare superficialmente alla sclera. La via sub-congiuntivale potrebbe essere usata per ottenere un rilascio sostenuto per formazione nello spazio sub-congiuntivale di un depot di farmaco; inoltre è considerata una strategia conveniente per la veicolazione di farmaci al segmento anteriore e/o posteriore [107,108]. Tuttavia, il farmaco iniettato in questo spazio è rapidamente riversato nella circolazione sistemica.

La somministrazione intracamerale, utilizzata per patologie come l'endoftealmite post-operatoria, prevede l'iniezione diretta della soluzione di farmaco nella camera anteriore. Questo metodo è ottimale per il trattamento di patologie del tratto anteriore; tuttavia non consente il raggiungimento di concentrazioni terapeutiche nel segmento posteriore a causa del drenaggio del farmaco attraverso il flusso dell'umor acqueo. Per contrastare il rapido turnover dell'umor acqueo, sono effettuate iniezioni intracamerale ripetute al fine di mantenere una concentrazioni terapeutica di farmaco; tuttavia ciò porta ad un incremento del rischio di infezione.

È stata quindi messa a punto la somministrazione intravitteale di farmaci: questa via è preferita poiché l'agente terapeutico è direttamente posto in prossimità del tessuto target. Ovviamente, in condizioni patologiche gravi come ad esempio nel DMLE sono richieste iniezioni intravitteali ripetute, e questo comporterebbe inevitabilmente l'aumento della comparsa di effetti secondari [84,85]. Inoltre la viscosità dell'umor vitreo ostacola la diffusione delle molecole di farmaco e delle macromolecole, comportando una cinetica di diffusione e un profilo di distribuzione del farmaco somministrato non uniforme. In tal senso, è preferibile somministrare molecole con un piccolo raggio idrodinamico in quanto sono in grado di distribuirsi rapidamente e in quantità maggiore nel vitreo [109].

L'iniezione intravitteale è generalmente utilizzata per ottenere una concentrazione terapeutica del farmaco nel segmento posteriore dell'occhio. La procedura dell'iniezione prevede l'ospedalizzazione del paziente e l'anestesia locale. L'iniezione avviene mediante perforazione nella pars plana, una zona relativamente avascolarizzata posta a circa 3 mm posteriormente al limbo. Un volume di 20-100 μ l è generalmente iniettato nell'umor vitreo senza provocare offuscamento della vista [110,111]. Tuttavia, l'iniezione intravitteale è una procedura invasiva che richiede la penetrazione di tutti gli strati del globo oculare. Il numero delle iniezioni intravitteali può essere ridotto grazie all'impiego di *drug delivery systems* a rilascio sostenuto, in modo da prolungare l'efficacia terapeutica nel tempo.

La via periorbitale sta guadagnando popolarità negli ultimi anni poiché rappresenta una via non invasiva di somministrazione. Le molecole di farmaco (all'interno o meno di un sistema carrier) sono introdotte nello spazio sub-congiuntivale, retro bulbare o juxtasclerale, senza quindi alterare l'integrità delle barriere oculari, e con la capacità di raggiungere il tessuto target (la retina o l'RPE) [112]. Tra queste, la via sub-congiuntivale rappresenta la meno invasiva. I farmaci somministrati attraverso le vie periorbitali possono raggiungere il segmento posteriore dell'occhio attraverso tre differenti meccanismi: la diffusione trans-sclerale, la circolazione sistemica attraverso la coroide, o la via anteriore attraverso il film lacrimale, la cornea, l'umor acqueo o l'umor vitreo. Tuttavia, questa tipologia di somministrazione è caratterizzata da altrettante limitazioni: il *washout* del farmaco è elevato; il farmaco deve raggiungere il sito da azione in quantità terapeuticamente attiva attraverso le barriere statiche e dinamiche dell'occhio [113]. Questa via risulta essere vantaggiosa ad esempio se si utilizzasse un carrier micro- o nanoparticellare, un film polimerico o un inserto oculare, in modo da proteggere il farmaco dalla degradazione e dalla clearance, e per ottenere un rilascio di farmaco sostenuto. Infatti, la natura cronica di molte patologie oculari richiede l'impiego di sistemi a rilascio sostenuto di farmaci, che possono aiutare a veicolare la dose terapeutica per ottenere una lunga durata.

Le microparticelle e le nanoparticelle possono essere introdotte nello spazio periorbitale, da dove il farmaco incapsulato potrebbe essere trasportato attraverso i tessuti oculari per raggiungere il sito richiesto. Tra i diversi sistemi sviluppati negli ultimi decenni, ricordiamo le nanoparticelle (551 nm) e le microparticelle (2090 nm) di PLA (acido polid, l-lattico) veicolanti il triamcinolone acetone, caratterizzate rispettivamente da una *drug loading* del 14.7 e 29.5%; lo studio è stato condotto su dei ratti in cui è stata indotta la CNV. Le nanoparticelle e le microparticelle presentano in vitro un profilo di rilascio sostenuto del farmaco per 45 e 120 giorni rispettivamente. In vivo, le microparticelle sono in grado di protrarre il rilascio del farmaco fino a 2 mesi dopo iniezione sub-congiuntivale, mentre i livelli del farmaco risultano essere pressoché nulli quando si utilizzano le nanoparticelle o una sospensione del farmaco. Inoltre, le microparticelle mantengono inalterata la loro forma sferica nell'arco dei 2 mesi. Gli autori hanno dedotto che le microparticelle sviluppate e studiate sono in grado di garantire un ottimale rilascio sostenuto di farmaco rispetto alle nanoparticelle, sfruttando la via di somministrazione sub-congiuntivale [114].

Riuscire ad ottenere un rilascio sostenuto di farmaco alla parte posteriore dell'occhio resta un target esclusivo in termini di traslazione clinica, a causa della mancanza di una completa comprensione dei meccanismi di trasporto, distribuzione e rilascio sostenuto dei sistemi carrier. Sebbene ci siano numerose ricerche e diversi sistemi siano stati studiati per un rilascio sostenuto, la convenienza di questi sistemi per differenti necessità cliniche a carico dell'occhio posteriore deve essere ancora ampiamente esplorata. Inoltre, le proprietà dei carrier polimerici come la biodegradabilità, la durata e il meccanismo di rilascio del farmaco, e anche la modalità di somministrazione, la compliance del paziente, sono tutte caratteristiche distintive di ogni sistema carrier che devono essere attentamente valutate [115].

1.3.1 Le Micelle Polimeriche

Negli ultimi decenni, le micelle polimeriche hanno suscitato un crescente interesse come potenziali nanocarrier in grado di superare parte delle limitazioni oculari già descritte, e di ottenere una concentrazione terapeutica di farmaco nei tessuti costitutivi del segmento anteriore e posteriore, a seguito di una somministrazione oculare topica [116,117]. Le micelle polimeriche usate come sistemi di *drug delivery* sono generalmente costituite da polimeri anfifilici a blocchi (idrofilo-idrofobo o idrofilo-idrofobo-idrofilo), da copolimeri *graft* (idrofilo-idrofobo) e da copolimeri ionici (idrofobo-ionico). Comunemente il PEG è utilizzato come polimero idrofilo [118].

Le micelle polimeriche, dopo l'applicazione oculare topica, essendo estremamente piccole (*particle size* <300 nm), possono penetrare attraverso la cornea. In alternativa possono diffondere attraverso la via sclero-congiuntivale per raggiungere potenzialmente il segmento posteriore: la presenza di uno strato di solvatazione sullo *shell* idrofilico esterno consente alle micelle cariche di farmaco di attraversare la sclera per mezzo dei canali acquosi [119]. Giunte in prossimità del segmento posteriore, le micelle potrebbero essere ulteriormente endocitate dalle cellule dell'EPR [120,121]. I fenomeni di assorbimento tissutale e *uptake* cellulare dipendono dalla carica superficiale e dalle dimensioni delle micelle stesse [122].

Le unità anfifiliche polimeriche, chiamate unimeri, in ambiente acquoso aggregano spontaneamente (processo di *self-assembly*) a formare la micella polimerica, un nanoaggregato con un core idrofobo e una corona idrofila, quando la loro concentrazione è al di sopra della concentrazione di aggregazione critica (CAC) [123]. Il *self-assembly* è un

processo termodinamicamente favorito e si basa sulla riduzione della tensione interfacciale [124,125]. La porzione idrofila si dispone esternamente verso la fase acquosa coprendo così le catene idrofobiche del core micellare; in questo modo si limita il contatto diretto della porzione apolare con l'acqua. La loro formazione è da attribuire ad una riduzione della tensione interfacciale del sistema, dovuto alla sottrazione dei gruppi lipofili dall'interfaccia con il solvente acquoso, al ripristino dei legami a idrogeno tra le molecole di acqua e alla formazione di interazioni tra la porzione idrofila del polimero e il solvente. Tale fenomeno è ulteriormente favorito dall'instaurarsi di forze di van der Waals tra i gruppi idrofobi all'interno del sistema che permettono di ottenere un maggiore guadagno energetico.

Il grado di *self-assembly* generalmente dipende dalla concentrazione polimerica, dalle proprietà del farmaco, dal peso molecolare e dalla composizione del backbone polimerico [126]. In base al peso molecolare del polimero a blocchi, le micelle possono essere caratterizzate da una forma differente inclusa la forma sferica, cilindrica o *star-shaped* (a forma di stella) [127]. Come già riportato, la minima concentrazione polimerica richiesta per la formazione delle micelle è nota come concentrazione di aggregazione critica CAC [128,129]. Al di sotto della CAC gli unimeri sono distribuiti uniformemente in soluzione; aumentando progressivamente la concentrazione polimerica fino al valore critico, i monomeri interagiscono all'interfaccia fino a quando questa si satura. Superando il valore di CAC le micelle iniziano a formarsi [129]. Le micelle polimeriche sono caratterizzate da un valore di CAC nel range di 10^{-6} - 10^{-7} M, valore mille volte più basso rispetto alle micelle formate da tensioattivi con basso peso molecolare (CAC nel range 10^{-3} - 10^{-4} M). Un basso valore di CAC presuppone un incremento di stabilità della struttura micellare in mezzo acquoso [130,131]. Per le formulazioni oftalmiche di micelle polimeriche da somministrare per via topica, la CAC è un parametro critico di fondamentale importanza. Ad esempio, il valore di CAC può determinare un rilascio prematuro di farmaco dalla formulazione a causa della diluizione ad opera del flusso lacrimale e del drenaggio naso-lacrimale. Inoltre, l'indice di polidispersità (PDI, *polydispersity index*) è un altro fattore che influenza la forma, la stabilità, la performance della formulazione micellare, e la cinetica di equilibrio tra le micelle e gli unimeri in soluzione acquosa.

La preparazione delle micelle polimeriche può essere condotto secondo tre strategie: la formazione di coniugati farmaco-polimero, la formazione di complessi ionici micellari, la preparazione di carrier micellari con il farmaco fisicamente incorporato.

Le micelle formate da coniugati polimero-farmaco sono caratterizzate da legami chimici tra gruppi funzionali rispettivamente del polimero e della molecola bioattiva. In particolare, si usano polimeri con diversi gruppi funzionali o se necessario derivatizzabili per consentire la coniugazione con un adeguato numero di molecole di farmaco e/o agenti direzionanti, per ottenere un'opportuna efficacia terapeutica oltreché un meccanismo di targeting attivo [132]. In generale, sebbene il legame chimico farmaco-polimero possa indurre un miglioramento della cinetica di circolazione, biodistribuzione e accumulo delle micelle nel sito target, le reazioni chimiche potrebbero alterare la struttura e la funzionalità del farmaco stesso.

Nel caso dei complessi ionici micellari, le interazioni elettrostatiche tra le cariche opposte di polimero e farmaco sono sfruttate per creare il nanoaggregato. Questo metodo è solitamente utilizzato per la somministrazione di peptidi o materiale genico: formando il complesso ionico, le molecole bioattive risultano stabilizzate in quanto la loro carica superficiale è annullata e ne viene facilitata la veicolazione [133].

Per quanto riguarda l'incapsulazione fisica del farmaco nelle micelle, possono essere utilizzate diverse metodiche (Figura 14). Il **metodo della dissoluzione diretta** (non riportato in Figura 14) è la più semplice tecnica per la preparazione di micelle polimeriche cariche di farmaco. Il copolimero anfifilico e il farmaco sono miscelati in acqua ad una concentrazione superiore alla CAC, affinché il copolimero si aggregi spontaneamente intrappolando il farmaco all'interno del core. Solitamente utilizzando questa metodica l'efficienza di caricamento del farmaco è bassa; tuttavia, questo limite potrebbe essere superato incrementando la temperatura del sistema. Civiale e collaboratori hanno riportato la sintesi di una serie di copolimeri dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartamide (PHEA) funzionalizzati con l'esadecilammina (C_{16}) e/o il PEG in catena laterale, per il potenziale impiego come carrier oculare. I derivati sono stati opportunamente funzionalizzati per impartire proprietà anfifiliche al backbone idrofilo del PHEA, e per ottenere capacità complessanti dei farmaci e un'interazione con le membrane lipidiche biologiche. Le micelle polimeriche preparate hanno mostrato una parziale protezione del farmaco incorporato dalla degradazione, rispetto alle formulazioni controllo. Gli studi di permeazione *in vitro* su colture primarie di cellule epiteliali congiuntivali e corneali hanno dimostrato la capacità delle micelle PHEA- C_{16} e PHEA-PEG- C_{16} di aumentare la permeabilità dei farmaci studiati (desametasone, netilmicina solfato) rispetto alle semplici soluzioni e sospensioni. Gli studi di biodisponibilità *in vivo* sui conigli hanno ulteriormente confermato che le micelle PHEA-PEG- C_{16} agiscono non solo da promotori di solubilità ma

consentono di ottenere un'alta biodisponibilità del farmaco: l'AUC ottenuta per le micelle è infatti risultata essere maggiore del 40% rispetto alla sospensione di farmaco usata come controllo [134].

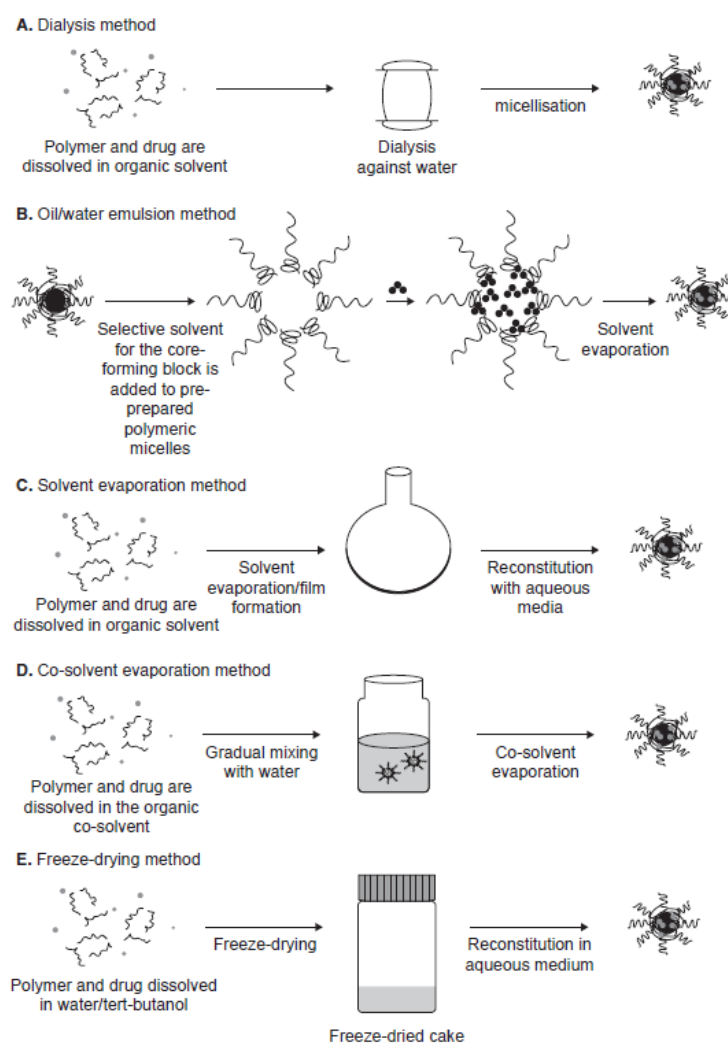


Figura 14. Metodi fisici di incapsulazione di farmaci all'interno delle micelle polimeriche: A) metodo della dialisi, B) emulsione O/W, C) evaporazione del solvente, D) evaporazione del co-solvente, E) *freeze-drying* [125]

Il **metodo della dialisi** prevede la dissoluzione del farmaco e del copolimero in un solvente organico miscibile con acqua (N,N dimetilformammide, tetraidrofurano o altri); la soluzione ottenuta verrà posta in una membrana da dialisi contro acqua [135]. Il solvente organico è gradualmente sostituito dall'acqua, promuovendo il *self-assembly* degli unimeri e il contemporaneo caricamento del farmaco all'interno delle micelle formate; contemporaneamente, il farmaco non incorporato sarà allontanato dalla dialisi (Figura 14-A). Questo metodo permette una produzione di micelle polimeriche soltanto su piccola scala; un altro svantaggio è rappresentato dalla incompleta rimozione del farmaco non

incorporato, che tuttavia potrebbe essere superato dall'impiego del *tangential flow filtration* (TFF) [136].

Un altro metodo è la preparazione di un'**emulsione olio in acqua**: il farmaco è dissolto in un solvente organico immiscibile con l'acqua (cloroformio o diclorometano), e successivamente questa fase organica è aggiunta alla fase acquosa sotto vigorosa agitazione. Il polimero potrebbe essere disperso nella fase acquosa o nella fase organica; il solvente organico viene successivamente rimosso grazie all'evaporazione mediante rotovapor (Figura 14-B) [137].

Secondo il metodo dell'**evaporazione del solvente**, il farmaco e il polimero sono solubilizzati in un solvente organico volatile; questo è allontanato mediante rotovapor al fine di ottenere un sottile film di farmaco-polimero al fondo del pallone di preparazione. Il film sarà successivamente ricostituito aggiungendo la fase acquosa sotto vigorosa agitazione (Figura 14-C). Questo metodo può essere utilizzato per le micelle polimeriche preparate con copolimeri a blocchi caratterizzati in particolar modo da alti valori di HLB, così che si abbia un'opportuna affinità con il solvente polare e il film polimerico si possa ricostituire facilmente in acqua [138]. Shi e collaboratori hanno sintetizzato un copolimero a blocchi partendo dal chitosano (CH) e dal metossipoli(etilenglicole)-poli(ϵ -caprolattone) (MPEG-PCL), allo scopo di preparare micelle polimeriche con uno *shell* cationico. Ricordiamo infatti che il chitosano è un policatione, e pertanto i nanosistemi a base di questo polimero sono potenzialmente in grado di interagire elettrostaticamente con la mucosa oculare e favorire l'interazione del farmaco con gli epitelii corneale e congiuntivale [139]. Le micelle siglate MPEG-PCL-CH hanno dimostrato avere un profilo di rilascio *in vitro* del diclofenac incorporato analogo a quello del farmaco libero in soluzione. Il vantaggio è costituito dall'effetto di *penetration enhancer* non solo *in vitro* ma anche *in vivo*: è stato dimostrato che la biodisponibilità del diclofenac nell'umor acqueo dei conigli è 2-3 volte maggiore rispetto a quella ottenuta con una soluzione commerciale [140]. Un altro esempio di micelle polimeriche preparate con questa tecnica è rappresentato dallo studio di Vaishya e collaboratori. Le micelle preparate a partire dal copolimero a blocchi siglato mPEG-PCL (metossipolietilenglicole-poli- ϵ -caprolattone) sono in grado di aumentare la permeazione trans-sclerale del desametasone in esperimenti *ex vivo* su occhi di conigli [141]. Di Prima e collaboratori hanno dimostrato la capacità delle micelle polimeriche di INU-EDA-RA (inulina funzionalizzata con etilendiammina e acido retinoico) di incorporare efficientemente diversi corticosteroidi mediante la tecnica dell'evaporazione del solvente. Gli studi *in vitro* hanno dimostrato l'efficacia di questi

nanosistemi di interagire stabilmente con le mucine costitutive della mucosa oculare, e soprattutto di agire come *penetration enhancer* su cellule dell'epitelio corneale [142].

Il **metodo dell'evaporazione del co-solvente** prevede generalmente l'iniziale solubilizzazione del farmaco e del polimero in un solvente organico polare miscibile con l'acqua (co-solvente), seguita dall'aggiunta della fase acquosa. Il co-solvente organico verrà allontanato per evaporazione; in questo modo si verifica la formazione delle micelle polimeriche contenenti il farmaco (Figura 14-D) [143], [144]. Sheardown e collaboratori hanno sviluppato una serie di micelle polimeriche, partendo da diversi copolimeri a blocchi di acido poli-D,L-lattico (PLA) e acido metacrilico (MAA), e con proprietà mucoadesive, ottenute utilizzando l'acido fenilboronico (PBA, *phenylboronic acid*). Le micelle cariche di ciclosporina A hanno mostrato un profilo di rilascio del farmaco caratterizzato da un'iniziale rapido rilascio (40% in 24 ore) seguito da un rilascio non lineare in circa 14 giorni (70-80%). Rispetto al chitosano, queste micelle con il PBA hanno mostrato un eccellente profilo di mucoadesione *in vitro* suggerendo il loro potenziale impiego nell'aumentare la biodisponibilità oculare [145]. Li e collaboratori hanno dimostrato l'efficacia oculare delle micelle polimeriche a base del copolimero PEG-PCL-g-PEI (polietilenglicole-poli- ϵ -caprolattone-g-polietilenimina) sia *in vitro* che *in vivo*. Le micelle cariche positivamente hanno mostrato un effetto di *permeation enhancer* corneale prolungando il tempo di residenza sulla superficie oculare e di interazione con le membrane cellulari cariche negativamente. Inoltre *in vivo* è stato dimostrato che le micelle oltrepassano la barriera epiteliale e rilasciano il farmaco incorporato nello stroma. La presenza del PEG nello *shell* esterno probabilmente aumenta la stabilità della formulazione e migliora la solubilità delle micelle sia nelle componenti polari che apolari della barriera corneale [122].

Infine, il **metodo del freeze-drying** prevede la dissoluzione del polimero e del farmaco in *terz*-butanolo. La soluzione di farmaco/polimero è successivamente miscelata con l'acqua, quindi si procede con il *freeze-drying* al fine di ottenere una massa omogenea di polimero e farmaco che sarà idratata per indurre la formazione delle micelle polimeriche (Figura 14-E). Questo metodo consente una produzione su larga scala, ma è applicabile solo ai copolimeri ed ai farmaci solubili in *terz*-butanolo.

Le micelle polimeriche cariche di farmaco dovranno essere in grado di rilasciare opportunamente il farmaco dal core micellare. Questo processo dipende maggiormente da fattori come: le proprietà chimico-fisiche del farmaco, la localizzazione del farmaco

all'interno della micella, la struttura del polimero e del farmaco, e dal metodo usato per la produzione del nanosistema. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto in particolare, possiamo distinguere tre meccanismi differenti. La micella polimerica costituita da un coniugato polimero-farmaco è caratterizzata da un rilascio del farmaco che può seguire due meccanismi: la dissociazione delle micelle seguita dal clivaggio/rottura del legame chimico del farmaco dall'unimero, o il clivaggio del farmaco dentro il core micellare seguito dalla sua diffusione fuori dal carrier. Nel caso dei complessi ionici, il rilascio del farmaco è guidato da un processo di scambio ionico nei fluidi fisiologici. Per i carrier micellari, il farmaco diffonde semplicemente dal core idrofobico.

A parte questo meccanismo di base, un rilascio di farmaco istantaneo, sostenuto, intermittente o ritardato può essere ottenuto modificando la struttura chimica dei derivati anfifilici che formano le micelle, che determina ovviamente la variazione delle proprietà chimico-fisiche della struttura *core-shell*. Per esempio, un rilascio sostenuto o ritardato del farmaco può essere ottenuto aumentando la lipofilia e la rigidità del core micellare; così facendo la diffusione all'interno delle micelle dell'acqua e degli ioni liberi in soluzione è limitata, soprattutto nel caso di sistemi micellari coniugati e a complesso ionico [146,147]. Una diminuzione della velocità di dissociazione micellare, della diffusione del farmaco e soprattutto del rilascio del farmaco dal core micellare può essere anche ottenuta tramite il *crosslinking* delle catene idrofobiche con induzione di forti interazioni idrofobiche o legami ad idrogeno tra le componenti del core e le molecole di farmaco [146]. La funzionalizzazione del core idrofobico con gruppi idrofili o stimolo-responsivi può essere utilizzata per ottenere un rilascio istantaneo o pulsato del farmaco [148].

La particolare struttura *core-shell* rende le micelle dei carrier ideali per farmaci scarsamente solubili in acqua che, come è ben noto, sono caratterizzati da una scarsa biodisponibilità, una rapida clearance dopo somministrazione, una bassa efficacia terapeutica e un'alta tossicità [149]. La solubilità del farmaco potrebbe essere enormemente migliorata grazie allo *shell* idrofilo delle micelle; inoltre grazie alle dimensioni del carrier, le molecole di farmaco potrebbero raggiungere direttamente il tessuto target, così come il targeting tissutale e l'*uptake* cellulare potrebbero essere migliorati mediante l'impiego di biomolecole segnale [150].

Ad oggi, numerosi *drug delivery systems* micellari sono stati sviluppati e per alcuni di questi già sono noti dei risultati clinici preliminari. Risultati clinici preliminari hanno suggerito che le micelle dovrebbero essere progettate e realizzate con specifici materiali selezionati. Idealmente, le micelle dovrebbero essere biodegradabili e avere un'elevata

stabilità, biocompatibilità e bassa immunogenicità. I polisaccaridi naturali soddisfano questi requisiti e possono essere facilmente modificati chimicamente; inoltre sono dei materiali bioattivi e possono essere utilizzati per aumentare l'efficacia terapeutica dei farmaci veicolati e/o aumentare la capacità targeting del sistema carrier [151].

I polisaccaridi sono una classe variegata di materiali polimerici di origine naturale formati da legami glicosidici tra le unità monosaccaridiche e con una struttura lineare e/o ramificata [152]. Sono caratterizzati da gruppi ossidrilici, amminici e carbossilici, disponibili per la funzionalizzazione chimica [153].

Rispetto a molti polimeri sintetici, i polisaccaridi hanno dei livelli di tossicità molto bassi. Inoltre considerando la loro presenza all'interno dell'organismo umano, molti polisaccaridi sono soggetti a processi di degradazione enzimatica ad opera di diversi enzimi endogeni. Ad esempio, le ialuronidasi sono una classe specifica di enzimi che idrolizzano il legame β -1,4 tra l'acido-D-glucuronico e l'N-acetilglucosammina, le componenti del dimero costitutivo dell'acido ialuronico (HA).

Molti polisaccaridi possiedono un'innata bioattività, e in particolare delle proprietà antimicrobiche, anti-infiammatorie e mucoadesive. Ad esempio, l'azione antimicrobica del chitosano probabilmente è dovuta alle forti interazioni delle ammine protonate con le cariche negative delle pareti cellulari batteriche [154]. L'eparina invece è caratterizzata da un'attività anti-infiammatoria, probabilmente dovuta alla presenza di forti cariche negative con cui è in grado di interagire con una vasta gamma di proteine, tra le quali le proteine del sistema del complemento [155]. Per quanto riguarda le proprietà mucoadesive invece ricordiamo la capacità del chitosano (carico positivamente) di interagire con le mucine (cariche negativamente). Tuttavia anche i polisaccaridi neutri o carichi negativamente (come l'acido ialuronico) sono in grado di interagire con le mucine instaurando legami ad idrogeno mediante i gruppi ossidrilici e carbossilici che li caratterizzano [156].

I vantaggi che si riscontrano nell'utilizzo delle micelle polimeriche sono molteplici; innanzitutto le metodiche di preparazione risultano essere semplici e quasi sempre riproducibili. Le micelle polimeriche consentono di veicolare farmaci antitumorali sfruttando il fatto che sono caratterizzate da piccole dimensioni, da un'elevata capacità di solubilizzazione e da una buona stabilità *in vivo*. Inoltre esse fungono da targeting passivi per l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) e da targeting attivi grazie alla funzionalizzazione con specifici ligandi, e prolungano il tempo di circolazione del farmaco. Come già riportato, le micelle polimeriche permettono di incorporare nel core idrofobico principi attivi poco solubili nei fluidi biologici, veicolandoli e proteggendoli da

alterazioni chimiche e/o enzimatiche [157]. Molecole polari invece, potrebbero essere adsorbite sulla superficie delle micelle. Come la maggior parte dei veicoli colloidali, le micelle polimeriche sono in grado di aumentare la biodisponibilità e il tempo di permanenza dei farmaci nella circolazione sistemica, aumentando la possibilità che i principi attivi si possano accumulare nel sito bersaglio e contribuendo alla riduzione degli effetti collaterali tossici. Pertanto, le micelle polimeriche hanno mostrato un potenziale nell'aumentare la solubilità e l'efficacia terapeutica dei farmaci idrofobici.

Le formulazioni acquose di micelle polimeriche cariche di farmaco sono dei sistemi innovativi di *ocular drug delivery* in grado potenzialmente di migliorare la permeazione e di aumentare il tempo di residenza della formulazione sulla superficie oculare, migliorando quindi l'assorbimento del farmaco attraverso le barriere oculari [158]. Le piccole dimensioni e la natura esterna idrofila delle micelle potrebbero efficacemente permettere il superamento della barriera corneale, migliorando il tempo di residenza *in situ* delle molecole di farmaco, e producendo un effetto terapeutico sia nel segmento anteriore sia in quello posteriore dell'occhio. Tuttavia, dopo somministrazione oculare topica, le micelle entrano a contatto con il fluido lacrimale andando incontro inevitabilmente ad un processo di diluizione ed eliminazione mediata dal drenaggio naso-lacrimale. Per prolungare il tempo di residenza *in situ* e limitare la perdita pre-corneale, le micelle polimeriche dovrebbero entrare intimamente in contatto con lo strato mucoso. Le micelle polimeriche con uno *shell* idrofilo cationico possono aumentare l'interazione con le mucine cariche negativamente sulla superficie corneale, migliorando così la ritenzione pre-corneale. Gupta e collaboratori hanno preparato delle micelle polimeriche cariche di ketorolac e con uno *shell* mucoadesivo di acido poliacrilico. Studi *in vivo* su modello oculare di coniglio hanno confermato un'attività antiinfiammatoria spiccata con una maggiore durata d'azione, in confronto con una sospensione di farmaco libero [159].

Pertanto, la progettazione di nanosistemi micellari mucoadesivi potrebbe potenzialmente prolungare il contatto tra la formulazione e la cornea e/o la congiuntiva [160]. Nell'ambito dei *drug delivery systems*, il termine bioadesione implica l'adesione del sistema carrier ad un tessuto biologico specifico. Nel caso in cui l'adesione coinvolge lo strato mucoso, il fenomeno di interazione è indicato come mucoadesione [161]. La mucoadesione è un fenomeno complesso, regolato da diverse tipologie di interazioni; pertanto sono state suggerite differenti teorie che nel complesso permettono di comprendere i diversi aspetti della mucoadesione [162,163]. Peppas e Huang hanno studiato il fenomeno della mucoadesione su nanoscala, in modo da comprendere i fenomeni che coinvolgono le forme

di dosaggio liquide contenenti i nanosistemi quando posti su una mucosa: i legami ad idrogeno, le interazioni elettrostatiche, le interazioni idrofobiche e l'inter-diffusione delle catene polimeriche sono i fenomeni caratteristici [164]; inoltre, possono essere utilizzati dei materiali polimerici con gruppi tiolici liberi per l'interazione chimica con residui cisteinici delle mucine [165]. I *drug delivery systems* mucoadesivi sono potenzialmente in grado di prolungare il tempo di residenza del farmaco *in situ* dopo somministrazione in modo tale da ridurre la frequenza delle somministrazioni, e di intensificare il contatto con la sottostante barriera epiteliale per facilitare l'assorbimento dei farmaci attraverso l'epitelio stesso. L'intimo contatto del *drug delivery system* con la mucosa dovrebbe determinare la formazione di un elevato gradiente di concentrazione del farmaco in grado di incrementare la quota di principio attivo assorbito (Figura 15) [166].

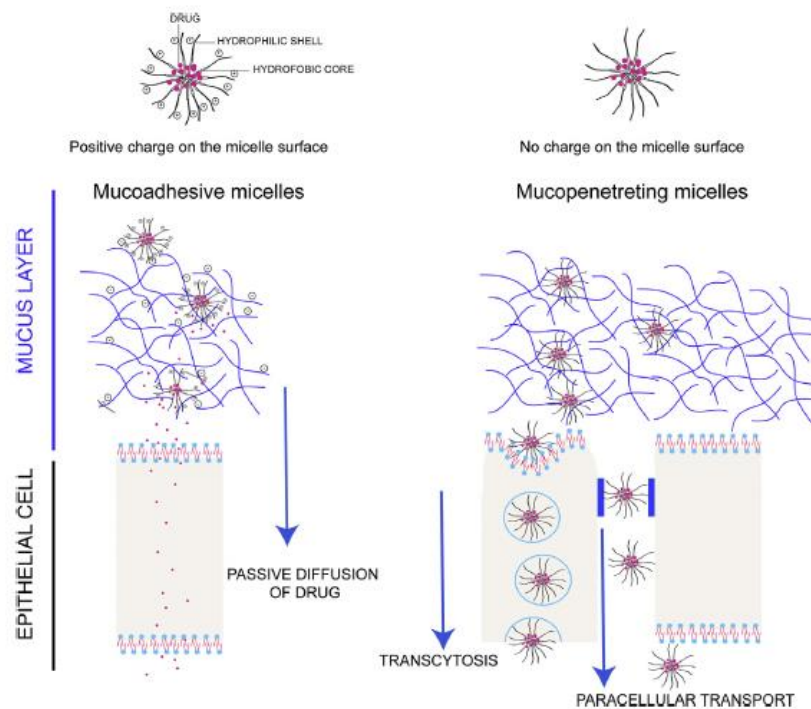


Figura 15. Schematizzazione della complessa interazione tra la struttura dinamica delle micelle polimeriche e l'ambiente pre-epiteliale ed epiteliale [158]

1.3.2 Le Nanoparticelle Polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono particelle colloidali con un diametro compreso tra 10 e 1000 nm [167]. Negli ultimi decenni questi nanocarriers sono stati ampiamente studiati come *ocular drug delivery systems* allo scopo di aumentare la biodisponibilità dei farmaci dopo somministrazione [168]. Tra i diversi materiali utilizzati ricordiamo i polimeri di sintesi e naturali, come poliacrilamide, poliacrilato, poli-alchil-cianoacrilati, poli-ε-

caprolattone, polivinilacol, polimetilmetacrilato, gelatina, chitosano, albumina, acido ialuronico e tanti altri [169]. Tra questi, il PLA e il PLGA sono stati impiegati per l'applicazione oculare in quanto approvati dall'FDA per la loro biodegradabilità, biocompatibilità e non immunogenicità [170]. L'efficacia delle nanoparticelle polimeriche è essenzialmente influenzata dalle dimensioni e dalle proprietà di superficie; queste possono essere modulate variando le metodiche di produzione [171,172]. Innanzitutto, al variare della tecnica possono essere ottenute delle nanosfere o delle nanocapsule: le nanosfere hanno una struttura matriciale in cui il farmaco è uniformemente distribuito, mentre le nanocapsule sono delle particelle *core-shell* con una cavità acquosa o lipofila in cui è presente il farmaco. Inoltre, modulando la velocità di degradazione del polimero è possibile modulare il rilascio del farmaco; pertanto è fondamentale valutare la biocompatibilità e la biodegradabilità dei polimeri, sia che essi siano naturali che di sintesi. Per la preparazione delle nanoparticelle polimeriche sono state messe a punto diverse strategie [173]. La scelta di una metodica è determinata dalla tipologia di polimero, dalle proprietà chimicofisiche del farmaco, e dalle proprietà finali del sistema carrier che si vorrebbe ottenere[174]. Tutti i metodi hanno in comune uno step in cui il polimero precipita, solitamente per aggiunta di un non-solvente o per diminuzione della sua solubilità; si ottiene così una sospensione di nanoparticelle in cui la stabilità chimica e fisica è molto spesso ridotta. Per aumentare la stabilità a lungo termine, facilitarne il trattamento e lo stoccaggio, la sospensione nanoparticellare viene processata mediante *freeze-drying*, talvolta in presenza di crioprotettori per minimizzare i danni [175]. La purificazione post-produzione è un altro step critico per il controllo della qualità e delle caratteristiche del carrier, e quindi per la sua idoneità per le applicazioni biomediche; devono essere opportunamente allontanate le impurezze tossiche presenti in sospensione e/o adsorbite sulla superficie delle nanoparticelle, quali residui di solvente organico, sali, particelle aggregate e reagenti residui, mediante processi di filtrazione, centrifugazione o dialisi.

Le diverse tecniche di produzione possono essere classificate in due grandi gruppi, a seconda se si verifica la polimerizzazione di monomeri o la nanoaggregazione di macromolecole polimeriche preformate [173]. Inoltre possono essere classificate in due categorie: le procedure two-step, con la preparazione di un'emulsione seguita dalla formazione di nanoparticelle, e le procedure one-step, con formazione diretta delle nanoparticelle. Per quanto riguarda i metodi di polimerizzazione, i monomeri polimerizzano formando la nanostruttura e incapsulando le molecole bioattive;

polimerizzazione in emulsione o una polimerizzazione interfacciale [172]. Sono stati riscontrati diversi inconvenienti con l'impiego di questi metodi: i monomeri hanno una lenta cinetica di biodegradazione o talvolta non sono biodegradabili, e residui di monomeri e iniziatori possono persistere anche dopo un'accurata purificazione.

La formazione di nanoparticelle da polimeri preformati risulta essere molto più conveniente e meno problematica. I metodi *two-step emulsification/solvent removal* sono dei metodi sia a bassa che ad alta energia, caratterizzati dall'iniziale formazione di nanodroplets e successivamente di nanoparticelle. Il primo step è fondamentale poiché determina la dimensione e la distribuzione dimensionale delle risultanti nanoparticelle; queste si formeranno per rimozione del solvente organico tramite evaporazione, rapida diffusione dopo diluzione o per salting-out. In questi processi, il farmaco è generalmente aggiunto alla soluzione polimerica. Il metodo *emulsification/solvent evaporation* è stato il primo processo messo a punto per la preparazione di nanoparticelle polimeriche [176]. Il polimero è solubilizzato in un solvente organico (diclorometano, cloroformio, etile acetato), e la soluzione ottenuta è emulsionata con una fase acquosa in presenza di tensioattivi: è indotta la formazione delle nanodroplets usando un omogeneizzatore ad alta velocità o un ultra-sonicatore. Una sospensione di nanoparticelle si ottiene facendo evaporare il solvente, che quindi sarà costretto a lasciare le *nanodroplets* e ad attraversare la fase acquosa dell'emulsione [177]. L'evaporazione è condotta a temperatura ambiente con un'agitazione magnetica continua, oppure a pressione ridotta mediante rotovapor. Le nanoparticelle formate vengono opportunamente purificate e conservate [175]. Variando i parametri sperimentali è possibile ottenere nanocarrier con caratteristiche differenti. Barba e collaboratori hanno messo a punto una tecnica di preparazione basata su un'emulsione multipla, utilizzando diversi poliesteri come PCL, PLA, poli(D,L-lattato-co-caprolattone) 70/30 (PDLA-PLC), e il poli(metilmacrilato-acido acrilico) 73/27 (polyMMA-AA), e diverse biomolecole modello. È stato dimostrato che le nanoparticelle a base di poliestere sono caratterizzate da una forma sferica e da una superficie liscia, mentre con i metacrilati era possibile ottenere microparticelle altamente porose ma con scarsa efficacia di caricamento [178]. Cavallaro e collaboratori hanno sfruttato la tecnica dell'evaporazione del solvente da un'emulsione multipla per preparare nanoparticelle a base di α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartamide-acido polilattico (PHEA-PLA) per modulare il rilascio di molecole idrofobiche. Grazie all'ottimizzazione dei parametri di produzione, è stata ottenuta un'efficienza di caricamento dell' α -tocoferolo (molecola modello) pari al 100%;

inoltre grazie alla presenza del PHEA è stato possibile ottenere un rilascio del farmaco prolungato/modulato nel tempo [179].

Il metodo *emulsification/solvent diffusion* è stato introdotto da Leroux [180]; consiste nella formazione di una convenzionale emulsione O/W utilizzando un solvente organico parzialmente miscibile con l'acqua e in grado di solubilizzare il polimero e il farmaco, e una fase acquosa contenente i tensioattivi. I solventi dovranno essere reciprocamente saturi a temperatura ambiente per garantire l'equilibrio termodinamico iniziale di entrambi i liquidi; la successiva diluizione con acqua induce la diffusione del solvente organico con formazione delle particelle colloidali. Il processo di diffusione è più lento rispetto all'evaporazione del solvente organico; la dimensione delle nanodroplets diminuirà improvvisamente durante la diffusione del solvente [181]. Questa tecnica permette generalmente di produrre nanosfere, mentre le nanocapsule possono essere ottenute solo aggiungendo una piccola quantità di olio nella fase organica; il diametro finale delle nanocapsule è influenzato dalla concentrazione di olio, dal rapporto volumetrico tra le due fasi dell'emulsione e dalla concentrazione dei tensioattivi [182]. Questa metodica è inoltre caratterizzata da vantaggi come alte rese, facile scale-up, non necessita di processi ad alta energia, garantisce un'alta riproducibilità e generalmente un'ottimale efficienza di caricamento [183]. Tuttavia grandi volumi di acqua devono essere eliminati dalla sospensione nanoparticellare, ed è elevato il rischio che molecole di farmaci idrofili siano perduti nella fase esterna durante il processo di emulsione.

Il metodo *emulsification-solvent diffusion* descritto può essere considerato uno dei metodi di *emulsification/reverse salting-out* [184]. In questo caso l'emulsione sarà composta da un solvente organico miscibile con l'acqua (ad esempio acetone), mentre la fase acquosa esterna conterrà degli agenti di salting-out di natura elettrolita (cloruro di magnesio, cloruro di calcio o magnesio acetato) o glucidica (saccarosio), e tensioattivi. L'emulsione si formerà spontaneamente grazie senza la necessità di impiegare alti sforzi di taglio ed alte energie [185]. La miscibilità delle due fasi è ridotta dalla saturazione della fase acquosa che permetterà la formazione di un'emulsione O/W; un effetto di *reverse salting-out* può essere ottenuto diluendo l'emulsione O/W formata con un eccesso di acqua per promuovere la diffusione dell'acetone dalla fase interna a quella esterna, promuovendo quindi la precipitazione del polimero in nanodroplets. Il restante solvente organico e gli agenti di *salting-out* verranno eliminati mediante filtrazione a flusso incrociato [186]. La condizione di completa miscibilità tra le due fasi non è essenziale, ma senz'altro facilita il processo: infatti se non ci fosse questa condizione iniziale, dovrebbe essere usata

un'elevata quantità di acqua per indurre la formazione delle nanoparticelle [184]. Il principale vantaggio del metodo di *salting-out* è l'assenza dei solventi clorurati; tuttavia questa tecnica è applicabile alla veicolazione di biomolecole lipofile, e necessita di drastiche fasi di purificazione per allontanare i sali.

Per quanto riguarda i processi one-step, le principali tecniche da ricordare sono il metodo della dialisi, la tecnologia dei fluidi supercritici e la nanoprecipitazione. Il **metodo della dialisi** è ampiamente utilizzato con successo per la preparazione di nanoparticelle polimeriche con una distribuzione dimensionale ridotta [187]. Le membrane da dialisi con un opportuno cut-off di peso molecolare (MWCO, *molecular weight cut-off*) sono usate come barriere fisiche nei confronti del polimero; questo è disciolto in un solvente organico, posto all'interno della membrana da dialisi, quindi dializzato contro un non-solvente (ovviamente i due solventi dovranno essere miscibili tra loro) [172]. Gradualmente il "non-solvente" per il polimero diffonde all'interno della membrana miscelandosi con il "buon solvente": un incremento della tensione interfacciale induce l'aggregazione del polimero con formazione della sospensione colloidale di nanoparticelle. La morfologia e la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle possono essere modulate dalla coppia solvente/non-solvente, dal MWCO della membrana da dialisi, dalla concentrazione polimerica e dalla velocità di miscelazione tra i solventi [188]. Sebbene questo metodo sia semplice e comune, il grande e dispendioso volume di solventi da utilizzare e le tempistiche utilizzate potrebbero causare un prematuro rilascio del farmaco dai carrier.

La **tecnologia dei fluidi supercritici** è emersa come strategia alternativa di preparazione di sistemi di drug delivery micro- e nanometrici; è una tecnologia con un basso profilo di tossicità, un'elevata riproducibilità e scale-up, un buon controllo dell'omogeneità strutturale [189]. Prevede l'impiego di un fluido supercritico, ovvero un solvente che al di sopra delle sue condizioni critiche di temperatura e pressione presenta delle proprietà chimico-fisiche intermedie tra un gas (ad esempio come viscosità) ed un liquido (ad esempio come densità). La CO₂ supercritica (scCO₂) è ampiamente utilizzata grazie ai suoi parametri critici di temperatura e pressione moderati (31.1 °C, 73.8 bar); inoltre è facilmente reperibile, economica, non infiammabile, non tossica ed innocua per l'ambiente [190]. C'è una vasta letteratura sulla produzione di microparticelle contenenti farmaci mediante questa tecnica, rispetto a quella relativa alle nanoparticelle. Tuttavia, l'impiego di questa metodica richiede un elevato investimento economico per il sistema ad alta pressione, ed è fortemente limitato a causa della ridotta varietà di fluidi supercritici,

considerano il fatto che molti polimeri mostrano per essi una scarsa solubilità o una completa insolubilità [174].

Tra tutti i processi di preparazione *one-step* delle nanoparticelle, il più comune è senz'altro il **metodo della nanoprecipitazione**, messo a punto da Fessi e collaboratori [191]. Il polimero è disciolto in un solvente organico miscibile con l'acqua, con una polarità intermedia; a questa soluzione è aggiunta la soluzione acquosa direttamente, a vari step, goccia a goccia o con una velocità controllata [192]. Le nanoparticelle si formeranno istantaneamente grazie alla diffusione spontanea e veloce della soluzione polimerica nella fase acquosa; questo processo sembra essere governato dall'effetto Gibbs-Marangoni per cui al diminuire della tensione interfacciale tra le due fasi aumenta l'area superficiale grazie alla rapida diffusione con formazione di piccole gocce di solvente organico [193]. Il solvente organico quindi diffonderà dall'interno delle gocce verso la fase acquosa, e il polimero coacerverà formando nanocapsule o nanosfere. Il solvente organico comunemente usato è l'acetone poiché è miscibile con l'acqua e facilmente rimovibile mediante evaporazione. Anche l'etanolo e miscele binarie (acetone e acqua, etanolo o metanolo) possono essere utilizzate, così come possono essere utilizzate due fasi acquose o due fasi organiche [192,194]. Le nanoparticelle ottenute sono solitamente caratterizzate da una dimensione e una distribuzione dimensionale ben definita. Inoltre modificando attentamente la natura e la concentrazione delle componenti, il rapporto tra le due fasi, la velocità di miscelazione e di agitazione, è possibile controllare le proprietà chimicofisiche dei sistemi carrier. L'ottimizzazione del processo di nanoprecipitazione permette di migliorare la produzione e soprattutto il caricamento di farmaci.

Le **piattaforme microfluidiche** potrebbero costituire delle valide e promettenti alternative per la produzione controllata di nanoparticelle polimeriche mediante processo di nanoprecipitazione, in quanto il flusso idrodinamico assicura una rapida e completa miscelazione del solvente e non-solvente all'interno dei microcanali microfluidici [195,196]. Nel corso degli ultimi decenni le **tecnologie lab-on-a-chip (LOC)** hanno portato a considerevoli progressi nello sviluppo di microsistemi per applicazioni chimiche, biologiche e mediche, per la produzione di nanoparticelle, sistemi fibrillari, microparticelle, e per l'esecuzione di processi di polimerizzazione, sintesi organiche, saggi analitici e tanto altro [197]. Si basano essenzialmente su un processo di micromiscelazione e sull'impiego di micromixer, ovvero sistemi miniaturizzati all'interno dei quali è favorito l'intimo contatto tra le molecole reagenti per consentire lo svolgimento del processo preposto. Il processo di micromiscelazione è governato dalle stesse leggi che regolano il

flusso di un fluido su macroscale. Sebbene i dispositivi microfluidici non siano una mera versione miniaturizzata delle loro controparti su macroscale poiché molte caratteristiche fisiche non decrescono linearmente (rapporto area superficiale/volume, tensione superficiale, diffusione), la miniaturizzazione conferisce caratteristiche peculiari che possono essere sfruttate per eseguire processi che sarebbero difficoltosi o addirittura impossibili realizzare su macroscale.

I processi microfluidici sono caratterizzati da una costante presenza di condizioni di flusso laminare. Come è noto, il flusso di un fluido è generalmente distinto in laminare (caratterizzato da un moto regolare e costante del fluido) e turbolento (caratterizzato da vortici e fluttuazioni del flusso). Fisicamente i due regimi differiscono in termini di forze viscosive ed inerziali; il numero di Reynold (Re) permette di valutare se il flusso di scorrimento di un fluido è di regime laminare ($Re < 2000$) o turbolento ($Re > 4000$). Per i sistemi microfluidici, il valore di Re è tipicamente più piccolo di 100, pertanto il flusso è considerato essenzialmente laminare. Questa caratteristica ha una diretta conseguenza sulla miscelazione all'interno dei dispositivi microfluidici poiché in un ambiente in cui il flusso è restrittivamente lineare, la miscelazione è largamente dominata dall'avvezione e dalla diffusione molecolare passiva. Inoltre, la distanza di diffusione può essere estremamente piccola, pertanto una diminuzione nella distanza riduce notevolmente il tempo richiesto per una completa miscelazione dei fluidi focalizzati.

I micromixers sono generalmente progettati con geometrie di canale che riducono il percorso di miscelazione ed aumentano l'area superficiale di contatto. Il piccolo volume interno fornisce l'opportunità di ridurre la quantità di campione richiesto; sono infatti caratterizzati da canali con dimensioni comprese tra 10 e 400 μm e questo consente un aumento nel rapporto area superficiale/volume rispetto ai sistemi su macroscale (10000-50000 $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ contro 100-2000 $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$). Recentemente, lo sviluppo di sistemi microfluidici capaci di generare piccole gocce di liquido in maniera controllata, ha consentito la possibilità di eseguire diverse tipologie di processi chimici e biologici, includendo la sintesi di biomolecole, la realizzazione di *drug delivery systems* e lo svolgimento di test diagnostici.

I micromixers sono generalmente classificati in attivi quando utilizzano una fonte di energia esterna per ottenere la miscelazione, e passivi quando funzionano basandosi esclusivamente sull'energia di pompaggio. Generalmente i micromixers attivi hanno una più alta efficienza di miscelazione; tuttavia l'esigenza di integrare dispositivi periferici come fonte di energia esterna all'interno del micro-dispositivo ed il complesso e costoso

processo di fabbricazione, limitano la realizzazione di tali dispositivi. I micromixer passivi sono stati i primi dispositivi microfluidici riportati in letteratura; spesso comportano una fabbricazione meno costosa e più conveniente, e possono essere facilmente integrati in dispositivi LOC più complessi. La riduzione del tempo di miscelazione è generalmente ottenuta splittando la corrente di fluido attraverso l'uso di laminazione seriale o parallela, focalizzando idrodinamicamente i flussi di miscelazione, introducendo bolle di gas (*slug*) o goccioline di liquido (*droplet*) nel flusso o migliorando l'avvezione caotica mediante l'uso di nervature e scanalature prodotte sulle pareti del canale [198]. La rapidità della miscelazione all'interno di un micromixer rappresenta un valido vantaggio per i processi di nanoprecipitazione [196]. Karnik e collaboratori hanno preparato nanoparticelle di PLGA-PEG mediante tecnica microfluidica, miscelando soluzioni polimeriche in acetonitrile con acqua e usando un micromixer *hydrodynamic flow focusing*. L'autoassemblaggio del copolimero PLGA-PEG durante la nanoprecipitazione avviene in 3 stadi, come è riportato in Figura 16.

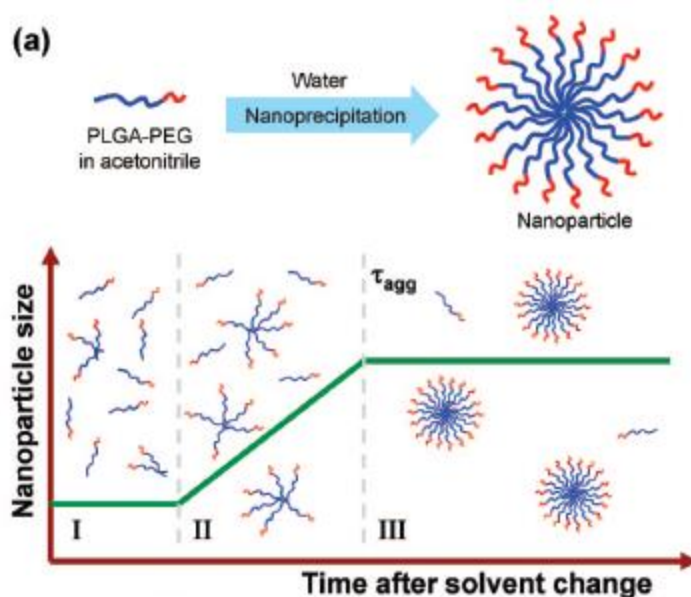


Figura 16. Processo di nanoprecipitazione in tre stadi del copolimero PLGA-PEG: (I) nucleazione delle nanoparticelle, (II) aggregazione e crescita, (III) completamento del processo [196]

Attraverso un processo di diffusione controllata del polimero nel non-solvente, si vengono a formare delle *nanodroplets* che gradualmente aumentano in dimensione. Questo processo continua finché le nanoparticelle diventano sufficientemente grandi, con formazione di uno strato di solvatazione sulla superficie particellare che porta al blocco cinetico della crescita dimensionale delle nanoparticelle. Se la velocità di miscelazione iniziale è lenta, la seconda

fase di aggregazione ritarda a raggiungere la completezza e non si forma la barriera di solvatazione; pertanto l'aggregazione continuerà e si produrranno nanoparticelle più grandi. Invece, se la miscelazione avviene più velocemente ($\tau_{MIX} < \tau_{AGG}$) la dimensione delle nanoparticelle potrebbe diventare indipendente dal tempo di miscelazione e dalla concentrazione polimerica. Il risultato sarà la formazione di nanoparticelle bloccate cinematicamente, con un diametro medio particellare inferiore e una migliore omogeneità rispetto alle particelle preparate mediante miscelazione lenta [196].

In generale, le nanotecnologie e le tecnologie LOC offrono la possibilità di progettare *drug delivery systems* particolarmente adatti alla somministrazione oculare in grado di veicolare un'ampia varietà di farmaci e biomolecole allo scopo di aumentare la solubilità in acqua di un farmaco lipofilo, la stabilità di farmaci suscettibili alla degradazione idrolitica ed enzimatica, l'interazione con l'epitelio corneale e congiuntivale, il tempo di ritenzione e il profilo di rilascio del farmaco all'interno del corpo vitreo [199–201].

Le nanoparticelle composte da matrici polimeriche sono state proposte come sistemi adatti alla somministrazione oculare topica di diverse classi di farmaci a partire dalla metà degli anni '80. Le nanoparticelle costituite da polimeri cationici e bioadesivi hanno mostrato maggior tempo di ritenzione sulla superficie oculare dopo instillazione nel sacco congiuntivale [160,170]. Tahara e collaboratori hanno progettato delle nanoparticelle di PLGA per la somministrazione oculare topica di farmaci ad azione retinica; queste nanoparticelle sono state rivestite con chitosano per ottenere un sistema mucoadesivo. Sebbene si sia ottenuto un miglioramento nell'assorbimento del farmaco grazie all'aumento del tempo di residenza *in situ*, l'assorbimento delle nanoparticelle è apparso limitato a causa delle dimensioni del carrier polimerico (>300nm) [202]. Generalmente, le dimensioni delle nanoparticelle dovrebbero rientrare in un range dimensionale opportuno e inferiore a 300 nm, per ottenere un target retinico. Parallelamente, la somministrazione intravitreale di nanoparticelle di albumina è stata studiata per il trattamento di patologie retiniche. Le proprietà chimico-fisiche di questi carrier hanno rivelato un migliore *uptake* e penetrazione nelle cellule della glia retiniche, oltreché la diffusione nella porzione coroidale pretrattata con il laser [203]. Inoltre, le nanoparticelle di PLGA garantiscono una migliore ritenzione cellulare in quanto riescono a sfuggire dal sistema endolisosomiale, prolungando così l'efficacia terapeutica [204].

Considerando l'importanza della somministrazione intravitreale nel trattamento di patologie a carico del segmento posteriore dell'occhio, sono stati studiati i fattori generali

che influenzano la mobilità delle nanoparticelle nel corpo vitreo dopo iniezione intravitreale. Grazie all'impiego del *multiple particle tracking* e della microscopia a fluorescenza, Xu e collaboratori hanno dimostrato che la diffusione nanoparticellare dipende dalla stabilità colloidale, dalla dimensione, dalla carica superficiale e dalla concentrazione [205]. Generalmente, introducendo molecole di farmaco nell'umor vitreo mediante iniezione intravitreale in forma di soluzione, sospensione o caricate in un sistema carrier, si assiste ad una lenta diffusione dell'agente terapeutico verso il tessuto target e ad un concomitante processo di clearance (che può avvenire attraverso la via anteriore o attraverso la vascolatura retinica) [206]. Sakurai e collaboratori hanno studiato l'effetto delle dimensioni particellari sulla distribuzione intravitreale, preparando delle nanosfere polimeriche (*fluorescent polystyrene*) con un diametro medio pari a 2 μm , 200 nm e 50 nm. Le particelle più piccole di 200 nm sono state osservate nella retina dopo 2 mesi post iniezione, mentre le particelle micrometriche sono state trovate distribuite nell'apparato zonulare di Zinn e nella cavità vitreale. Una considerevole opacità del vitreo è stata osservata nella retina per particelle con diametro di 2 μm , mentre le particelle nanometriche presentano una distribuzione omogenea nel vitreo dopo un mese post iniezione. Probabilmente le particelle micrometriche sono troppo grandi per penetrare nel tessuto retinico [206]. L'effetto della carica superficiale del nanocarrier sulla diffusione intravitreale è stato analizzato da Kim e collaboratori, utilizzando nanoparticelle di albumina sierica umana (HSA) cationiche ed anioniche. Le particelle anioniche della dimensione di 114 nm e un potenziale- ζ di -33.3 mV sono in grado di diffondere facilmente attraverso le fibrille di collagene intravitreali e di raggiungere la retina, 5 ore post iniezione; le particelle cationiche (diametro pari a 175.5 e potenziale- ζ di +11.7 mV) restano bloccate e in forma aggregata nel corpo vitreo [203].

Le nanoparticelle PEGilate e neutre non tendono ad interagire con i componenti del corpo vitreo, e sono in grado di diffondere liberamente se presentano una dimensione inferiore a 500 nm. o se la loro concentrazione supera una certa soglia oltre la quale si manifestano effetti sterici ed idrofobici; le particelle cationiche sono completamente immobili, indipendentemente dalla dimensione o dalla concentrazione, in quanto interagiscono con le fibrille di collagene anioniche del corpo vitreo attraverso interazioni elettrostatiche (Figura 17) [205].

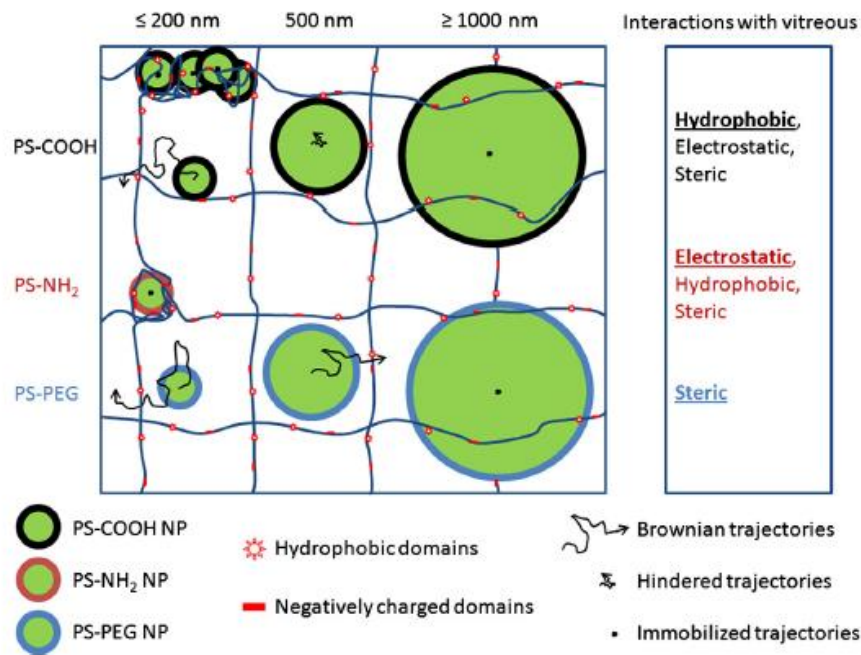


Figura 17. Influenza della carica superficiale, dimensione e concentrazione delle nanoparticelle sulla loro mobilità nel corpo vitreo [PS-COOH NP: *anionic polystyrene nanoparticles*; PS-NH₂ NP: *cationic polystyrene-amine nanoparticles*; PS-PEG NP: *PEGylated polystyrene nanoparticles*] [205]

Una valida strategia per limitare le interazioni elettrostatiche con le componenti vitreali, aumentare la mobilità nel corpo vitreo e migliorare l'interazione con le cellule del tessuto retinico è quella di utilizzare l'acido ialuronico per rivestire o per realizzare i nanocarrier. Koo e collaboratori hanno osservato che le nanoparticelle di HA (*particle size* di 200 nm e potenziale- ζ di -26mV) sono in grado di diffondere attraverso il gel vitreale e di accumularsi nelle regioni più profonde della retina in seguito a somministrazione intravitreale; inoltre queste nanoparticelle sono bioeliminate dal tessuto retinico entro pochi giorni [207].

Un altro approccio di notevole importanza è l'impiego di un targeting attivo allo scopo di indirizzare selettivamente le nanoparticelle alle lesioni neovascolari, ad esempio mediante l'impiego della sequenza peptidica arginina-glicina-aspartato (RGD) sulla superficie esterna delle nanoparticelle. La sequenza RGD è capace di legare diverse integrine (glicoproteine trans-membrana, deputate all'adesione cellulare), tra cui l'isoforma $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$, essenziali per la formazione di nuovi vasi sanguigni ed iper-espresse nello stato angiogenico. In una corioide sana e non proliferante, l'espressione di queste integrine è minima, mentre nel processo di angiogenesi l'iper-espressione è necessaria in quanto conferisce alle cellule endoteliali la capacità di migrare e legarsi alla matrice extracellulare durante il processo di rimodellamento [208]. In uno studio è stato dimostrato che in un occhio sano le nanoparticelle funzionalizzate con l'RGD lineare non sono capaci di

interagire con la vascolatura intatta e quindi non si accumulano significativamente; quando sulla superficie colloidale è presente la sequenza ciclica dell'RGD, le nanoparticelle raggiungono e legano le integrine dei capillari sani [209]. A causa della restrizione conformazionale imposta dalla ciclizzazione, i peptidi RGD ciclici mostrano un'affinità alle integrine di circa 100 volte maggiore rispetto ai loro corrispettivi peptidi lineari; ciò potrebbe causare un'aumentata interazione delle nanoparticelle funzionalizzate con la corioide sana, nonostante il basso livello di espressione delle integrine. In un processo patologico di neoangiogenesi probabilmente il legame tra l'endotelio e nanoparticelle funzionalizzate con ligandi a bassa affinità come l'RGD lineare, è favorito dall'aumentata avidità di legami multivalenti sui vasi. Poiché le nanoparticelle presentano diverse molecole target sulla loro superficie, esse potrebbero avere la capacità di legare diversi recettori simultaneamente; l'affinità di un ligando per il recettore non cambia ma la maggior espressione dei recettori porta ad interazioni multiple nanoparticella-recettore, ad una maggiore avidità di interazione e di conseguenza ad una più forte associazione (Figura 18).

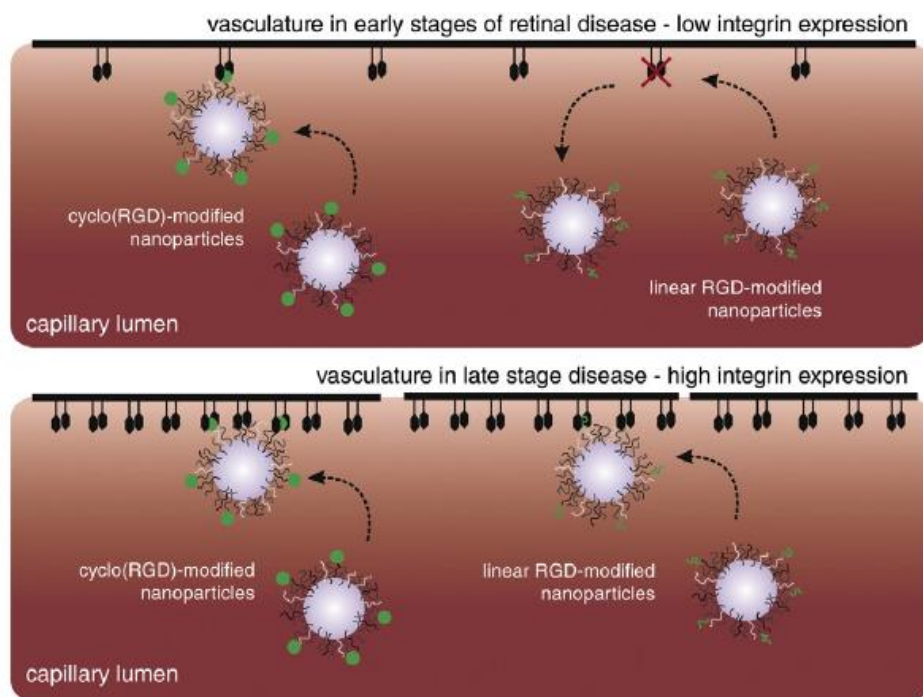


Figura 18. Interazione tra le nanoparticelle funzionalizzate con l'RGD ciclico e le integrine espresse nella vascolatura oculare [27]

Infine è necessario ricordare che i peptidi RGD ciclici hanno anche un'attività intrinseca antiangiogenica: grazie alla loro capacità di legare e antagonizzare le integrine, mostrano un potente effetto inibitorio sulla neovascolarizzazione corioideale e retinica, oltreché un

effetto positivo sul rimodellamento fibrovascolare durante la progressione della malattia neovascolare dell'occhio [210].

1.4 L'acido ialuronico

L'acido ialuronico (HA) è un biopolimero ampiamente utilizzato in ambito oftalmico per la formulazione di diversi *ocular DDS*; per la preparazione di questi sistemi può essere utilizzato l'HA estratto da diversi tessuti animali, come la cresta del gallo, oppure l'HA di origine biofermentativa [211]. L'acido ialuronico è un polisaccaride a struttura lineare costituito da unità ripetitive di N-acetil-D-glucosamina e acido D-glucuronico, e caratterizzato da legami glicosidici β 1-3 e β 1-4. Il valore di pKa dei gruppi carbossilici è pari a 3-4, pertanto questi gruppi nell'ambiente fisiologico a pH 7.4 sono prevalentemente in forma ionizzata conferendo una carica negativa al polimero; i gruppi carbossilato si presentano naturalmente in forma di sale sodico (Figura 19).

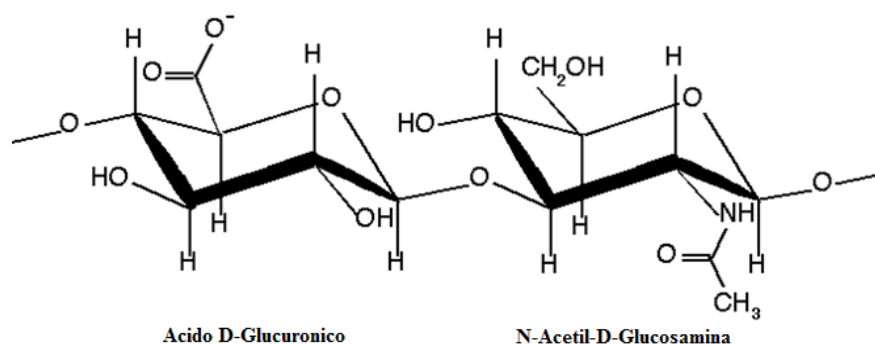


Figura 19. Struttura chimica del dimero costitutivo dell'acido ialuronico

L'HA è caratterizzato da un elevato peso molecolare compreso tra 20 kDa e 4000 kDa circa [212]. Le catene di HA ad alto peso molecolare (HA_{HMW}) assumono in soluzione acquosa una conformazione *random-coil*, per interazione con le molecole d'acqua mediante legami ad idrogeno; grazie a questa particolare conformazione e soprattutto all'elevato peso molecolare, l' HA_{HMW} è in grado di assorbire acqua ed aumentare il suo volume 1000 volte di più rispetto a quello iniziale formando un gel elastico e viscoso con un elevato volume idrodinamico [213].

L'HA è costitutivamente presente nell'organismo umano. È sintetizzato da tre diverse sintasi ialuroniche trans-membrana (HAS1, HAS2 e HAS3) e secreto poi nella matrice extracellulare (ECM); la sua degradazione avviene invece ad opera delle ialuronidasi (HYALs). È uno dei componenti principali della matrice extra-cellulare dei tessuti

connettivi nonché del corpo vitreo oculare; influenza la proliferazione e la migrazione cellulare, ed è coinvolto nella modulazione di diversi segnali intracellulari [214]. Diversi recettori sono coinvolti in queste funzioni intracellulari, tra cui il gruppo delle proteine CD44, il recettore endoteliale dei vasi linfatici LYVE-1, il recettore per la motilità mediata dal ialuronato RHAMM, e il recettore per l'endocitosi HARE [212]. In particolare, il CD44 è responsabile dell'interazione tra l'HA e la superficie di specifiche cellule, nel processo di adesione cellulare (aggregazione e migrazione), nella proliferazione cellulare, nella risposta infiammatoria, nell'angiogenesi e nella riparazione dei tessuti. Inoltre, è particolarmente iper-espresso in diversi tipi di tumori, nella isoforma CD44v6. Il peso molecolare dell'acido ialuronico è strettamente in relazione con le sue proprietà chimico-fisiche (come già descritto precedentemente) e biologiche. Generalmente l'HA natio ad alto peso molecolare (HA_{HMW} con MW da 2000 a 1000 kDa) è presente nella matrice extra-cellulare con un'azione anti-infiammatoria e un effetto anti-angiogenico, mentre per valori bassi in peso molecolare (<5 kDa) vi è un coinvolgimento nei processi infiammatori [215]. D'Agostino e collaboratori hanno condotto uno studio comparativo su diversi frammenti di acido ialuronico con M_w compreso tra 1800 e 6 kDa, studiando *in vitro* l'effetto di *wound dermal reparation* su modelli costituiti da cheratinociti. È stato dimostrato che i frammenti ad alto e intermedio peso molecolare sono in grado di indurre la rigenerazione tissutale, mentre il frammento a 6 kDa addirittura ne previene la riparazione. Per ogni frammento è stato inoltre valutata la capacità di stimolare l'espressione di biomarker pro-infiammatori (IL-6, TGF- β 1, TNF- α): si osserva un trend di iper-espressione fattoriale al diminuire del peso molecolare dei frammenti studiati [216]. Dal punto di vista farmaceutico, l'acido ialuronico è biodegradabile, biocompatibile, non tossico e non immunogenico. Può essere modificato chimicamente mediante processi di crosslinking o reazioni di coniugazione, sfruttando i gruppi ossidrilici primari o secondari, i gruppi carbossilici e il gruppo N-acetilico [213]. La funzionalizzazione chimica permette di migliorare le prestazioni del polimero per la preparazione di *drug delivery systems*; ad esempio, è possibile rallentare la cinetica di degradazione e migliorarne le prestazioni meccaniche. Grazie alle favorevoli proprietà chimicofisiche e biologiche, l'acido ialuronico è ampiamente utilizzato nel trattamento dell'osteoartrite, nella chirurgia oculare, nella chirurgia plastica, in medicina rigenerativa, nel *drug delivery* per la progettazione di carrier per sistemi di targeting attivo nella terapia anti-cancro e per la veicolazione di proteine, peptidi e acidi nucleici, e nella veicolazione di agenti di *imaging*. Per far fronte ai

diversi scopi, l'acido ialuronico è utilizzato come polisaccaride di base per la preparazione di nanoparticelle, nanocomplessi, matrici, idrogel, micelle ecc. [217].

L'acido ialuronico è ampiamente utilizzato come un *bioavailability-enhancer* nelle formulazioni oculari topiche [218]: grazie alla presenza di questo polisaccaride, è stato dimostrato che il tempo di residenza pre-corneale dei farmaci quali pilocarpina, timololo, gentamicina, tobramicina è notevolmente prolungato [219]. Inoltre per le sue proprietà viscoelastiche e mucoadesive, l'HA presenta degli effetti benefici sull'epitelio corneale, ovvero protezione contro la deidratazione, riduzione del tempo di guarigione, riduzione della risposta infiammatoria, e la lubrificazione della superficie oculare [220]. Pertanto è ampiamente utilizzato in oftalmologia non solo come eccipiente ma come componente primario dei sostituti lacrimali artificiali; tantissime formulazioni di *eye drops* a base di acido ialuronico e ad alta prestazione sono attualmente di grande interesse clinico [221].

L'HA è stato inoltre ampiamente studiato come sostituto vitreale in interventi vitreo-retinici o in caso di distacco di retina dovuto a retinopatia diabetica. Convenzionalmente sono usati gas inerti o olio di silicone, ma sono correlati a diversi svantaggi come una breve durata di azione per quanto riguarda i gas, e una necessaria rimozione chirurgica nel secondo caso. L'acido ialuronico costituisce una soluzione ottimale per la sua biocompatibilità e facile iniettabilità (ad opportune concentrazioni); tuttavia a causa della sua rapida cinetica di degradazione è prevista una somministrazione ogni 7/10 giorni [222]. Diverse strategie sintetiche sono state messe a punto per rallentare i processi di degradazione. Schramm e collaboratori hanno studiato la tollerabilità e la cinetica di degradazione dell'HA crosslinkato mediante raggi UV con l'acido adipico diidrazide o l'N-vinil-pirrolidone; è stata dimostrata una riduzione *in vitro* pari al 10% nelle prime quattro settimane seguita da una lenta cinetica di degradazione, e oltretutto una massima tollerabilità *in vivo* dopo impianto nella cavità vitrea dei conigli [223].

2. SCOPO DELLA TESI

L'*ocular drug delivery* è una delle sfide più promettenti ed interessanti affrontate dai tecnologi farmaceutici. Come già descritto, l'anatomia, la fisiologia e la biochimica dell'occhio rendono quest'organo estremamente impervio a diverse sostanze; l'ammiccamento, la lacrimazione, il turnover lacrimale, il drenaggio naso-lacrimale, la complessa struttura corneale, la BAB e la BRB costituiscono degli ostacoli non indifferenti nella veicolazione di farmaci somministrati per via topica e diretti alla porzione posteriore dell'occhio [117]. Tra le diverse patologie progressive a carattere neovascolare che colpiscono il segmento posteriore dell'occhio ricordiamo la DMLE, la RD, l'edema maculare e la retinite pigmentosa. Queste sono tutte caratterizzate da un processo incontrollato di neovascolarizzazione, che nei casi più gravi compromette l'integrità e la funzionalità della retina, con degenerazione e/o morte dei fotorecettori [22,23]. In queste condizioni patologiche, il delicato equilibrio tra fattori pro-angiogenici e fattori anti-angiogenici è fortemente sbilanciato verso un'iper-espressione di fattori pro-angiogenici, primo fra tutti il VEGF. Le terapie farmacologiche con farmaci anti-infiammatori e anti-VEGF, usati singolarmente o combinati tra loro, permettono di ottenere un miglioramento nel trattamento delle retinopatie, poiché sono in grado di ridurre i livelli di espressione dei fattori pro-angiogenici (seppur con meccanismi d'azione differenti). Questi sono dei trattamenti di lunga durata e solitamente prevedono l'impiego di vie di somministrazione invasive con la comparsa di effetti secondari indesiderati non trascurabili, tra cui ad esempio la morte di un numero eccessivo di cellule neuronali nella retina a causa di un blocco eccessivo e continuato del VEGF [224].

In questo complesso scenario, l'applicazione delle nanotecnologie in oftalmologia risulta essere estremamente vantaggiosa e interessante per il trattamento delle diverse patologie degenerative della retina. Uno dei vantaggi sarebbe quello di limitare il numero di somministrazioni giornaliere, allo scopo di ridurre notevolmente la comparsa degli effetti indesiderati secondari e di migliorare la *compliance* del paziente. Ovviamente, i diversi nanosistemi dovranno essere progettati con un opportuno razionale al fine di ottenere una migliore interazione con il sito della somministrazione oculare, un rilascio controllato del farmaco e di conseguenza un aumento della biodisponibilità nel sito target [225]. Tra i diversi carrier colloidali, le micelle polimeriche sono ampiamente accettate per la somministrazione oculare topica di farmaci lipofili, in quanto le dimensioni nanometriche

(<300 nm) risultano essere appropriate e favorevoli per la permeazione corneale (mediante un meccanismo trans-cellulare e/o para-cellulare) di molecole scarsamente solubili in acqua [127]. Diversi polisaccaridi possono essere impiegati come materiali di partenza per la sintesi di derivati anfifilici e la realizzazione di micelle polimeriche grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e versatilità chimica; in particolare, i polisaccaridi anionici sono ampiamente utilizzati per la formulazione di nanosistemi mucoadesivi poiché in grado di stabilire legami ad idrogeno con la mucina presente sulla superficie oculare [226]. Parallelamente, le nanoparticelle polimeriche rappresentano dei sistemi carrier altamente vantaggiosi per la somministrazione intra-vitrea di farmaci ad azione retinica, poiché potenzialmente in grado di aumentarne la biodisponibilità *in situ*. Se progettate correttamente (in termini di *particle size*, carica superficiale, polimero utilizzato, concentrazione, ecc ...), le nanoparticelle polimeriche sono in grado di diffondere con velocità opportuna nel corpo vitreo e garantire un'adeguata biodisponibilità retinica.

Considerato lo stato dell'arte, lo scopo della presente tesi di Dottorato di Ricerca è stato quello di realizzare differenti *ocular drug delivery systems* potenzialmente utili per il trattamento di patologie degenerative della retina, utilizzando l'acido ialuronico con differente peso molecolare come biopolimero di partenza. L'acido ialuronico è stato scelto perché, essendo un biopolimero presente nel bulbo oculare, possiede un'elevata capacità di interagire con le strutture oculari (*signaling* biologico) e una buona biodegradabilità. Inoltre è importante ricordare che il peso molecolare influenza l'attività biologica dell'HA: quello ad elevato peso molecolare è coinvolto principalmente nel mantenimento del tono tissutale grazie alla sua attività osmotica, mentre quello a basso peso molecolare è coinvolto nell'attività di *signaling* e riconoscimento cellulare [216]. Tuttavia, per la realizzazione di DDS sono progettati ed utilizzati diversi derivati chimici dell'HA, allo scopo di migliorare le sue proprietà chimicofisiche, cambiare l'affinità e la solubilità in acqua, regolare il comportamento viscoelastico e modulare la resistenza idrolitica. In tal modo i derivati dell'HA risulteranno adatti per l'impiego in campo biomedico nella progettazione di carrier nanometrici.

Pertanto, la ricerca svolta durante il periodo di Dottorato si è basata sull'impiego dell'acido ialuronico a differente peso molecolare per la progettazione di derivati chimici da poter impiegare per la realizzazione di micelle polimeriche e nanoparticelle polimeriche.

La prima linea di ricerca sviluppata ha avuto come obiettivo la realizzazione di micelle polimeriche; per poter presupporre una somministrazione oculare topica, questi sistemi

dovrebbero essere in grado di interagire con il tessuto corneale e avere un appropriato tempo di ritenzione *in situ* al fine di migliorare la permeazione trans-corneale di farmaci idrofobici caricati al loro interno.

Per la realizzazione delle micelle polimeriche è stato scelto l'HA_{LMW} (M_w 240 kDa) e l'HA_{MINI} (M_w < 10 kDa) come polimero di partenza per la sintesi di diversi derivati anfifilici potenzialmente in grado di aggregare in mezzo acquoso.

Inizialmente, il lavoro è stato svolto utilizzando l'HA_{LMW} per la sintesi di diversi derivati siglati HA_{LMW}C₁₈ e HA_{LMW}C₁₆; la funzionalizzazione chimica con l'ottadecilammina (C₁₈NH₂) o l'esadecilammina (C₁₆NH₂) è stata condotta sugli ossidrili primari dell'acido ialuronico (previa attivazione degli stessi con il bis(4-nitrofenil)carbonato) secondo un diverso rapporto molare. I derivati sintetizzati sono stati opportunamente caratterizzati allo scopo di valutare la loro solubilità in acqua e la tendenza a formare micelle; solo per i derivati con le caratteristiche chimicofisiche opportune è stata valutata la capacità di incorporare il desametasone, corticosteroide ampiamente utilizzato nel trattamento di patologie acute e croniche del segmento oculare posteriore [227]. Tuttavia i risultati ottenuti non sono risultati essere soddisfacenti per lo scopo prefissato.

Pertanto è stato impiegato l'HA_{MINI} (M_w < 10 kDa) per la preparazione di diversi derivati anfifilici, utilizzando l'esadecilammina come agente idrofobizzante. Sono stati sintetizzati e caratterizzati tre derivati anfifilici dell'HA_{MINI} siglati HAC_{16a}, HAC_{16b} e HAC_{16c}, rispettivamente con un DD_{C16}mol% del 15, 12 e 7%, allo scopo di valutare come il diverso bilancio idrofilo/idrofobo dei derivati polimerici potesse influenzare le caratteristiche chimicofisiche delle micelle preparate. È stato scelto il metodo dell'evaporazione del co-solvente per preparare le micelle polimeriche vuote e cariche di corticosteroidi; in particolare sono stati scelti il desametasone, il triamcinolone e il triamcinolone acetone. Le micelle polimeriche HAC_{16a} e HAC_{16b} hanno mostrato i risultati migliori in termini di *particle size* e di *drug loading*. Inoltre, attraverso uno studio *in vitro* è stato studiato il loro carattere mucoadesivo e il derivato HAC_{16b} ha mostrato un profilo di interazione con le mucine migliore rispetto al derivato **a**. Pertanto, il derivato **b** è stato scelto per la conduzione degli studi di permeazione *in vitro* ed *ex vivo*; nel primo caso sono state utilizzate le HCEpiC (*Human Corneal Epithelial Cells*) per l'allestimento di un sistema transwell, nel secondo caso invece le cornee bovine sono state impiegate come barriera selettiva all'interno di celle di diffusione verticale di Franz. Questi studi sono stati condotti per dimostrare la potenziale capacità delle micelle polimeriche HAC_{16b} di incrementare la

permeazione trans-corneale dei farmaci scelti, agendo da *penetration e/o permeation enhancers*.

Partendo quindi dai risultati positivi ottenuti per le micelle polimeriche HAC_{16b} preparate, la ricerca tecnologica svolta successivamente è stata indirizzata verso la preparazione di nuove micelle polimeriche costituite da un derivato anfifilico dell'HA_{MINI} siglato HA-EDA-C₁₆. Questo è caratterizzato da un DD_{C16}mol% pari al 12% (come il derivato HAC_{16b}) e dalla presenza di gruppi amminici liberi, con un DD_{EDAM}mol% del 48% circa (grazie alla funzionalizzazione con l'etilendiammina di una frazione degli ossidrili primari dell'HA, preventivamente attivati con il bis(4-nitrofenil)carbonato). La funzionalizzazione con l'etilendiammina è stata condotta per aumentare la versatilità chimica del derivato, allo scopo di preparare delle micelle polimeriche in cui lo *shell* esterno sia funzionalizzato con diverse molecole che possano migliorare la permeazione trans-corneale. Le molecole scelte a tale scopo sono state il polietilenglicole (PEG) e la L-carnitina (CRN). Il PEG, un polimero idrofilo con diverso peso molecolare, è frequentemente utilizzato per la realizzazione di *ocular drug carrier* poiché è in grado di permeare attraverso le barriere oculari, garantendo un miglioramento della farmacocinetica, biodisponibilità e distribuzione tissutale del nanocarrier [228]. È stato inoltre scelto per la funzionalizzazione delle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆ poiché è stato dimostrato che la PEGilazione di nanocarrier somministrati sulla superficie oculare migliora le proprietà mucoadesive del sistema [229].

La L-carnitina è un acido carbossilico ed amminoacido a catena corta, un composto zwitterionico ampiamente distribuito nei tessuti biologici; è costitutivamente presente nel film lacrimale dove svolge un'importante funzione osmoregolatoria necessaria per il mantenimento dell'integrità corneale [230]. Questa molecola è inoltre coinvolta nella β -ossidazione degli acidi grassi attraverso un meccanismo di facilitazione del loro trasporto mitocondriale e attraverso la modulazione dell'omeostasi intracellulare del coenzima A [231] In questo lavoro sperimentale, la L-carnitina è stata scelta per la funzionalizzazione delle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆ poiché sulla superficie apicale delle cellule umane corneali e congiuntivali sono presenti diversi *organic cation/carnitine transporters* OCTN1, OCTN2 e OCTN3 che trasportano cationi organici, L-carnitina e diverse acilcarnitine attraverso dei meccanismi specifici [232]; pertanto l'obiettivo sarebbe quello di aumentare il riconoscimento cellulare del sistema micellare con l'epitelio corneale, allo scopo di migliorarne ulteriormente la permeazione trans-corneale.

Partendo dal derivato HA-EDA-C₁₆, sono stati sintetizzati e caratterizzati altri due derivati polimerici siglati HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN.

I tre derivati polimerici ottenuti sono stati utilizzati per la preparazione di micelle polimeriche mediante la tecnica dell'evaporazione del co-solvente; inoltre, è stato possibile incorporare l'imatinib all'interno del core idrofobico micellare utilizzando questa metodica di preparazione. L'imatinib è un farmaco approvato dall'FDA nel trattamento della leucemia mieloide cronica e possiede un'azione inibitoria a livello del dominio tirosin-chinasi della proteina di fusione BCR-ABL1 (Figura 20); l'impiego *off label* dell'imatinib a livello oculare potrebbe essere sfruttato per il trattamento delle diverse retinopatie poiché la proteina ABL1 sembra essere coinvolta nel processo di neoangiogenesi.

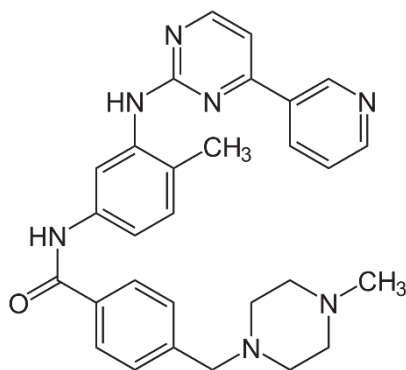


Figura 20. Formula di struttura dell'imatinib

In una condizione patologica retinica, la non completa risposta dell'endotelio vasale alle terapie anti-VEGF ha avvalorato l'ipotesi che probabilmente esistono dei *pathway* VEGF-indipendenti che contribuiscono parallelamente al processo di neoangiogenesi. Da questa considerazione è scaturita la necessità di identificare delle terapie anti-angiogeniche efficaci che agiscano su nuovi *target* VEGF-indipendenti, e che possano essere utilizzate in combinazione o in alternativa alle terapie attuali. La neuropilina 1 (NRP1) è una glicoproteina trans-membrana che lega il VEGF; ha un ruolo essenziale nello sviluppo vascolare e nell'angiogenesi patologica [233]. Fisiologicamente, dopo aver legato il VEGF (con un'alta affinità per l'isoforma VEGF165), la NRP1 complessa con il recettore VEGFR2 per potenziare la trasduzione del segnale nelle cellule endoteliali vascolari; inoltre, la NRP1 è in grado di interagire con le integrine della matrice extra cellulare indipendentemente dall'interazione con il VEGFR2 [234]. Raimondi e collaboratori hanno dimostrato che la NRP1 è coinvolta nel processo di neoangiogenesi, attraverso un

meccanismo che coinvolge la proteina ABL1 e in maniera indipendente dal complesso VEGF/VEGFR2 [235]; ABL1 è una tirosin-chinasi non recettoriale con un dominio *actin-binding/bundling* che induce un rimodellamento dell'actina mediante fosforegolazione in diverse linee cellulari [236]. In particolare, la NRP1 forma un complesso con ABL1 inducendo la fosforilazione della paxilina (un target integrinico) e un concomitante rimodellamento dell'actina nelle cellule endoteliali vasali stimulate dalla fibronectina. Attraverso questo *pathway*, le cellule endoteliali vasali sono guidate in un processo di *sprouting*, *branching* e *fusion* vascolare [237,238]. Tale scoperta ha pertanto suggerito che il dominio tirosin-chinasico di ABL1 potrebbe costituire un nuovo e valido *target* per il trattamento di patologie retiniche a carattere neoangiogenico. Pertanto, gli inibitori del dominio tirosin-chinasico di ABL1, tra cui l'imatinib, potrebbero essere utilizzati per la realizzazione di una terapia anti-angiogenica che sia eventualmente complementare al trattamento con molecole ad azione anti-VEGF [235].

Le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN vuote e cariche di imatinib sono state opportunamente caratterizzate per dimostrare il loro potenziale impiego come *ocular DDS*. In particolare, è stata valutata la capacità di permeare attraverso la cornea (mediante la preparazione di micelle polimeriche fluorescenti) e di fungere da *penetration e/o permeation enhancer* nei confronti dell'imatinib incorporato; inoltre è stata valutata la capacità dei sistemi carichi di inibire lo *sprouting* vasale su un modello *in vitro* di HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).

La seconda linea di ricerca sviluppata ha avuto come obiettivo la realizzazione di nanoparticelle polimeriche utilizzando una piattaforma microfluidica. Come precedentemente accennato, lo sviluppo delle tecnologie “*lab-on-a-chip*” (LOC) ha consentito di raggiungere notevoli vantaggi nella realizzazione di nano- e micro-sistemi per applicazioni biomediche all'interno di appositi *micromixer*. La tecnica microfluidica è in grado di esaltare le caratteristiche fisiche della miscelazione in uno spazio ben definito e limitato; in particolare, all'interno di un *micromixer* la miscelazione dipende dai processi di avvezione e di diffusione molecolare passiva, pertanto è possibile condurre un processo di nanoprecipitazione controllata per la produzione di nanoparticelle con proprietà dimensionali opportune.

È stato messo a punto un metodo microfluidico per la produzione di nanosistemi polimerici utilizzando un *micromixer chip* a laminazione sequenziale, in cui il flusso principale in

entrata è suddiviso in “n” sottoflussi che sono di seguito ricongiunti in un flusso laminare. In particolare, il *micromixer chip* utilizzato in questa procedura presenta 12 regioni di miscelazione che amplificano il numero dei flussi laminari migliorando significativamente l'efficienza di miscelazione, la velocità e la completezza del processo di nanoprecipitazione. Il polimero HA_{Xs}-EDA-C₁₈, ottenuto per funzionalizzazione chimica dell'HA con porzioni ottadecilamminiche ed etilendiamminiche, è stato sintetizzato a partire dall'HA_{Xs} (M_w 100 kDa). Questo derivato è liberamente disperdibile in acqua ma risente dell'incremento di forza ionica del mezzo, precipitando per desolvatazione; si presta in maniera ottimale alla produzione di nanoparticelle per nanoprecipitazione indotta da un'augmentata forza ionica. Quindi, sono state prodotte nanoparticelle di HA_{Xs}-EDA-C₁₈ mediante la tecnica della microfluidica, studiando l'influenza diretta di alcuni parametri microfluidici sulla dimensione particellare. Successivamente, sono state preparate e caratterizzate le nanoparticelle HA_{Xs}-EDA-C₁₈ cariche di imatinib; è stata quindi valutata le potenzialità dei carrier preparati di interagire stabilmente con il farmaco incorporato e di promuovere un direzionamento a livello retinico, presupponendo una somministrazione intravitreale.

Inoltre, il lavoro sperimentale svolto ha previsto la funzionalizzazione delle nanoparticelle con la sequenza tripeptidica arginina-glicina-aspartato (RGD) che, come è noto, è capace di legare diverse integrine tra cui l'isoforma $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ essenziali per la formazione di nuovi vasi sanguigni ed iper-espresse in un processo di neoangiogenesi [208]. L'iper-espressione dell'integrina $\alpha v\beta 3$ è necessaria durante la neoangiogenesi per conferire alle cellule endoteliali la capacità di migrare e legarsi alla matrice extracellulare nel processo di rimodellamento vasale; al contrario, in una coroide sana e non proliferante, l'espressione di queste integrine è a livello basale [239,240]. Per lo scopo prefissato, il derivato HA_{Xs}-EDA-C₁₈ è stato opportunamente funzionalizzato chimicamente con un peptide RGD ciclico (RGDC), quindi utilizzato per la preparazione di nanoparticelle.

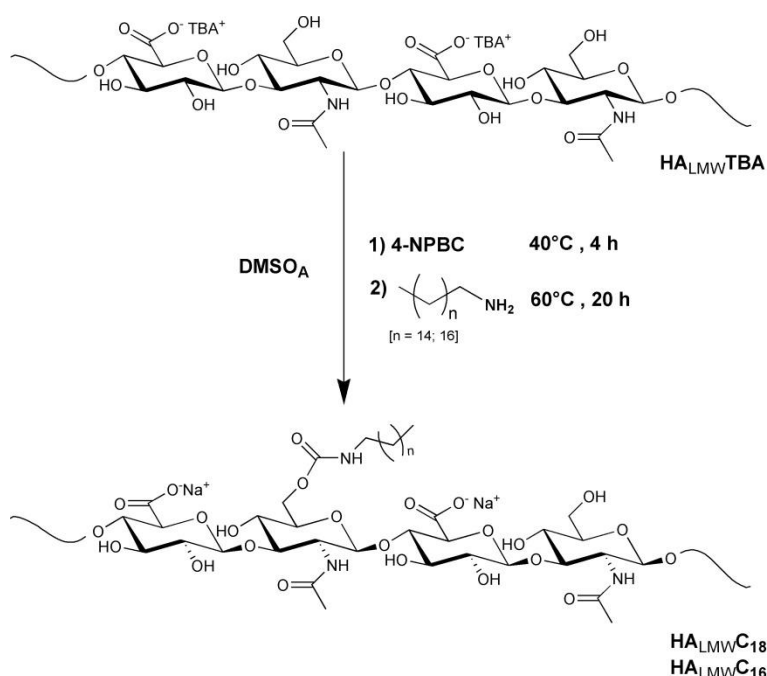
È stato condotto uno studio biologico *in vitro* per valutare la biocompatibilità delle nanoparticelle preparate, la capacità dei sistemi di promuovere un targeting attivo RGD-mediato e, per i sistemi carichi di imatinib, di inibire lo *sprouting* vasale su un modello *in vitro* di HUVEC.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Micelle polimeriche a base di HA_{LMW}

La prima fase del presente lavoro sperimentale è basata sull'impiego dell'HA con un M_w pari a 240 kDa per la sintesi di diversi derivati anfifilici, allo scopo di preparare micelle polimeriche da impiegare come *ocular DDS*.

L'HA_{LMW} (in forma di sale di tetrabutilamonio) e le ammine C₁₈NH₂ e C₁₆NH₂ sono stati utilizzati per la sintesi dei derivati HA_{LMW}C₁₈ e HA_{LMW}C₁₆, secondo una strategia di sintesi costituita da due step consecutivi senza isolamento degli intermedi di reazione (Schema 1) [241].



Schema 1. Schema di sintesi dei derivati HA_{LMW}C₁₈ e HA_{LMW}C₁₆

Il primo step consente l'attivazione dei gruppi ossidrilici primari della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA tramite il bis(4-nitrofenil)carbonato (4-NPBC); l'attivazione con il 4-NPBC è quantitativa [242], e viene condotta impostando differenti rapporti molari teorici di mol 4-NPBC/mol u.r.HA (X), allo scopo di ottenere derivati anfifilici con un differente bilancio idrofilo/idrofobo. Successivamente l'ottadecilammina o l'esadecilammina aggiunta agisce da nucleofilo sui gruppi -OH attivati; lo step di funzionalizzazione è condotto invece mantenendo costante il rapporto molare teorico mol C_nNH₂/mol 4-NPBC (Y).

Per i derivati HA_{LMW}C₁₈ preparati impostando una funzionalizzazione teorica in ammina tra il 5 e il 20 % non è stato possibile procedere con la caratterizzazione ¹H-NMR poiché non solubili in mezzo acquoso, organico o miscele di entrambi. I derivati preparati impostando un valore di X pari al 0.015 e 0.025 sono risultati solubili in mezzo acquoso; tramite analisi ¹H-NMR, il grado di funzionalizzazione effettivo è risultato essere pari rispettivamente all'1% ± 0.2 e al 2% ± 0.2, calcolato rapportando l'integrale del picco a δ 0.75 e δ 1.5 (relativo rispettivamente ai protoni metilici e metilenici della catena alchilica) con l'integrale del picco a δ 1.9 (relativo ai protoni metilici della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA) (spettri non mostrati).

Pertanto, su questi due derivati è stato effettuato uno studio usando il pirene come sonda fluorescente allo scopo di valutare la loro capacità *self-assembly* in acqua e in DPBS pH 7.4. Da tale studio si evince l'assenza di una concentrazione di aggregazione critica (CAC); quindi, il grafting della catena alchilica a 18 atomi di carbonio sul backbone di HA_{LMW}, secondo i rapporti molari impostati, porterebbe ad un bilancio idrofilo/idrofobo per ogni derivato sfavorevole per la messa a punto di sistemi micellari.

I derivati HA_{LMW}C₁₆ sintetizzati sono stati analogamente caratterizzati, e i dati ottenuti sono riportati in Tabella 1. Appare subito evidente che il trend crescente di funzionalizzazione in esadecilammina rispecchia il trend (anch'esso crescente) del rapporto molare X utilizzato nel processo di sintesi.

Tabella 1. Rapporto molare X (mol 4-NPBC/mol u.r.HA), DD_{C16}mol% (calcolato tramite analisi ¹H-NMR), resa in peso percentuale (calcolato rispetto l'HA_{LMW} di partenza), e valori di CAC (mg/ml) in H₂O e DPBS (calcolato tramite saggio del pirene) dei derivati HA_{LMW}C₁₆ sintetizzati

HA _{LMW} C ₁₆	X	DD _{C16} mol%	Resa in Peso %	CAC H ₂ O	CAC DPBS
A	0.200	14.5 ± 2.5	82.3 ± 13	non calcolato	non calcolato
B	0.150	10.1 ± 1.1	67.8 ± 13	0.48 ± 0.15	0.125 ± 0.05
C	0.100	8.1 ± 1.6	71.3 ± 8	0.37 ± 0.11	0.173 ± 0.02
D	0.050	3.6 ± 1.2	65.1 ± 6	/	/
E	0.025	1.8 ± 0.5	76.3 ± 6	/	/
F	0.015	1.3 ± 0.2	68.4 ± 2	/	/

Il derivato **A** è stato escluso da ulteriori studi poiché non risulta essere solubile in DPBS. Per tutti gli altri derivati è stato effettuato il saggio del pirene; solo con una funzionalizzazione in esadecilammina superiore del 6% è possibile apprezzare un valore di CAC. Tuttavia, dai dati ottenuti appare evidente che i derivati **B** e **C** hanno una capacità di

self-assembly simile poiché è pressoché uguale il loro grado di funzionalizzazione; il derivato **B** presenta un valore di CAC in DPBS più basso, probabilmente perché risente maggiormente della forza ionica del mezzo. Considerando quindi che un basso valore di CAC presuppone un incremento di stabilità della struttura micellare in mezzo acquoso, il derivato HA_{LMW}C₁₆**B** è stato scelto come unico candidato anfifilico per la preparazione di sistemi micellari, utilizzando il metodo della dialisi. Sono state preparate le micelle vuote e le micelle cariche di desametasone (DEX), impostando un rapporto in peso polimero/farmaco pari a 1:0.5. Entrambe le tipologie di micelle sono state caratterizzate mediante analisi al *Dynamic Light Scattering* (DLS) per valutarne le dimensioni e il potenziale- ζ (Tabella 2).

Tabella 2. Analisi tramite DLS delle micelle HA_{LMW}C₁₆**B** e delle micelle HA_{LMW}C₁₆**B**/DEX disperse in acqua e DPBS

	Mezzo Disperdente	Particle Size (nm)	PDI	Potenziale- ζ (mV)
HA _{LMW} C ₁₆ B	H ₂ O	925.5 ± 5.8	0.481	-68.9 ± 5.5
	DPBS	306.3 ± 4.9	0.642	-14.2 ± 1.8
HA _{LMW} C ₁₆ B /DEX	H ₂ O	601.7 ± 7.1	0.549	-54.1 ± 6.3
	DPBS	233.5 ± 3.9	0.662	-13.7 ± 2.1

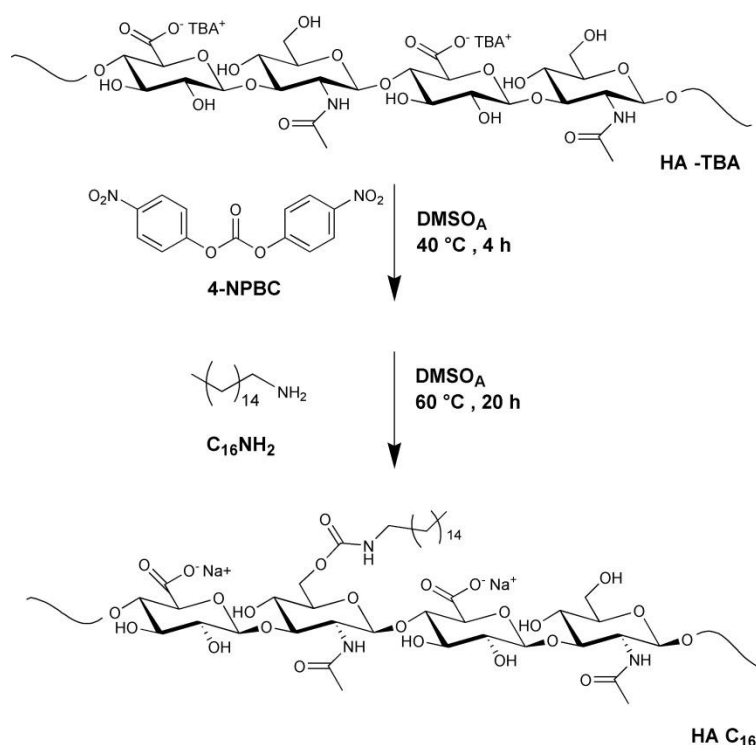
Appare subito evidente che il polimero è sensibile alla forza ionica del tampone poiché le dimensioni (nm) dei sistemi con e senza farmaco risultano essere ridotte rispetto a quelle ottenute in acqua. Inoltre, le micelle cariche di DEX hanno una dimensione inferiore rispetto alle micelle vuote; probabilmente il farmaco lipofilo si interpone in maniera ottimale tra le catene alchiliche del core micellare determinando una migliore aggregazione del derivato polimerico sia in acqua che, soprattutto, in tampone fosfato. È stata inoltre valutata la *drug loading* % delle micelle HA_{LMW}C₁₆**B**/DEX, che tuttavia è risultata essere inferiore all'1% (p/p).

Considerando le dimensioni non appropriate, gli elevati valori di PDI e la bassa *drug loading* ottenuta, i sistemi HA_{LMW}C₁₆**B** e HA_{LMW}C₁₆**B**/DEX preparati non sono stati ulteriormente caratterizzati poiché considerati non idonei come *ocular drug carrier*.

3.2 Micelle polimeriche a base di HA_{MINI}

3.2.1 Micelle polimeriche HAC₁₆

Diversi derivati anfifilici, siglati HAC₁₆, sono stati sintetizzati partendo dal sale di tetrabuttilamonio dell'HA_{MINI}, secondo una procedura di sintesi *one pot* che prevede l'attivazione dei gruppi -OH primari dell'acido ialuronico seguita dalla sostituzione nucleofila con l'esadecilammina (Schema 2).



Schema 2. Schema di sintesi dei derivati HAC₁₆

Ogni derivato può essere considerato come un *backbone* lineare idrofilo a cui sono legate un diverso numero di catene esadecilamminiche secondo una distribuzione casuale. Infatti, variando il rapporto molare X e mantenendo costante il rapporto molare Y sono stati ottenuti tre diversi derivati siglati HAC_{16a}, HAC_{16b} e HAC_{16c} (Tabella 3).

Tabella 3. Rapporto molare X (mol 4-NPBC/mol u.r.HA), $DD_{C16mol\%}$ (calcolato tramite analisi ^1H-NMR), resa in peso percentuale (calcolato rispetto l' HA_{MINI} di partenza), valori di M_w e PDI (calcolati tramite GPC), valori di CAC (mg/ml) in H_2O e DPBS (calcolati tramite saggio del pirene) dei derivati HAC_{16} sintetizzati; i valori di M_w e PDI dell' HA_{MINI} di partenza sono riportati in tabella

	X	$DD_{C16mol\%}$	Resa in Peso%	M_w	PDI	CAC_{H_2O}	CAC_{DPBS}	CAC_{HEPES}
HA_{MINI}	/	/	/	7333	1.63	/	/	/
HAC_{16a}	0.20	15 ± 0.3	85 ± 2.1	8066	1.43	0.19 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01
HAC_{16b}	0.15	12 ± 0.2	89 ± 1.7	7919	1.39	0.28 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.02
HAC_{16c}	0.10	7 ± 0.9	82 ± 1.1	7662	1.54	0.46 ± 0.06	0.33 ± 0.02	0.21 ± 0.01

Come si evince dai dati riportati in Tabella 3, all'aumentare del valore di X utilizzato il $DD_{C16mol\%}$ e i valori del M_w aumentano progressivamente, mentre si assiste ad una riduzione dei valori di CAC (mg/ml). Inoltre, ogni derivato è caratterizzato da un valore di CAC più basso in DPBS e in tampone HEPES, probabilmente perché la forza ionica del mezzo induce una più forte aggregazione del polimero rispetto a quella che avviene in acqua bidistillata.

I derivati HAC_{16a} , HAC_{16b} e HAC_{16c} sono stati utilizzati per la preparazione delle micelle polimeriche mediante la tecnica dell'evaporazione del co-solvente, poiché i dati di caratterizzazione ottenuti risultano essere incoraggianti per lo scopo prestabilito. Le micelle vuote sono state caratterizzate mediante analisi al DLS, e i dati ottenuti sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4. Analisi tramite DLS delle micelle HAC_{16a} , HAC_{16b} e HAC_{16c} disperse in acqua, DPBS e tampone HEPES

	Mezzo Disperdente	Particle Size (nm)	PDI	Potenziale- ζ (mV)
HAC_{16a}	H_2O	213.8 ± 5.7	0.167	-34.6 ± 6.2
	DPBS	153.7 ± 5.4	0.244	-18.6 ± 2.1
	HEPES	127.1 ± 9.1	0.253	-14.2 ± 1.9
HAC_{16b}	H_2O	231.5 ± 9.5	0.221	-37.6 ± 5.6
	DPBS	173.7 ± 7.4	0.293	-14.7 ± 2.8
	HEPES	145.8 ± 6.3	0.284	-10.2 ± 3.1
HAC_{16c}	H_2O	329.6 ± 7.2	0.255	-39.8 ± 6.8
	DPBS	251.2 ± 9.9	0.253	-16.8 ± 1.5
	HEPES	223.2 ± 4.3	0.206	-13.2 ± 2.6

Per ogni derivato, le micelle polimeriche analizzate hanno mostrato una dimensione particellare in DPBS e in tampone HEPES più bassa rispetto a quella ottenuta in acqua

bidistillata, confermando quindi l'influenza positiva della forza ionica sull'aggregazione polimerica. Le micelle HAC_{16a} e HAC_{16b} mostrano, in tutti i mezzi disperdenti utilizzati, dei valori dimensionali più bassi rispetto alle micelle HAC_{16c}; ragionevolmente la maggiore funzionalizzazione alchilica del *backbone* polimerico di HA determina una maggiore interazione idrofobica con formazione di micelle più piccole. Per quanto riguarda i valori di potenziale- ζ , questi cambiano al variare del mezzo disperdente.

Per valutare il potenziale impiego di questi sistemi micellari come *ocular drug delivery systems* per la somministrazione di farmaci idrofobici, sono stati scelti tre corticosteroidi (desametasone, triamcinolone e triamcinolone acetone) per la preparazione delle micelle cariche. Ricordiamo infatti che questi farmaci sono in grado di ridurre la permeabilità vascolare e la rottura della BRB, di indurre una *down-regulation* dell'espressione e/o della produzione del VEGF da parte delle cellule endoteliali, e di inibire l'azione delle metalloproteinasi [227,243]. È stato utilizzato il metodo dell'evaporazione del co-solvente, e le micelle ottenute sono state caratterizzate per valutare la *drug loading*, la dimensione (nm) e il potenziale- ζ (Tabella 5). Per ogni corticosteroide, la quantità di farmaco intrappolato nel core micellare segue un trend crescente in relazione all'aumento del DD_{C16mol%} dei derivati utilizzati; una differenza significativa è riscontrata tra i derivati **a** e **b** rispetto al derivato **c**.

Tutte le micelle cariche di farmaco hanno mostrato una dimensione maggiore rispetto i sistemi vuoti; tuttavia, mentre le micelle HAC_{16a} e HAC_{16b} hanno una dimensione sempre inferiore ai 300 nm, per le micelle HAC_{16c}, e soprattutto per le micelle HAC_{16a}/TA, i valori dimensionali sono più alti.

Tabella 5. Valori di DL% (p/p), *particle size* (nm) e potenziale- ζ (mV) delle micelle HAC_{16a}, HAC_{16b} e HAC_{16c} cariche di DEX, T e TA (A: HAC₁₆/DEX micelle; B: HAC₁₆/T micelle; C: HAC₁₆/TA micelle)

A	DL %	Mezzo Disperdente	Particle Size	PDI	Potenziale- ζ
HAC _{16a} /DEX	4.9 ± 0.2	H ₂ O	240.2 ± 7.4	0.243	-39.1 ± 5.1
		DPBS	219.2 ± 5.5	0.211	-19.1 ± 2.1
		HEPES	161.1 ± 5.9	0.146	-15.1 ± 1.7
HAC _{16b} /DEX	4.1 ± 0.1	H ₂ O	260.4 ± 6.6	0.208	-36.4 ± 7.5
		DPBS	239.4 ± 9.1	0.212	-14.4 ± 2.7
		HEPES	185.6 ± 4.7	0.176	-15.1 ± 3.4
HAC _{16c} /DEX	2.5 ± 0.2	H ₂ O	394.2 ± 7.3	0.272	-22.2 ± 5.7
		DPBS	360.4 ± 2.2	0.223	-13.4 ± 4.3
		HEPES	239.9 ± 7.9	0.263	-12.2 ± 2.6

B	DL %	Mezzo Disperdente	Particle Size	PDI	Potenziale- ζ
HAC _{16a} /T	5.8 ± 0.2	H ₂ O	246.6 ± 2.2	0.344	-46.3 ± 8.1
		DPBS	203.6 ± 1.9	0.242	-17.1 ± 2.2
		HEPES	190.2 ± 3.1	0.280	-15.6 ± 1.7
HAC _{16b} /T	5.0 ± 0.1	H ₂ O	279.8 ± 1.4	0.240	-44.5 ± 5.9
		DPBS	219.8 ± 8.3	0.265	-17.3 ± 3.2
		HEPES	219.6 ± 1.7	0.299	-13.7 ± 2.7
HAC _{16c} /T	2.6 ± 0.3	H ₂ O	351.7 ± 6.7	0.335	-46.5 ± 5.6
		DPBS	283.2 ± 7.6	0.224	-17.2 ± 1.9
		HEPES	251.5 ± 5.6	0.329	-14.8 ± 3.2

C	DL %	Mezzo Disperdente	Particle Size	PDI	Potenziale- ζ
HAC _{16a} /TA	3.9 ± 0.1	H ₂ O	225.4 ± 1.7	0.439	-51.1 ± 4.5
		DPBS	206.3 ± 1.4	0.225	-20.3 ± 1.9
		HEPES	192.2 ± 1.1	0.386	-18.2 ± 2.7
HAC _{16b} /TA	2.9 ± 0.2	H ₂ O	281.3 ± 6.3	0.230	-48.3 ± 5.3
		DPBS	241.7 ± 5.6	0.215	-19.9 ± 3.7
		HEPES	219.3 ± 2.4	0.238	-17.7 ± 1.8
HAC _{16c} /TA	1.7 ± 0.2	H ₂ O	518.7 ± 6.3	0.197	-30.8 ± 5.8
		DPBS	463.9 ± 7.1	0.324	-20.7 ± 4.1
		HEPES	355.6 ± 9.9	0.231	-18.7 ± 2.4

Poiché le micelle HAC_{16a} e HAC_{16b}, rispetto alle micelle HAC_{16c}, hanno mostrato la capacità di intrappolare un'opportuna quantità di molecole bioattive e una dimensione particellare opportuna (< 300 nm), questi due sistemi sono stati ulteriormente caratterizzati. In particolare è stato studiato il profilo di rilascio del DEX, T e TA dalle micelle polimeriche disperse in DPBS; questo è stato confrontato con il profilo di diffusione dei corticosteroidi da una soluzione e da una sospensione opportunamente preparate. Nel caso della soluzione, la concentrazione di farmaco utilizzato è corrispondente al valore di massima solubilità, che ovviamente sarà più bassa rispetto alla quantità presente nelle

micelle [244]; la quantità di farmaco presente nella sospensione invece è uguale alla concentrazione di farmaco disciolto utilizzando le micelle polimeriche.

Come riportato in Figura 21, il DEX e il TA diffondono completamente nell'arco di 24 ore mentre il T nell'arco delle 48 ore, quando usati come soluzione (curve in verde). Nel caso delle sospensioni, solo una quantità di farmaco pari al 41%, 34% e 21.6% è in grado di diffondere dopo 48 ore rispettivamente per DEX, T e TA. Analizzando i profili di rilascio ottenuti per le micelle HAC_{16a} (curve in rosso) e HAC_{16b} (curve in blu) si può dedurre che questi sistemi sono in grado di rilasciare rapidamente un'elevata percentuale di farmaco incorporato; in particolare, nell'arco delle 48 ore entrambi i sistemi micellari consentono il rilascio di una quantità maggiore dell'80% per il DEX e il T. Nel caso del TA, è rilasciata una quantità inferiore all'80%, probabilmente a causa di una maggiore interazione idrofobica tra il farmaco (caratterizzato da un valore di Log P pari a 2.53) e le catene alchiliche del core idrofobico micellare.

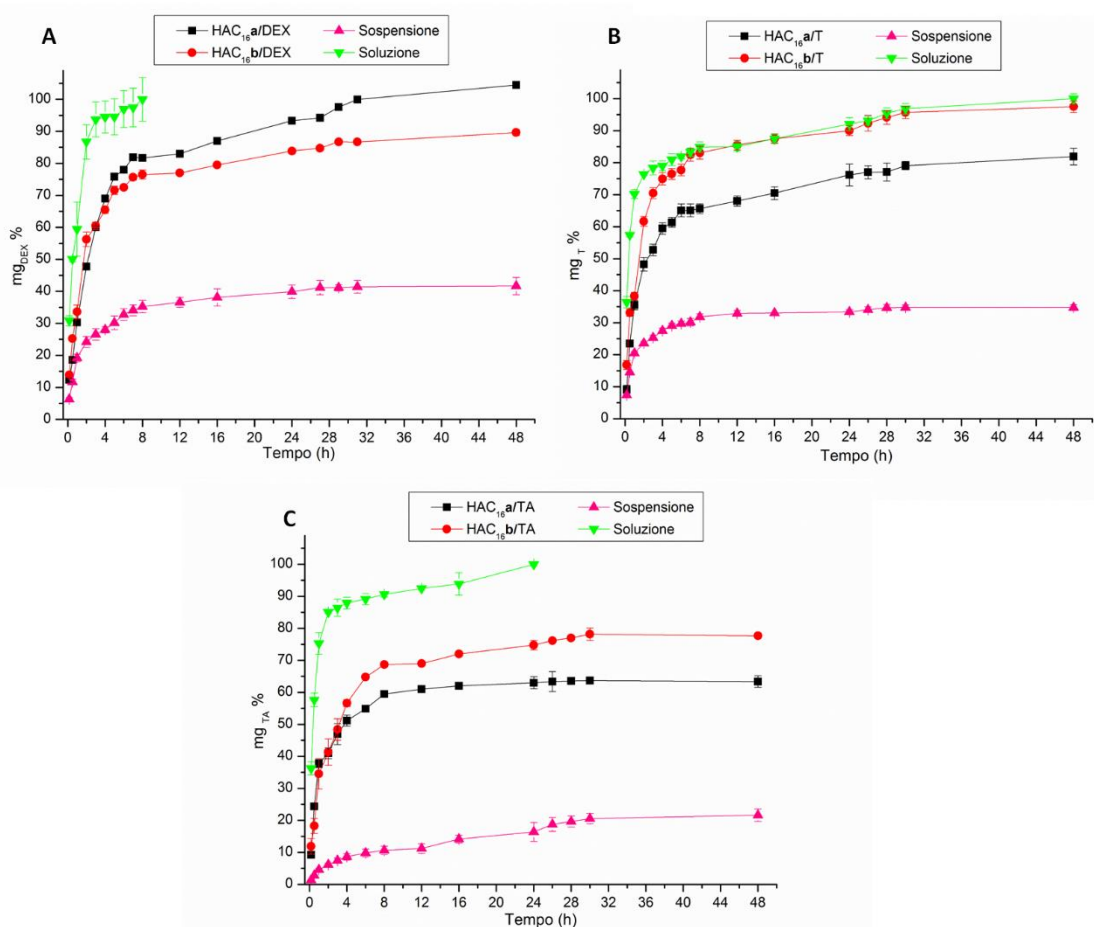


Figura 21. Profilo di rilascio *in vitro* del DEX (A), T (B) e TA (TA) dalle micelle HAC_{16a} (■ nero) e HAC_{16b} (● rosso), e profilo di diffusione del farmaco da una sospensione (▲ rosa) e da una soluzione (▼ verde) attraverso la membrana da dialisi in DPBS

Le micelle HAC₁₆ cariche di farmaco risultano essere più vantaggiose rispetto al farmaco libero in soluzione e soprattutto in sospensione. I farmaci lipofili scelti sono intrappolati in forma molecolare nel core micellare ad una concentrazione maggiore rispetto alla loro solubilità in mezzo acquoso; utilizzando questi sistemi micellari si potrebbe evitare l'impiego di sospensioni farmaceutiche che, come è noto, sono le forme di dosaggio comunemente utilizzate per la somministrazione di corticosteroidi a livello oculare. I dati ottenuti suggeriscono che utilizzando le micelle HAC₁₆ è disponibile una maggiore quantità di farmaco, con un profilo di rilascio controllato nel tempo. Questo aspetto incoraggia l'impiego di tali sistemi come *ocular drug carriers* poiché sono potenzialmente in grado di rilasciare la dose terapeutica del farmaco intrappolato subito dopo la somministrazione, e successivamente di garantire un rilascio sostenuto nel tempo [245].

Come già discusso precedentemente, diversi meccanismi sono responsabili della bassa biodisponibilità dei farmaci a livello oculare dopo instillazione nel sacco congiuntivale. Per incrementare l'efficacia terapeutica delle molecole bioattive somministrate si dovrebbe innanzitutto incrementare il tempo di residenza della formulazione sulla superficie oculare. La progettazione di DDS mucoadesivi è quindi una strategia importante per ottenere un tempo di contatto prolungato tra il sistema polimerico e l'epitelio corneale [246,247]. A tale scopo, sono state valutate le proprietà mucoadesive delle micelle HAC_{16a} e HAC_{16b} mediante uno studio di trasmittanza *in vitro*, per valutare l'interazione tra la mucina e le micelle e paragonando il risultato ottenuto con quello relativo all'interazione tra la mucina e l'HA_{MINI} non funzionalizzato (Figura 22). L'eventuale interazione tra la mucina e il campione analizzato (HA o micelle) porterebbe ad una diminuzione della trasmittanza a causa della formazione di macro-aggregati [248].

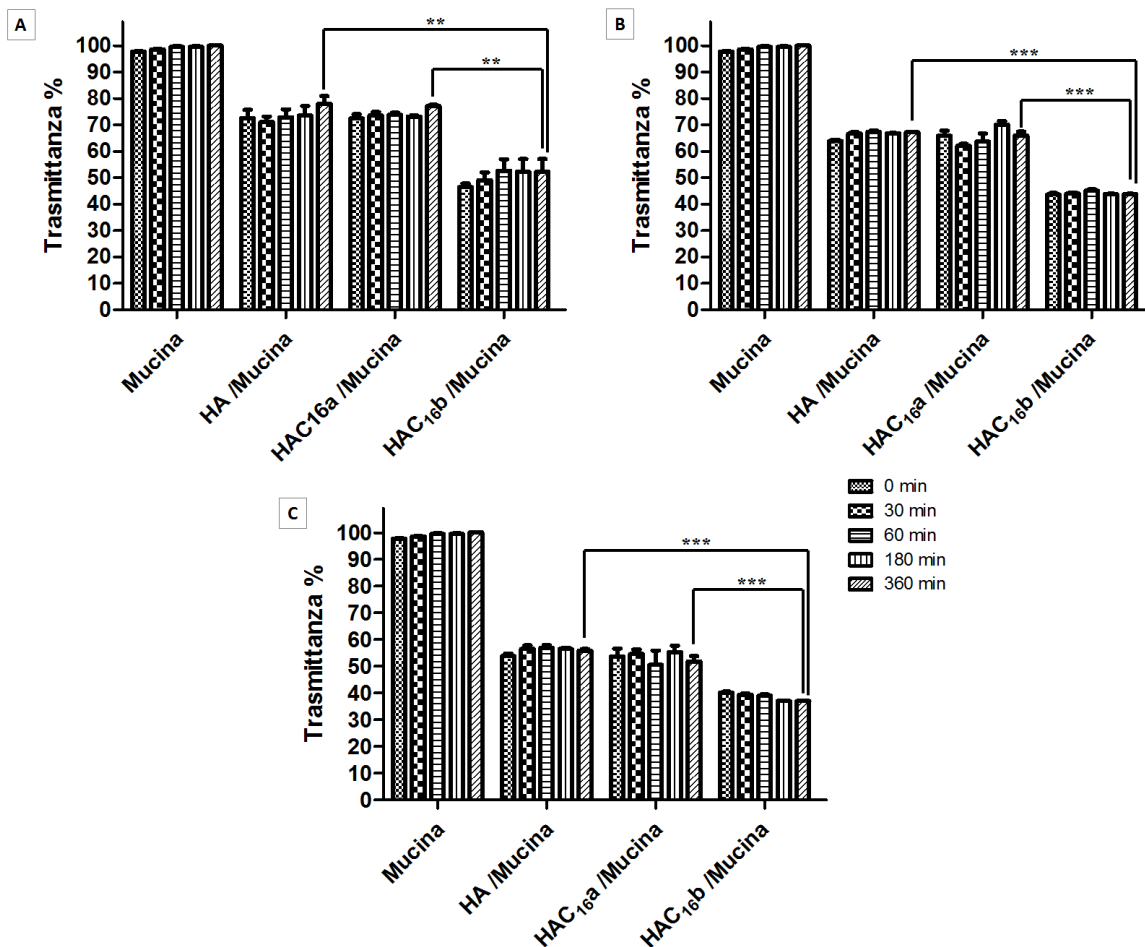


Figura 22. Trasmittanza % della mucina in dispersione e delle miscele di mucina con l'HA_{MINI} o con le micelle HAC_{16a} e HAC_{16b} a diversi tempi di incubazione (0-360 minuti) e a diversa concentrazione di campione (A: 0.5 mg/ml; B: 1 mg/ml; C: 5 mg/ml)

Sia per l'acido ialuronico non modificato che per i sistemi micellari preparati, i valori di trasmittanza diminuiscono all'aumentare della concentrazione polimerica, mentre per ogni singolo campione e ad ogni concentrazione studiata i valori di trasmittanza restano approssimativamente costanti nel tempo. Questi dati suggeriscono che tra la mucina e le micelle HAC₁₆ si instaura rapidamente un'interazione influenzata essenzialmente dalla concentrazione polimerica; pertanto il processo di mucoadesione che avviene risulta essere tempo-indipendente e concentrazione-dipendente. Per tutte le concentrazioni studiate, le micelle HAC_{16b} hanno mostrato un'interazione con la mucina più forte rispetto sia all'acido ialuronico non modificato che alle micelle HAC_{16a}; probabilmente la natura anfifilica del derivato **b** permette di ottenere una struttura micellare in cui i gruppi ossidrilici e carbossilici del *backbone* di HA risultano essere maggiormente disponibili per l'interazione con le mucine, mostrando così una maggiore forza di interazione.

Considerando che le micelle polimeriche HAC₁₆**b** mostrano appropriati valori dimensionali (< 300 nm) e di *drug loading*, un'abilità nel garantire un rilascio sostenuto di molecole idrofobiche e proprietà mucoadesive opportune, questi sistemi sono stati scelti per un'ulteriore caratterizzazione. In particolare, è stata studiata e confermata la stabilità, in termini di *particle size* e potenziale- ζ , delle micelle vuote e cariche di farmaco disperse in DPBS per 7 giorni (Figura 23).

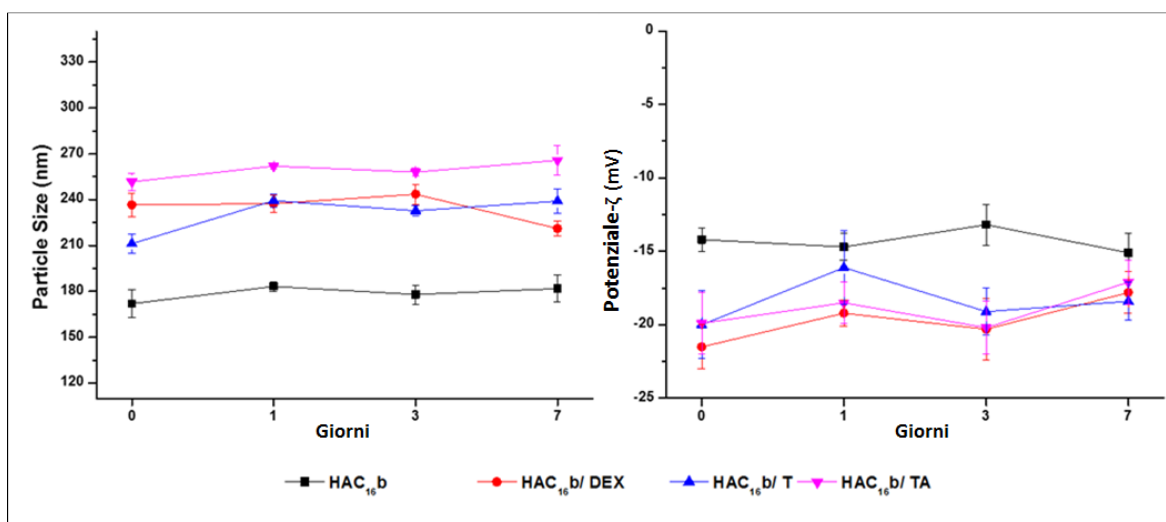


Figura 23. Stabilità delle micelle HAC₁₆**b** (■ nero), HAC₁₆**b**/DEX (● rosso), HAC₁₆**b**/T (▲ blu) HAC₁₆**b**/TA (▼ rosa), in termini di *particle size* (nm) (sinistra) e potenziale- ζ (destra) in DPBS, a 25°C per 7giorni

Allo scopo di valutare la citocompatibilità delle micelle HAC₁₆**b**, presupponendo una somministrazione oculare topica, le cellule HCEpiC (*Human Corneal Epithelial Cells*) sono state trattate con concentrazioni differenti di dispersione micellare, e dopo 6 e 24 ore è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS. I risultati riportati in Figura 24 confermano che la vitalità cellulare è superiore al 70%, se confrontata con un sistema controllo (cellule non trattate) (ISO 10993-5).

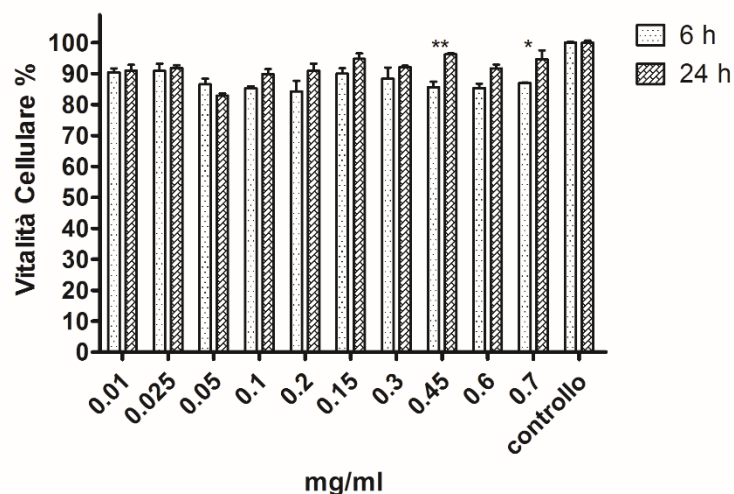


Figura 24. Vitalità cellulare % delle HCEpiC dopo 6 e 24 ore di trattamento con le micelle HAC_{16b} a differente concentrazione (mg/ml)

Gli esperimenti di permeazione attraverso un monostrato di cellule epiteliali della cornea sono stati condotti *in vitro* usando un sistema *transwell*, allo scopo di mimare la resistenza corneale alla permeazione dei farmaci idrofobici. Innanzitutto, le dispersioni micellari HAC_{16b}/DEX, HAC_{16b}/T e HAC_{16b}/TA sono state caratterizzate dopo sterilizzazione mediante filtrazione su 0.22 μm . I dati ottenuti permettono di affermare che il processo di sterilizzazione non altera né le caratteristiche dimensionali dei sistemi né i loro valori di *drug loading* (Tabella 6).

Tabella 6. Valori di DL% (p/p), *particle size* (nm), PDI, potenziale- ζ (mV) delle micelle HAC_{16b}, HAC_{16b}/DEX, HAC_{16b}/T e HAC_{16b}/TA pre- e post-filtrazione (0.22 μm) disperse in mezzo di coltura cellulare

Micelle HAC _{16b}	Pre-filtrazione				Post-filtrazione			
	DL %	<i>Particle Size</i>	PDI	Potenziale- ζ	DL%	<i>Particle Size</i>	PDI	Potenziale- ζ
Vuote	/	185.7 \pm 9.2	0.108	-16.1 \pm 1.7	/	171.2 \pm 6.7	0.136	-14.9 \pm 1.8
DEX	4.1 \pm 0.1	223.5 \pm 5.1	0.041	-14.6 \pm 1.3	3.9 \pm 0.3	192.2 \pm 14.4	0.271	-15.6 \pm 3.1
T	5.0 \pm 0.1	221.3 \pm 3.9	0.238	-11.5 \pm 2.4	5.1 \pm 0.2	232.5 \pm 12.9	0.235	-13.7 \pm 5.1
TA	2.9 \pm 0.2	254.8 \pm 6.7	0.281	-16.1 \pm 0.7	2.7 \pm 0.3	216.2 \pm 15.6	0.251	-15.7 \pm 3.7

Inoltre è stata confermata la stabilità delle micelle polimeriche (vuote e cariche di corticosteroidi) in mezzo cellulare fino a 7 giorni, sia in termini di *particle size* che di potenziale- ζ (Figura 25).

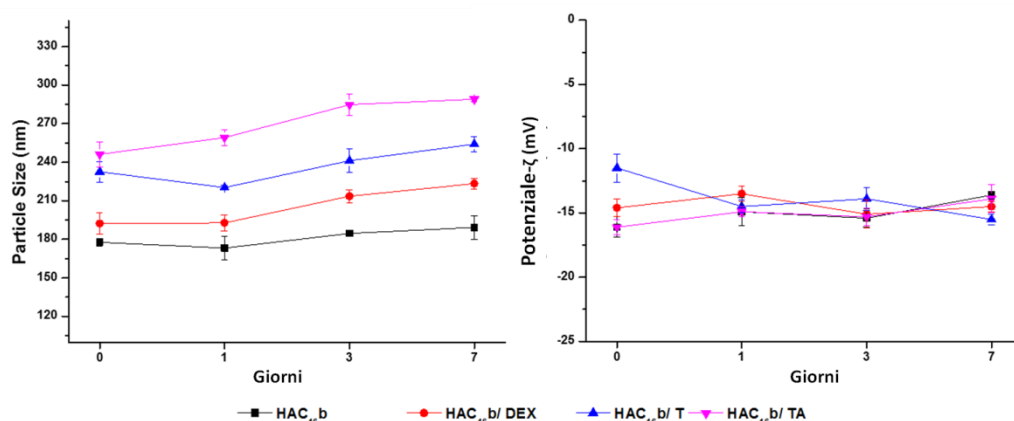


Figura 25. Stabilità delle micelle HAC₁₆b (■ nero), HAC₁₆b/DEX (● rosso), HAC₁₆b/T (▲ blu) HAC₁₆b/TA (▼ rosa), in termini di *particle size* (nm) (sinistra) e potenziale-ζ (destra) in mezzo cellulare completo, a 37°C per 7giorni

Le dispersioni micellari HAC₁₆b/DEX, HAC₁₆b/T e HAC₁₆b/TA o le soluzioni dei farmaci sono state opportunamente caricate nel compartimento donatore del sistema *transwell*; sono stati così ricavati i profili di permeazione del DEX, T e TA, ed è stata valutata la percentuale di farmaco residua nelle diverse strutture del sistema *transwell* alla fine dello studio (dopo 6 ore) (Figura 26). La quantità di farmaco ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di DEX, T e TA permeata utilizzando le micelle polimeriche risulta essere statisticamente più alta rispetto a quella ottenuta utilizzando le soluzioni di farmaco ($p < 0.001$); inoltre, con i sistemi micellari è possibile minimizzare la ritenzione del DEX e T nelle cellule. Per quanto riguarda il TA, è importante ricordare che il farmaco è solubilizzato inizialmente in solvente organico (metanolo) e successivamente diluito in mezzo cellulare, per ottenere una soluzione utilizzabile per questo studio. Tuttavia, le tracce di metanolo inevitabilmente presenti (pari all'1% v/v) probabilmente modificano l'integrità del *monolayer* cellulare, determinando un'eccessiva permeazione del farmaco. Pertanto, i risultati ottenuti per il triamcinolone acetonide sono differenti rispetto a quelli ottenuti per gli altri corticosteroidi studiati.

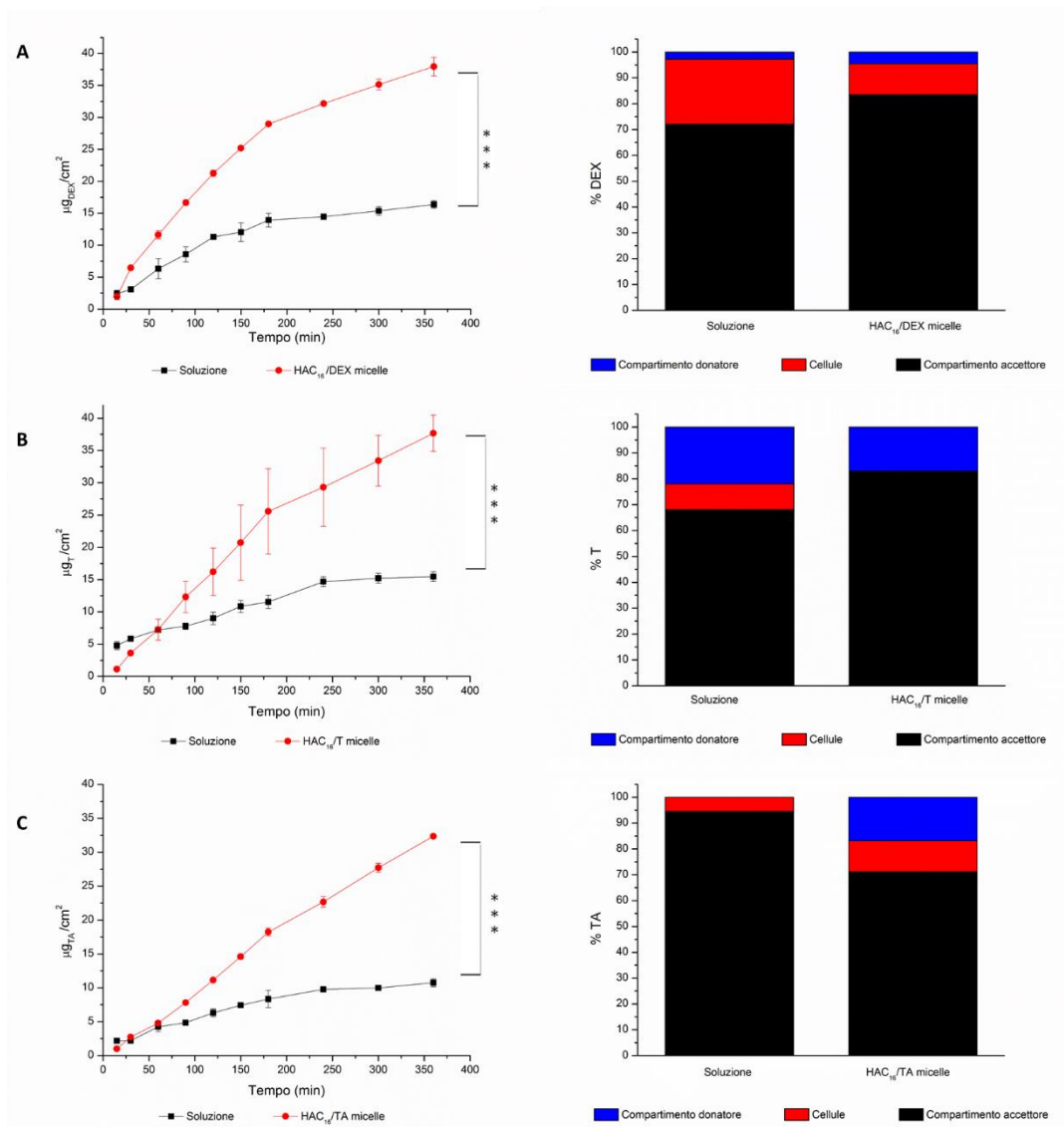


Figura 26. Profili di permeazione trans-corneale *in vitro* del DEX (**pannello A**), T (**pannello B**) e TA (**pannello C**) usando una soluzione di farmaco (■ nero) o le micelle HAC₁₆ cariche di farmaco (● rosso). **SINISTRA:** µg/cm² di farmaco permeato in funzione del tempo; **DESTRA:** quantità di farmaco % nei compartimenti donatore (rosso), cellulare (blu) e accettore (nero)

Gli studi di permeazione trans-corneale *ex vivo* sono stati condotti utilizzando le cornee bovine; è possibile mantenere l'integrità del tessuto asportato utilizzando diverse tipologie di tamponi e senza la necessità di aggiungere nutrienti specifici [249,250]. Questa è la ragione per cui in questo studio le cornee bovine sono state utilizzate, subito dopo l'esportazione, come membrana nelle celle di diffusione verticale di Franz; come mezzo isotonico è stato utilizzato il tampone HEPES. Inizialmente, il modello di permeazione trans-corneale *ex vivo* preparato è stato convalidato utilizzando la fluoresceina sodica (FLUO) e il diclofenac sodico (DICL) come molecole modello; in particolare, è stato calcolato il coefficiente di permeabilità (K_P) per entrambe le molecole utilizzate, e i risultati sono stati confrontati con i dati riportati in letteratura (Tabella 7).

Tabella 7. Validazione del modello di permeazione *ex vivo*; valori di K_p (cm/s) relativi alla fluoresceina sodica e al diclofenac sodico attraverso la cornea bovina

FLUO		DICL	
K_p SPERIMENTALE	K_p RANGE [251]	K_p SPERIMENTALE	K_p RANGE [249]
$7.46 \cdot 10^{-7}$	$8 - 12 \cdot 10^{-7}$	$2.52 \cdot 10^{-5}$	$0.96 - 2.3 \cdot 10^{-5}$

I valori ottenuti sperimentalmente rientrano esattamente nei range riportati in letteratura; pertanto è confermata la validità del modello messo a punto, soprattutto considerando il risultato ottenuto per la fluoresceina sodica, che è ritenuta un *marker* di integrità tissutale.

Il profilo di permeazione trans-corneale *ex vivo* per ogni farmaco caricato nelle micelle HAC_{16b} è stato confrontato con il profilo di permeazione del farmaco in soluzione e in sospensione, allo scopo di valutare il ruolo del *carrier* micellare di aumentare la penetrazione e/o la permeazione attraverso la cornea (Figura 27). Utilizzando le micelle HAC_{16b}, la permeazione del desametasone attraverso la barriera corneale aumenta di 1.60 volte rispetto alla sospensione di farmaco ($p < 0.05$) (Figura 27-pannello A), mentre nel caso del triamcinolone si ha un incremento di 1.63 volte ($p > 0.001$) (Figura 27- pannello B). Il triamcinolone acetone non è in grado di permeare la cornea quando si utilizza in forma di sospensione (Figura 27- pannello C), al contrario di quanto avviene invece quando caricato all'interno delle micelle polimeriche HAC_{16b}.

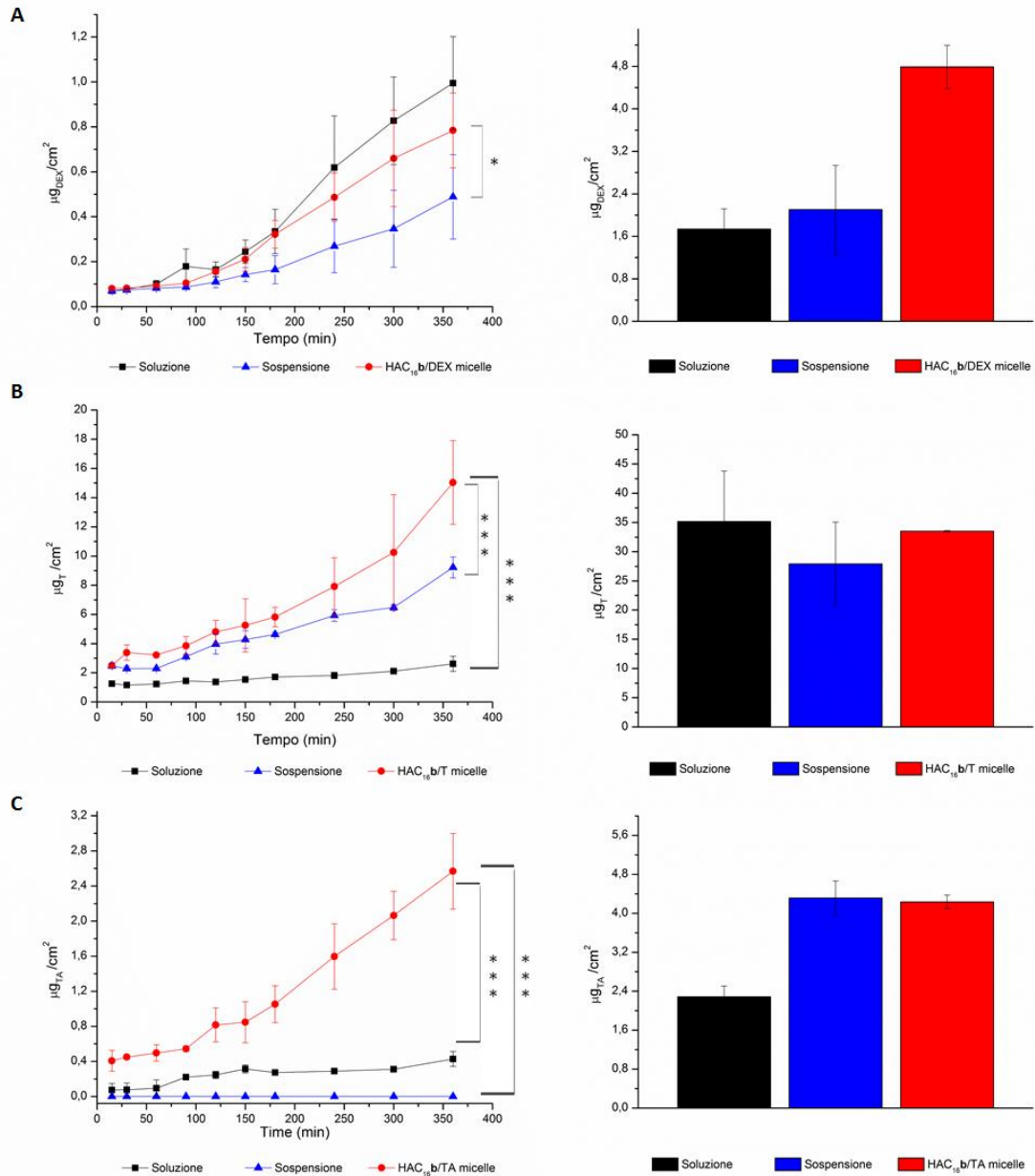


Figura 27. Profili di permeazione trans-corneale *ex vivo* del DEX (**pannello A**), T (**pannello B**) e TA (**pannello C**) usando una soluzione di farmaco (■ nero), una sospensione di farmaco (▲ blu) o le micelle HAC₁₆b cariche di farmaco (● rosso). **SINISTRA:** µg/cm² di farmaco permeato in funzione del tempo; **DESTRA:** µg/cm² di farmaco trattenuto nella cornea alla fine dell'esperimento

Quindi i vantaggi riscontrati sono relativi non solo al DEX e al T, ma soprattutto al TA. I dati ottenuti suggeriscono che le micelle HAC₁₆b sono in grado di incrementare la permeazione delle molecole idrofobiche attraverso la barriera corneale; il derivato anfifilico che costituisce le micelle probabilmente interagisce con la struttura corneale, anch'essa di natura anfifilica, facilitando così il fenomeno di permeazione.

Sebbene le micelle siano in grado di promuovere la permeazione trans-corneale dei corticosteroidi, la quantità di farmaco trattenuta nella cornea è differente probabilmente

perché i tre farmaci studiati posseggono proprietà chimicofisiche diverse (come ad esempio diversi valori di LogP). Il desametasone (LogP = 1.83) è probabilmente in grado di interagire con le strutture lipofile della cornea (epitelio e membrana di Bowman) piuttosto che con lo stroma idrofilo. Le micelle aumentano la ritenzione del farmaco di 2.28 volte rispetto alla sospensione di DEX; in questo caso quindi è evidente il ruolo delle micelle HAC_{16b} di agire sia come *penetration* che come *permeation enhancer*.

La ritenzione corneale del triamcinolone e del triamcinolone acetone è meno evidente. Probabilmente il triamcinolone interagisce sia con le componenti lipofile che idrofile della cornea (LogP = 1.16); una elevata quantità di farmaco è in grado di interagire con il tessuto (la ritenzione aumenta di 1.20 volte rispetto alla sospensione) e di attraversare questa barriera. Al contrario, il triamcinolone acetone in sospensione probabilmente interagisce con l'epitelio corneale (lipofilo) ma non è in grado di oltrepassarlo (LogP = 2.53); quindi il vantaggio dell'impiego delle micelle HAC_{16b} è ulteriormente evidente (Figura 27 – pannello C). I dati ottenuti suggeriscono che questo sistema promuove la permeazione del TA probabilmente modificando temporaneamente la barriera corneale e facilitando il passaggio del farmaco; il loro ruolo di *permeation enhancer* è evidente e preponderante rispetto al ruolo di *penetration enhancer*. Tuttavia, la barriera corneale potrebbe essere considerata come un compartimento *depot* dal quale le molecole di farmaco possono diffondere nel tempo e raggiungere le strutture oculari sottostanti.

Per dimostrare l'effettivo vantaggio delle micelle HAC_{16b} realizzate nell'aumentare la permeazione trans-corneale *in vitro* ed *ex vivo* dei farmaci idrofobici incorporati, sono stati calcolati i flussi (J_s) e i coefficienti di permeabilità (K_p) del DEX, T e TA. I valori sono stati calcolati allo *steady state* per unità di area attraverso un'analisi di regressione lineare dei dati di permeazione ottenuti dagli studi precedenti, utilizzando l'equazione

$$J_s = Q (A t)^{-1} (\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}) \quad (1)$$

dove Q è la quantità (μg) che permea attraverso la barriera considerata e che raggiunge il compartimento accettore, A è l'area disponibile per la permeazione (0.33 cm² per lo studio *in vitro*, 1.1304 cm² per lo studio *ex vivo*), e t è il tempo di esposizione (h). Il coefficiente di permeabilità (K_p) è calcolato utilizzando l'equazione

$$K_p = J_s C_D (\text{cm h}^{-1}) \quad (2)$$

dove C_D è la concentrazione del farmaco utilizzato nel compartimento donatore ($\mu\text{g cm}^{-3}$). Calcolando il K_p , la differenza in termini di concentrazione di farmaco usato tra la

soluzione, la sospensione e le micelle HAC_{16b} è normalizzata, e pertanto i valori sono confrontabili [252]. I dati sono riportati in Tabella 8.

Tabella 8. Valori di J_S ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) e K_P (cm h^{-1}) del DEX, T e TA usati in forma di soluzione, sospensione e caricati in micelle HAC_{16b} relativi allo studio di permeazione trans-corneale *in vitro* ed *ex vivo*

	<i>IN VITRO</i>		<i>EX VIVO</i>	
	J_S	K_P	J_S	K_P
DEX soluzione	3.962 ± 0.224	0.07921 ± 0.00231	0.217 ± 0.009	0.00434 ± 0.00002
DEX sospensione	/	/	0.093 ± 0.005	0.00019 ± 0.00001
HAC_{16b}/DEX	9.607 ± 0.148	0.09611 ± 0.00151	0.208 ± 0.013	0.00042 ± 0.00002
T soluzione	2.667 ± 0.251	0.05331 ± 0.00451	0.281 ± 0.017	0.00562 ± 0.00005
T sospensione	/	/	1.227 ± 0.109	0.00245 ± 0.00002
HAC_{16b}/T	11.334 ± 0.943	0.11331 ± 0.00941	3.125 ± 0.117	0.00625 ± 0.00004
TA soluzione	2.244 ± 0.245	0.08981 ± 0.00411	0.033 ± 0.079	0.00132 ± 0.00015
TA sospensione	/	/	non calcolato	non calcolato
HAC_{16b}/TA	6.389 ± 0.289	0.06391 ± 0.00291	0.513 ± 0.031	0.00103 ± 0.00010

È evidente che le micelle HAC_{16b} sono in grado di agire *in vitro* come *permeation enhancer* aumentando non solo il flusso del DEX, T e TA attraverso il *monolayer* cellulare, ma anche i valori di K_P . In particolare, usando le micelle, il valore di K_P del DEX e del T aumentano rispettivamente di 1.21 e 2.13 volte rispetto al farmaco in soluzione. Nel caso del TA, il K_P del farmaco in soluzione è apparentemente più alto rispetto a quello ottenuto con le micelle HAC_{16b}/TA, probabilmente perché la presenza del metanolo residuo determina un'alterazione della membrana epiteliale [253]. Come precedentemente specificato, l'impiego del metanolo è necessario per solubilizzare il farmaco, mentre utilizzando le micelle polimeriche il solvente organico non è necessario. Pertanto, i due valori di K_P ottenuti non sono confrontabili.

Per lo studio di permeazione trans-corneale *ex vivo*, tutti i valori di J_S e K_P sono più piccoli rispetto ai rispettivi valori ottenuti dallo studio *in vitro*, a causa della complessità strutturale della cornea. Per il DEX, i valori di J_S ottenuti per la soluzione e le micelle polimeriche risultano essere pressoché uguali; di conseguenza il valore di K_P per le micelle è più basso rispetto alla soluzione. Nei confronti della sospensione, per le micelle HAC_{16b}/DEX si ottiene un incremento del valore di J_S e K_P di 2.23 e 2.21 volte, e della ritenzione corneale di 2.28 volte. Quindi è realmente evidente il ruolo delle micelle polimeriche HAC_{16b} di agire come *penetration* e *permeation enhancer* per il desametasone.

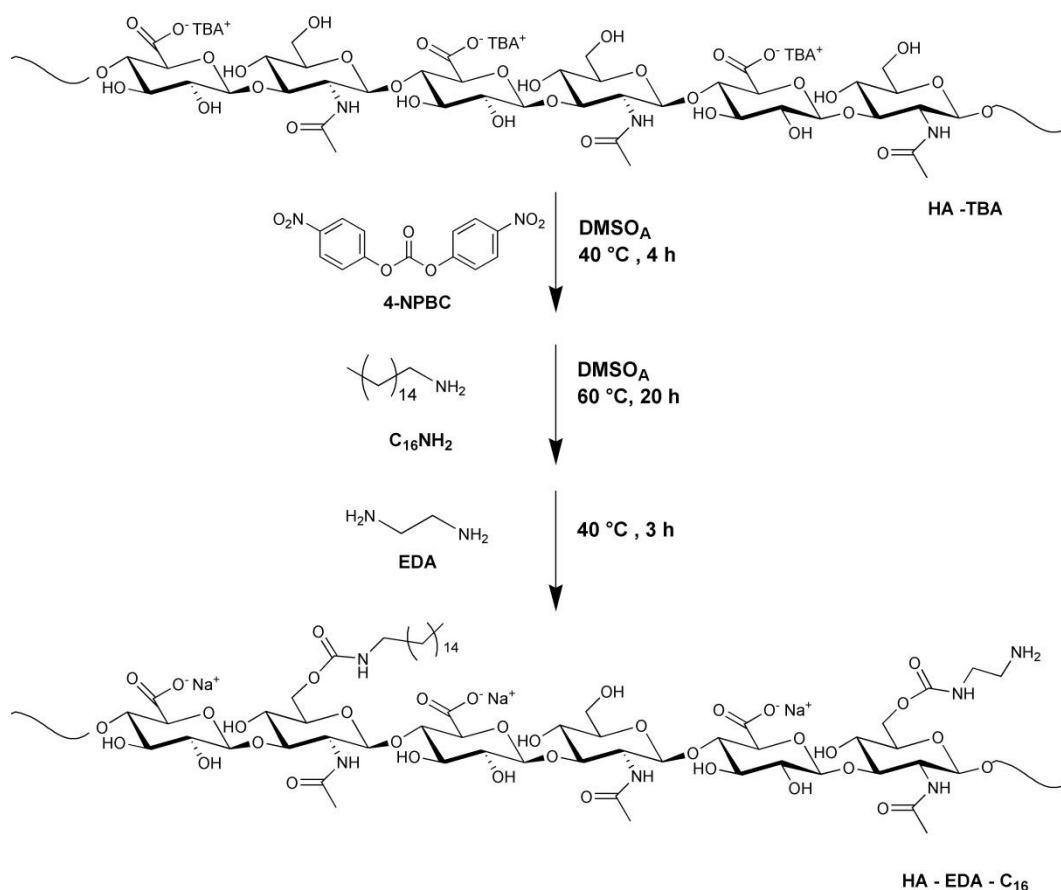
Per quanto riguarda il triamcinolone, con l'impiego delle micelle il valore di K_P aumenta di 1.12 volte rispetto alla soluzione, e di 2.55 volte rispetto alla sospensione; per questo farmaco, il sistema *carrier* sembrerebbe agire come *permeation enhancer*.

Per il triamcinolone acetone, i valori di K_P ottenuti per le micelle e la soluzione sono simili, ma dobbiamo nuovamente ribadire che il confronto non può essere preso in considerazione perché la presenza del metanolo (impiegato esclusivamente per la preparazione della soluzione di TA) probabilmente altera il processo di permeazione. Inoltre, è importante ricordare che il TA in sospensione non permea attraverso la barriera corneale.

In definitiva, dall'analisi dei dati ottenuti è possibile confermare che le micelle HAC_{16b} sono in grado di interagire con l'epitelio corneale e di agire *in vitro* come *permeation enhancers* per i corticosteroidi incorporati. Tale effetto è meno evidente negli studi *ex vivo* a causa della complessità della cornea, ma è possibile rimarcare il reale vantaggio nell'impiego delle micelle polimeriche in confronto alle sospensioni di farmaco utilizzate convenzionalmente.

3.2.2 Micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN

Partendo dai risultati positivi ottenuti per le micelle polimeriche HAC₁₆**b** preparate, la ricerca tecnologica svolta è stata indirizzata verso la preparazione di nuove micelle polimeriche costituite da un nuovo derivato anfifilico esadecilamminico dell'HA_{MINI} siglato HA-EDA-C₁₆. Il processo di sintesi chimica ha innanzitutto previsto la preparazione di diversi derivati anfifilici allo scopo di ottenere un grado di funzionalizzazione in esadecilammina pari al 12%, valore caratteristico del derivato HAC₁₆**b** studiato precedentemente. Sono stati preparati tre diversi derivati polimerici partendo dall'HA_{MINI}-TBA e utilizzando una strategia sintetica costituita da due step consecutivi senza isolamento degli intermedi di reazione (Schema 3).



Schema 3. Schema di sintesi dei derivati polimerici HA-EDA-C₁₆

I gruppi ossidrilici primari dell'HA, previa attivazione con il 4-NPBC secondo un rapporto molare teorico fisso, sono stati funzionalizzati con l'esadecilammina e successivamente con l'etilendiammina, secondo rapporti molarli teorici tra le mol C₁₆NH₂ e le mol 4-NPBC

differenti, allo scopo di modulare la porzione idrofobica legata al backbone idrofilo di HA. La funzionalizzazione in EDA invece è stata condotta secondo un rapporto molare teorico fisso opportuno, con lo scopo di saturare tutti i gruppi ossidrilici preventivamente attivati e che non sono stati funzionalizzati con l'esadecilammina. I tre derivati HA-EDA-C₁₆ sintetizzati (siglati **A**, **B** e **C**), solubili in acqua e in diversi tamponi isotonici, sono stati caratterizzati tramite analisi ¹H-NMR per determinare il grado di derivatizzazione molare in C₁₆ (DD_{C16}mol%) (Figura 28), e mediante saggio colorimetrico TNBS per valutare la funzionalizzazione in etilendiammina (DD_{EDAMol%}).

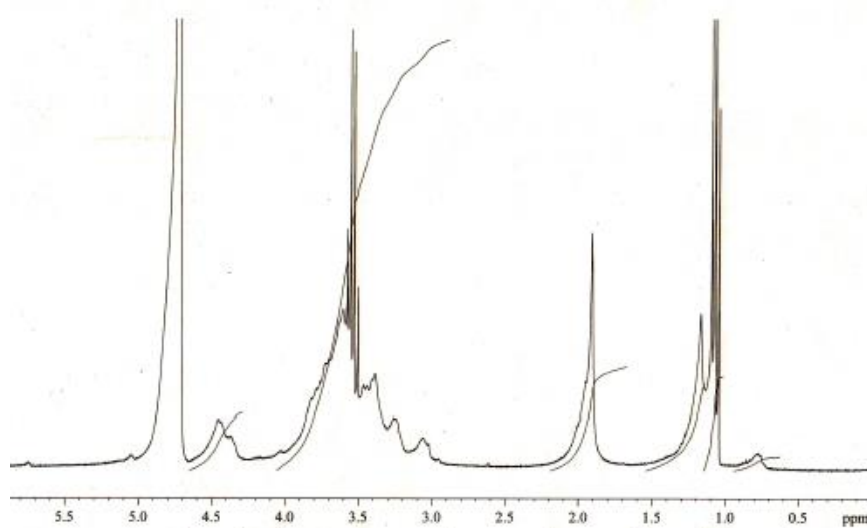


Figura 28. Spettro ¹H-NMR del derivato HA-EDA-C₁₆

Come aspettato, i derivati HA-EDA-C₁₆**A**, HA-EDA-C₁₆**B** e HA-EDA-C₁₆**C** mostrano un valore di DD_{C16}mol% crescente all'aumentare del valore di Y impostato, mentre di conseguenza il grado di funzionalizzazione in etilendiammina diminuisce progressivamente (Tabella 9).

Tabella 9. Rapporto molare teorico X (mol 4-NPBC/mol u.r.HA), Y (mol C₁₆NH₂/mol 4-NPBC) e Z (mol EDA/mol 4-NPBC), DD_{C16}mol% (calcolato tramite analisi ¹H-NMR), DD_{EDAMol%} (calcolato tramite saggio TNBS) e resa % in peso (calcolata rispetto l'HA_{MINI} di partenza) dei derivati HA-EDA-C₁₆**A**, **B** e **C** sintetizzati

HA-EDA-C ₁₆	X	Y	Z	DD _{C16} mol%	DD _{EDAMol%}	Resa %
A	0.70	0.30	2	12.2 ± 0.03	48.4 ± 0.8	81.7 ± 3.1
B	0.70	0.20	2	7.4 ± 0.08	60.4 ± 2.5	87.4 ± 2.8
C	0.70	0.15	2	5.5 ± 0.10	65.3 ± 0.8	79.4 ± 1.9

Sebbene impostando opportuni valori teorici molari ($X= 0.70$, $Y = 0.30$ e $Z= 2$) è possibile ottenere un derivato anfifilico con un $DD_{C16mol\%}$ pari al 12%, per tutti i derivati è stato condotto il saggio del pirene per valutare se la presenza dell'EDA possa influenzare il grado di *self-assembly*, I dati ottenuti sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10. Valori di CAC (mg/ml) dei derivati HA-EDA-C16**A**, **B** e **C** in acqua, DPBS e tampone HEPES

HA-EDA-C ₁₆	DD _{C16mol%}	CAC (mg/ml)		
		H ₂ O	DPBS	HEPES pH 7.4
A	12.2 ± 0.03	0.233 ± 0.014	0.119 ± 0.015	0.121 ± 0.010
B	7.4 ± 0.08	0.330 ± 0.011	0.160 ± 0.004	0.170 ± 0.007
C	5.5 ± 0.10	0.450 ± 0.002	0.380 ± 0.006	0.360 ± 0.004

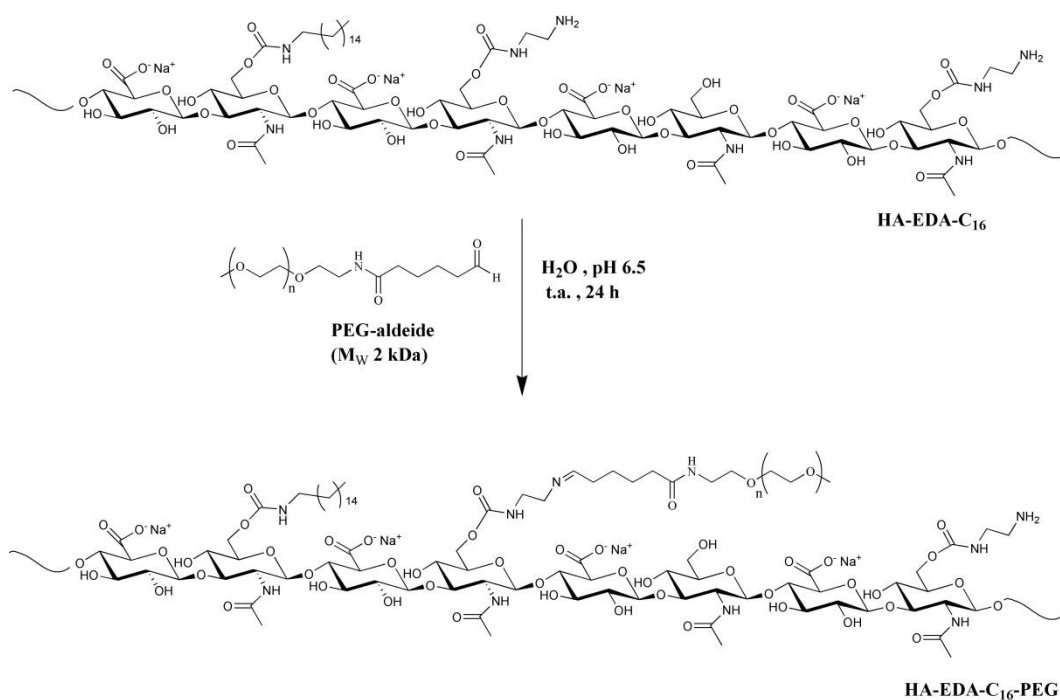
All'aumentare del $DD_{C16mol\%}$, i derivati polimerici posseggono dei valori di CAC (mg/ml) più piccoli, probabilmente grazie alla presenza di un numero maggiore di catene alchiliche idrofobiche che costituiscono il core micellare. Inoltre, le concentrazioni critiche di aggregazione risultano essere più basse in DPBS e in tampone HEPES pH 7.4, piuttosto che in acqua bidistillata, poiché i derivati sono sensibili alla forza ionica dei tamponi. I valori di CAC ottenuti per i tre derivati anfifilici sono adeguati per un'eventuale somministrazione oculare topica, presupponendo una loro potenziale stabilità dopo la somministrazione e la diluizione con i fluidi biologici.

La strategia di sintesi attuata (Schema 3) ha permesso quindi di modulare il grado di funzionalizzazione in esadecilammina ed etilendiammina dell'acido ialuronico di partenza. In particolare, è stato possibile ottenere un derivato con un $DD_{C16mol\%}$ pari al 12%, proprietà prefissata all'inizio di questa fase di ricerca. È stato dimostrato che la presenza dell'EDA sul *backbone* di HA non influenza il *self assembly* del derivato polimerico, che ha mostrato infatti dei valori di CAC analoghi a quelli ottenuti per il derivato HAC_{16b} (anch'esso caratterizzato da un $DD_{C16mol\%}$ pari al 12%, paragrafo 3.2.1) in diversi mezzi acquosi.

Pertanto, per proseguire lo studio è stato selezionato esclusivamente il derivato **A**, che da adesso sarà indicato semplicemente con la sigla HA-EDA-C₁₆.

La funzionalizzazione in etilendiammina dell'HA-EDA-C₁₆ è stata condotta per aumentare la versatilità chimica del derivato, allo scopo di preparare micelle polimeriche in cui lo *shell* idrofilo esterno sia funzionalizzato con molecole che possano migliorare il riconoscimento tissutale e la permeazione trans-corneale.

È stato sintetizzato il derivato PEGilato dell'HA-EDA-C₁₆, siglato HA-EDA-C₁₆-PEG. Il PEG (M_w tra 750 e 5000 Da) è ampiamente utilizzato per la progettazione di DDS al fine di sfruttare il suo carattere mucoadesivo e per la sua capacità di agire come *permeation enhancer* trans-corneale. Per lo scopo prefissato in questo lavoro, è stato utilizzato il PEG con un M_w di 2000 Da al fine di incrementare ulteriormente sia la mucoadesione del sistema che la sua permeazione trans-corneale. Il derivato HA-EDA-C₁₆-PEG è stato sintetizzato partendo dal derivato HA-EDA-C₁₆, seguendo una procedura di sintesi *one-pot* in cui una parte dei gruppi amminici dell'EDA reagiscono con il gruppo aldeidico terminale del PEG utilizzato (Schema 4).



Schema 4. Schema di sintesi del derivato polimerico HA-EDA-C₁₆-PEG

In Figura 29 è riportato lo spettro ¹H-NMR del derivato PEGilato sintetizzato; il grado di derivatizzazione molare in PEG (DD_{PEGmol}%), pari al 6% ± 1.2, è stato calcolato rapportando l'integrale del picco a δ 3.7 (relativo ai protoni metilenici del PEG) con l'integrale del picco a δ 1.9 (relativo ai protoni metilici della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA).

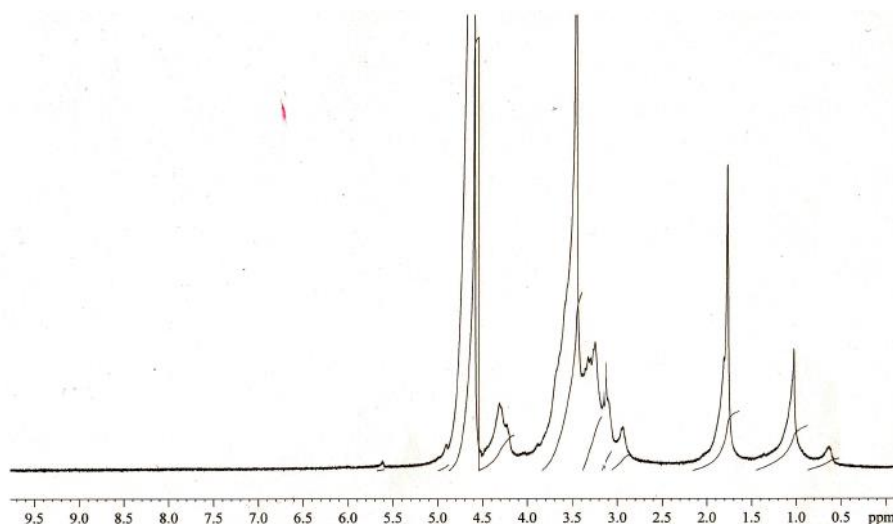


Figura 29. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato HA-EDA- C_{16} -PEG

Il saggio colorimetrico TNBS condotto sul derivato HA-EDA- C_{16} -PEG ha permesso di confermare tale grado di derivatizzazione molare. Il polimero è stato ulteriormente caratterizzato mediante analisi FT-IR; lo spettro ottenuto è stato confrontato con quello relativo al polimero HA-EDA- C_{16} e al PEG-aldeide utilizzato per la sintesi (Figura 30).

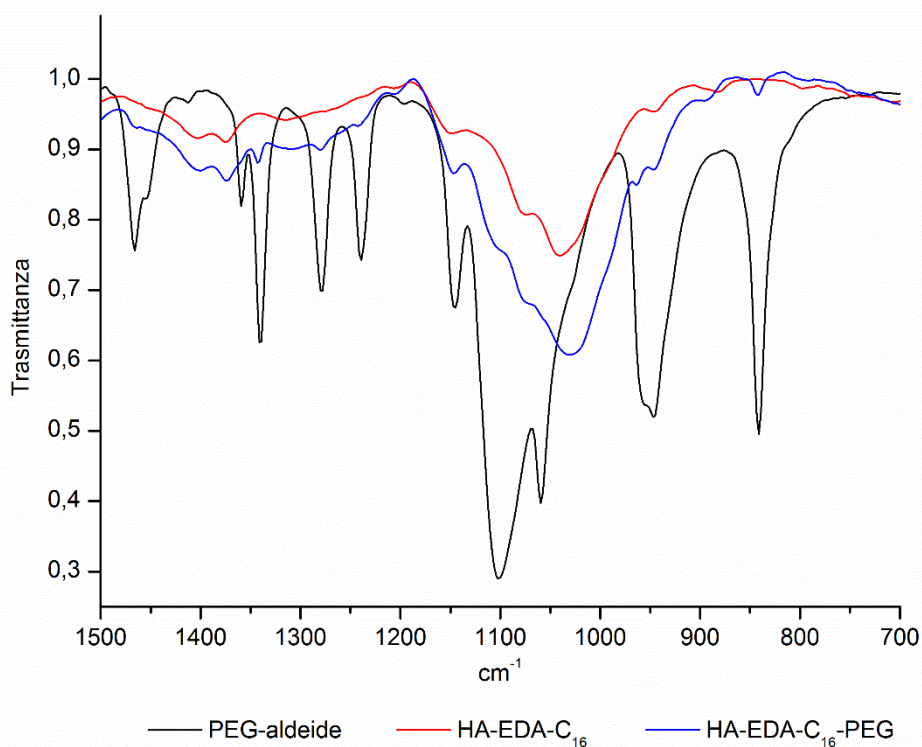


Figura 30. Sovrapposizione degli spettri FT-IR del PEG-aldeide (- nero), del derivato polimerico HA-EDA- C_{16} (- rosso) e del derivato polimerico HA-EDA- C_{16} -PEG (- blu)

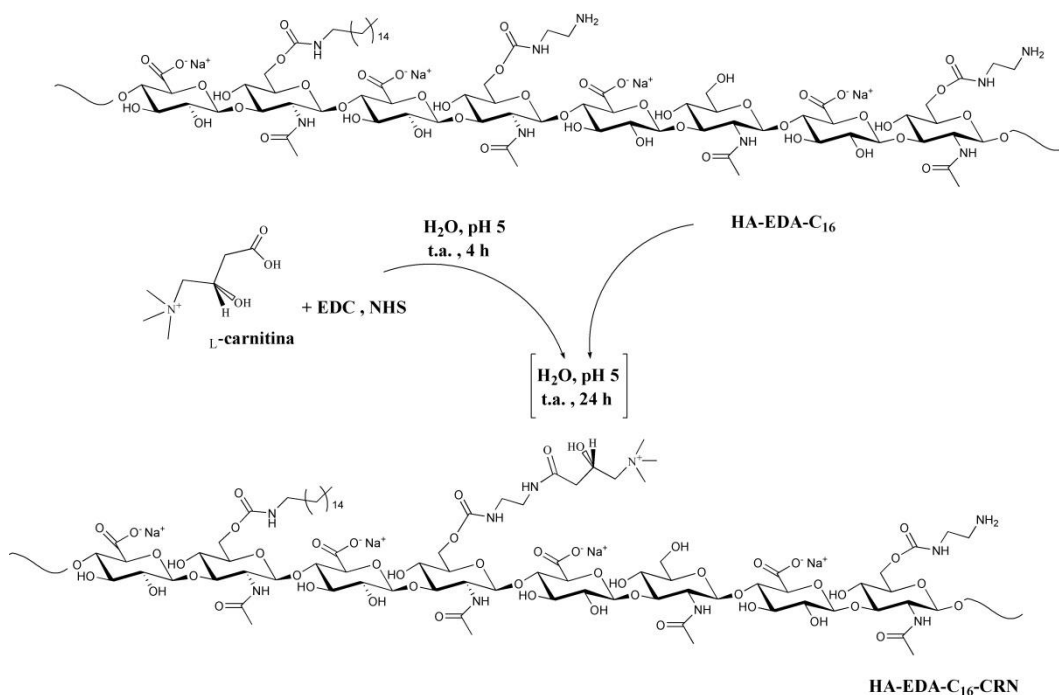
Lo spettro FT-IR del derivato HA-EDA-C₁₆-PEG è caratterizzato dalla presenza delle bande relative allo *scissoring* ed al *bending* dei gruppi C-H del PEG tra 1450 e 1300 cm⁻¹, e dalla banda a circa 800 cm⁻¹ relativa al *bending* del legame N-H.

Inoltre è stata valutata la CAC (mg/ml) del derivato in acqua bidistillata, DPBS e tampone HEPES pH 7.4 (Tabella 11).

Tabella 11. Valori di DD_{PEG}mol%, resa % in peso, CAC (mg/ml) del derivato HA-EDA-C₁₆-PEG in acqua, DPBS e tampone HEPES pH 7.4

molPEG/mol u.r.HA	DD _{PEG} mol%	Resa %	CAC (mg/ml)		
			H ₂ O	DPBS	HEPES pH 7.4
0.10	6 ± 1.2	85.1 ± 2.3	0.387 ± 0.017	0.138 ± 0.002	0.139 ± 0.014

Parallelamente è stato sintetizzato il derivato HA-EDA-C₁₆-CRN mediante funzionalizzazione del derivato HA-EDA-C₁₆ con la L-carnitina, un aminoacido a catena corta costitutivamente presente nel film lacrimale dove svolge un'importante funzione osmoregolatoria. La L-carnitina è stata scelta per la funzionalizzazione delle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆ con l'obiettivo di sfruttare i diversi trasportatori per le ammine organiche (compresa la L-carnitina) presenti sull'epitelio corneale, per aumentare il riconoscimento cellulare del sistema micellare e quindi migliorarne ulteriormente la permeazione trans-corneale. Per la sintesi del derivato HA-EDA-C₁₆-CRN, il gruppo carbossilico della L-carnitina, previa attivazione via EDC/NHS, è fatto reagire con i gruppi amminici liberi delle porzioni etilendiamminiche (Schema 5).



Schema 5. Schema di sintesi del derivato polimerico HA-EDA-C₁₆-CRN

Il derivato ottenuto è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, ed è stato calcolato un grado di derivatizzazione molare in L-carnitina pari a $7.2\% \pm 2.3$, rapportando l'integrale del picco a δ 2.8 (relativo ai protoni metilici terminali dell'L-carnitina) con l'integrale del picco a δ 1.9 (relativo ai protoni metilici della porzione N-acetil-glucosamminica dell'HA) (Figura 31).

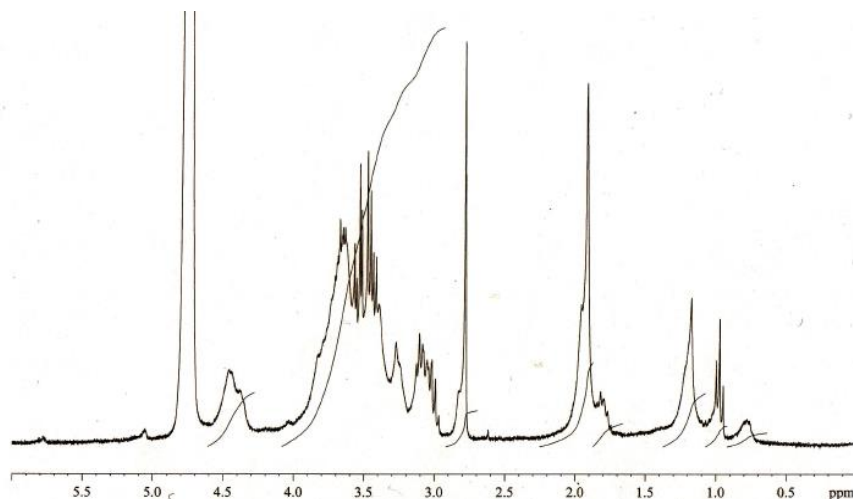


Figura 31. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato HA-EDA-C₁₆-CRN

Il valore ottenuto è stato confermato tramite saggio colorimetrico TNBS; è stata inoltre valutata la CAC (mg/ml) del derivato in acqua bidistillata, DPBS e tampone HEPES pH 7.4 (Tabella 12).

Tabella 12. Valori di DD_{CRN} mol%, resa % in peso, CAC (mg/ml) del derivato HA-EDA-C₁₆-CNR in acqua, DPBS e tampone HEPES pH 7.4

molCRN/mol u.r.HA	DD_{CRN} mol%	Resa %	CAC (mg/ml)		
			H ₂ O	DPBS	HEPES pH 7.4
0.10	7.2 ± 2.3	87.3 ± 3.1	0.271 ± 0.005	0.140 ± 0.002	0.111 ± 0.001

Confrontato i valori di CAC (mg/ml) dei derivati HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN è possibile confermare che la funzionalizzazione chimica con il PEG e la L-carnitina non altera le proprietà di *self assembly* del derivato. Pertanto, tutti e tre i derivati sono stati utilizzati per la preparazione delle micelle polimeriche usando il metodo dell'evaporazione del co-solvente; i sistemi ottenuti sono stati caratterizzati tramite analisi di DLS (Tabella 13).

Tabella 13. *Particle size* (nm), PDI e potenziale- ζ (mV) delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN in acqua, DPBS e tampone HEPES pH 7.4

	Mezzo Disperdente	<i>Particle Size</i>	PDI	Potenziale- ζ
HA-EDA-C₁₆	H ₂ O	231.5 ± 9.5	0.221	-37.6 ± 5.6
	DPBS	173.7 ± 7.4	0.293	-14.7 ± 2.8
	HEPES	145.8 ± 6.3	0.284	-10.2 ± 3.1
HA-EDA-C₁₆-PEG	H ₂ O	222.6 ± 2.9	0.198	-26.4 ± 4.9
	DPBS	157.7 ± 9.7	0.187	-10.3 ± 0.8
	HEPES	217.7 ± 11.7	0.204	-10.2 ± 1.1
HA-EDA-C₁₆-CRN	H ₂ O	226.8 ± 6.8	0.219	-20.1 ± 1.1
	DPBS	143.8 ± 4.3	0.176	-12.1 ± 0.9
	HEPES	211.5 ± 6.1	0.191	-10.6 ± 2.3

Dai dati ottenuti è possibile confermare l'influenza positiva della forza ionica sul *self assembly* del derivato HA-EDA-C₁₆, poiché le dimensioni delle micelle in DPBS e in HEPES pH 7.4 sono inferiori rispetto a quelle ottenute in acqua bidistillata; anche per i derivati HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN tale effetto è evidente in DPBS. I valori di potenziale zeta sono sempre negativi, per esposizione dei gruppi carbossilato del *backbone* di HA; i derivati HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN mostrano dei valori di potenziale- ζ meno negativi in acqua bidistillata, confermando la funzionalizzazione dello *shell* idrofilo esterno.

Partendo dalle micelle polimeriche preparate, è stata valutata la proprietà mucoadesiva di ogni derivato mediante uno studio di trasmittanza, paragonando il risultato ottenuto con quello relativo all'interazione tra la mucina e l'HA non funzionalizzato (Figura 32). Per ogni campione studiato si evince che rapidamente si instaura un'interazione stabile e duratura; pertanto il fenomeno risulta essere tempo-indipendente. Tutti i derivati polimerici hanno un carattere mucoadesivo statisticamente migliore rispetto all'HA non funzionalizzato ($p < 0.001$); inoltre la funzionalizzazione chimica del derivato HA-EDA-C₁₆ con il PEG e la L-carnitina permette di migliorare ulteriormente l'interazione con la mucina ($p < 0.05$).

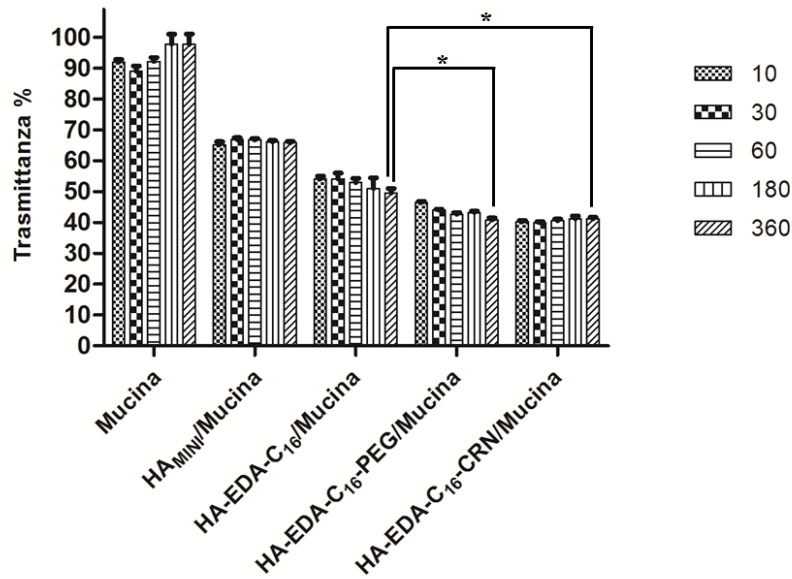


Figura 32. Trasmittanza % della mucina in dispersione e della mucina in miscela con l'HA_{MINI}, le micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN a diversi tempi di incubazione (10-360 minuti)

Quindi, il comportamento mucoadesivo valutato per le tre tipologie di micelle polimeriche risulterebbe essere vantaggioso in prospettiva di una somministrazione oculare topica, poiché potrebbe indurre un potenziale incremento del tempo di ritenzione sulla barriera corneale.

Per valutare il potenziale uso delle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN come *ocular drug carriers* per farmaci idrofobici, sono state preparate le micelle cariche con l'imatinib. L'imatinib è un farmaco inibitorio dell'attività tirosin-chinasica della proteina ABL1; è approvato dall'FDA per il trattamento della leucemia mieloide cronica (inibizione dell'attività tirosin-chinasica della proteina di fusione BCR-ABL1). In questo lavoro di ricerca è proposto l'impiego *off label* dell'imatinib per il trattamento delle retinopatie poiché il target proteico su cui agisce sembra essere coinvolto nel processo di angiogenesi. Infatti, come già riportato precedentemente, la proteina ABL1 è attivata dalla NRP1 (in maniera indipendente dal complesso VEGF/VEGFR2) ed induce la fosforilazione della paxilina, con conseguente rimodellamento dell'actina nelle cellule endoteliali vasali e l'avvio di un processo di *sprouting, branching e fusion* vascolare. Pertanto, l'inibizione di questo *pathway* potrebbe costituire una strategia opportuna per la riduzione del processo di neoangiogenesi caratteristico delle retinopatie.

Per incorporare il farmaco nel core delle micelle polimeriche, è stato utilizzato il metodo dell'evaporazione del co-solvente. I risultati ottenuti in termini di *drug loading %*, *particle size* (nm) e potenziale ζ sono riportati in Tabella 14.

Tabella 14. Valori di DL% (p/p), *particle size* (nm) e potenziale- ζ (mV) delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HAC₁₆-CRN cariche di imatinib (I) in acqua bidistillata, DPBS e tampone HEPES pH 7.4

	DL %	Mezzo Disperdente	Particle Size	PDI	Potenziale- ζ
HA-EDA-C ₁₆ /I	13.1 ± 0.5	H ₂ O	193.3 ± 8.2	0.282	-30.3 ± 3.7
		DPBS	164.1 ± 4.9	0.230	-19.5 ± 2.9
		HEPES	143.7 ± 7.2	0.280	-11.8 ± 1.7
HA-EDA-C ₁₆ -PEG/I	12.6 ± 0.8	H ₂ O	180.4 ± 11	0.208	-22.6 ± 4.3
		DPBS	191.6 ± 8.4	0.184	-18.1 ± 3.8
		HEPES	135.5 ± 11	0.202	-10.9 ± 0.5
HA-EDA-C ₁₆ -CRN/I	11.2 ± 0.4	H ₂ O	165.7 ± 4.9	0.176	-35.8 ± 4.3
		DPBS	143 ± 7.3	0.201	-16.4 ± 1.7
		HEPES	128.9 ± 4.7	0.196	-12.4 ± 1.8

Come è possibile notare, le micelle polimeriche sono in grado di incorporare un'ottimale quantità di farmaco. Inoltre, i sistemi contenenti l'imatinib mostrano dei valori dimensionali inferiori rispetto ai sistemi vuoti; probabilmente, a causa della loro marcata lipofilia ($\text{Log } P_{\text{IMATINIB}} = 3$), le molecole di farmaco si interpongono stabilmente tra le catene alchiliche all'interno della micella, determinando la formazione di un sistema più compatto.

È stata confermata la stabilità delle micelle vuote e cariche di imatinib disperse in DPBS per 7 giorni; in Figura 33 sono riportati i valori di *particle size* ottenuti, mentre i valori di potenziale- ζ restano invariati nell'arco di 7 giorni (dati non mostrati).

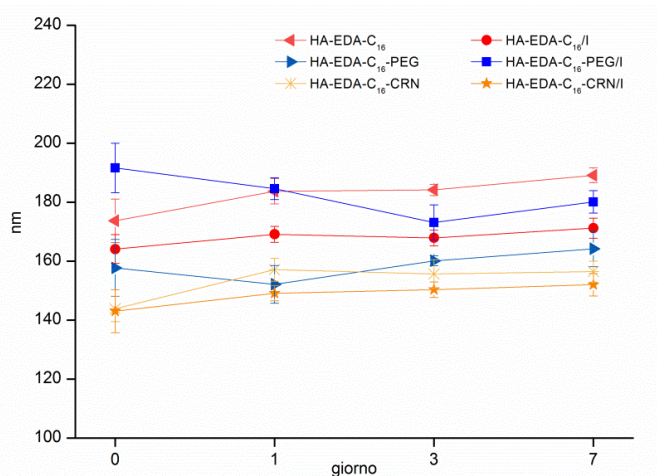


Figura 33. Stabilità in termini di *particle size* (nm) delle micelle vuote e cariche di imatinib in DPBS, a 25°C per 7giorni

Il profilo di rilascio *in vitro* dell'imatinib dalle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN è stato valutato mediante la tecnica della dialisi. Lo studio è stato condotto in DPBS e la quantità di farmaco rilasciata è stata valutata mediante HPLC; i dati sono stati rielaborati ed espressi in percentuale come mg cumulativi di farmaco rilasciato nel tempo (Figura 34). La soluzione e la sospensione di imatinib sono state utilizzate come confronto; in particolare, la soluzione è stata ottenuta solubilizzando preventivamente il farmaco in metanolo e diluendo la soluzione ottenuta in tampone fosfato, mentre la sospensione è stata posta all'interno della dialisi in presenza di un visibile corpo di fondo, al fine di valutarne il profilo di dissoluzione.

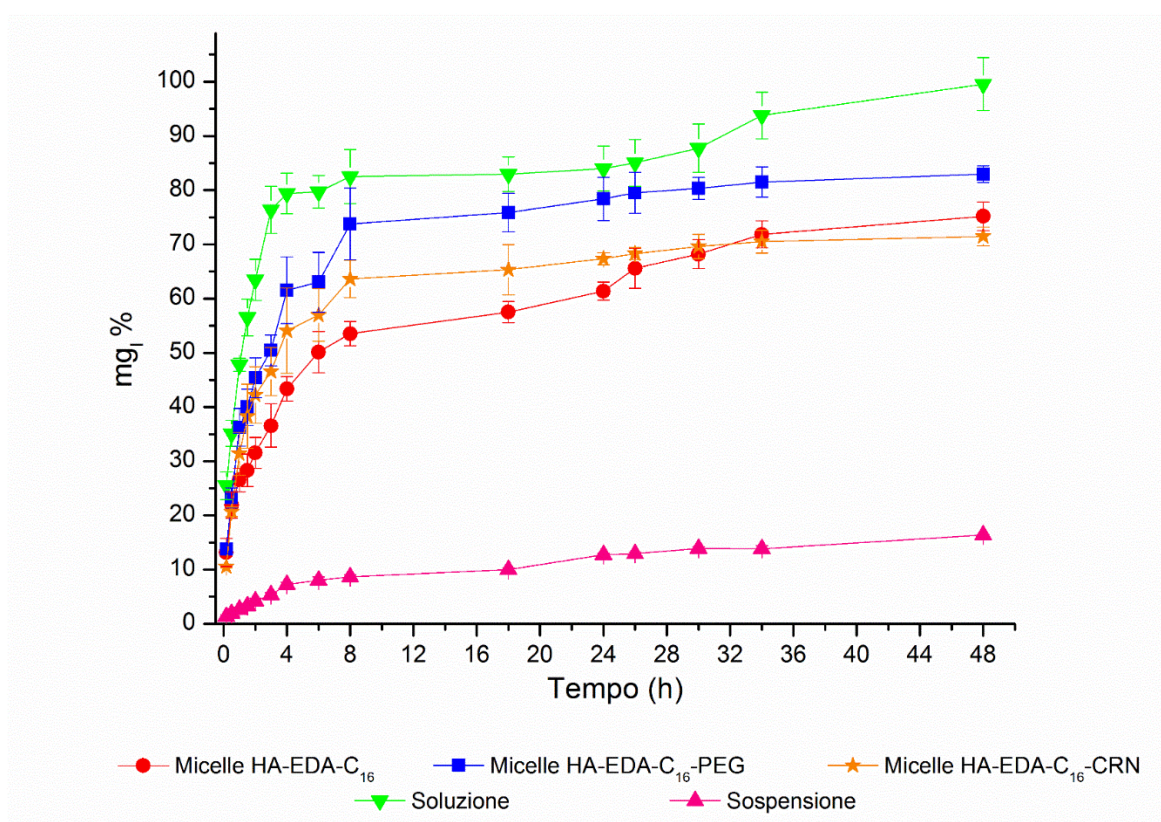


Figura 34. Profilo di rilascio *in vitro* dell'imatinib dalle micelle HA-EDA-C₁₆ (● rosso), HA-EDA-C₁₆-PEG (■ blu) e HA-EDA-C₁₆-CRN (* arancione), e profilo di diffusione del farmaco da una sospensione (▲ rosa) e da una soluzione (▼ verde) attraverso la membrana da dialisi in DPBS

Tutte le micelle preparate sono in grado di rilasciare gradualmente una quantità inferiore all'80% del farmaco incorporato entro le 48 ore; le micelle sono in grado di trattenere parzialmente il farmaco lipofilo incorporato nel core, e di rilasciarlo con un meccanismo che risulta essere idoneo per una somministrazione oculare topica. Confrontando le micelle polimeriche e la sospensione di farmaco, in cui la quantità di imatinib utilizzata è uguale, si osserva un comportamento nettamente diverso. Il farmaco in sospensione (curva rosa)

mostra un profilo di diffusione lento probabilmente a causa di una lenta cinetica di dissoluzione del farmaco solido in DPBS; nel caso delle micelle (curva rossa, blu e arancione), sebbene la quantità di farmaco caricata sia nettamente superiore alla sua solubilità in acqua (0.0146 mg/ml), esso si trova incorporato nel core micellare in una forma “solubilizzata”, pronto e disponibile per fenomeni di diffusione e auspicabilmente di assorbimento.

Quindi, tutte le micelle polimeriche preparate risulterebbero essere vantaggiose rispetto all’impiego del farmaco come tale in soluzione o in sospensione. Inoltre, il profilo di diffusione del farmaco dalle micelle risulta essere conveniente nelle terapie oculari in quanto la dose terapeutica del farmaco è prontamente rilasciata all’inizio dell’applicazione, seguita da un rilascio sostenuto [245].

Affinché le micelle progettate possano essere opportunamente impiegate come *ocular DDS*, deve essere valutata la loro citocompatibilità. Innanzitutto, le dispersioni micellari HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN (vuote e cariche di imatinib) in mezzo di coltura cellulare sono state caratterizzate dopo sterilizzazione mediante filtrazione su 0.22 µm. I dati ottenuti permettono di confermare che il processo di sterilizzazione scelto non altera né le caratteristiche dimensionali dei sistemi né i loro valori di *drug loading* (Tabella 15).

Tabella 15. Valori di DL% (p/p), *particle size* (nm), PDI e potenziale- ζ (mV) delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN vuote e cariche di imatinib pre- e post-filtrazione (0.22 μ m) disperse in mezzo di coltura cellulare

	Pre-filtrazione			
	DL %	Particle Size	PDI	Potenziale- ξ
HA-EDA-C ₁₆	/	169.2 \pm 6.1	0.207	-20.1 \pm 5.0
HA-EDA-C ₁₆ /I	13.1 \pm 0.5	172.8 \pm 2.9	0.197	-17.9 \pm 3.1
HA-EDA-C ₁₆ -PEG	/	161.2 \pm 4.2	0.205	-12.9 \pm 1.8
HA-EDA-C ₁₆ -PEG/I	12.6 \pm 0.8	151.0 \pm 3.4	0.201	-19.1 \pm 3.0
HA-EDA-C ₁₆ -CRN	/	149.6 \pm 5.2	0.179	-17.8 \pm 2.8
HA-EDA-C ₁₆ -CRN/I	11.2 \pm 0.4	149.0 \pm 1.8	0.177	-16.8 \pm 1.9

	Post-filtrazione			
	DL%	Particle Size	PDI	Potenziale- ξ
HA-EDA-C ₁₆	/	175.6 \pm 4.0	0.193	-18.2 \pm 2.6
HA-EDA-C ₁₆ /I	12.8 \pm 0.4	181.0 \pm 6.1	0.179	-19.3 \pm 4.3
HA-EDA-C ₁₆ -PEG	/	158.3 \pm 3.7	0.194	-18.1 \pm 3.6
HA-EDA-C ₁₆ -PEG/I	12.1 \pm 0.4	146.7 \pm 2.2	0.189	-21.1 \pm 5.1
HA-EDA-C ₁₆ -CRN	/	153.0 \pm 5.0	0.185	-16.4 \pm 1.8
HA-EDA-C ₁₆ -CRN/I	10.9 \pm 0.6	143.0 \pm 3.6	0.201	-17.5 \pm 2.7

Inoltre, tutti i sistemi micellari dispersi in mezzo cellulare hanno dimostrato un'opportuna stabilità in termini di *particle size* (Figura 35) e di potenziale- ζ (dati non riportati) entro 7 giorni.

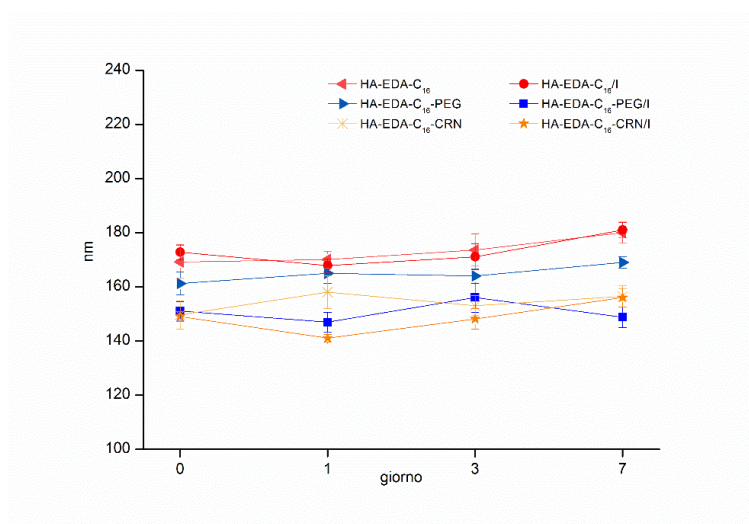


Figura 35 Stabilità in termini di *particle size* (nm) delle micelle vuote e cariche di imatinib in mezzo cellulare, a 37°C per 7 giorni

È stato condotto uno studio di vitalità cellulare *in vitro*, usando le cellule umane dell'epitelio corneale (HCEpiC). Le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti di una dispersione micellare HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-

CRN, al di sotto e al di sopra del loro valore di CAC. Dopo 6 e 24 h di incubazione, è stato effettuato il saggio MTS; i valori di assorbanza ottenuti sono stati rapportati al valore relativo alle cellule non trattate (sistema controllo), ed espressi quindi come Vitalità Cellulare % (Figura 36). Per tutte le concentrazioni studiate e per entrambi i tempi di incubazione, la vitalità cellulare si mantiene al di sopra del 70%, valore accettato secondo la normativa ISO 10993-5.

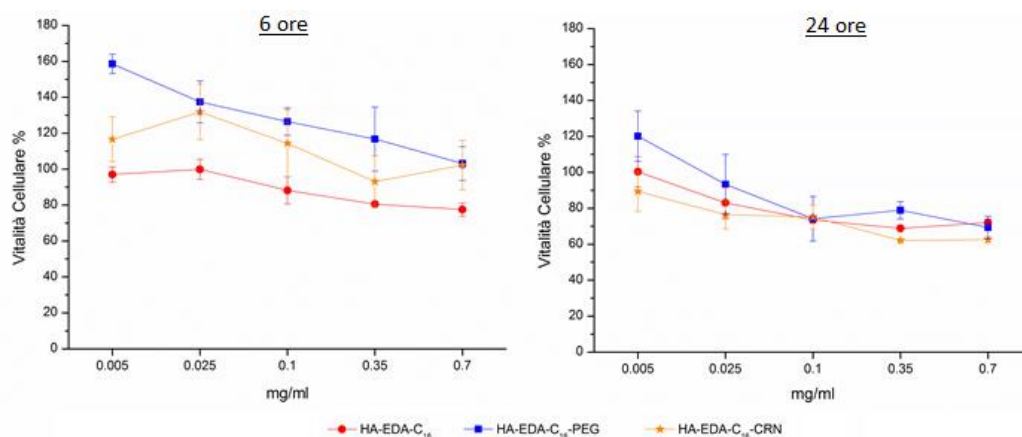


Figura 36. Dati di Vitalità Cellulare % delle HCEpiC dopo 6 e 24 h di incubazione con concentrazioni crescenti (mg/ml) di micelle HA-EDA-C₁₆ (● rosso), HA-EDA-C₁₆-PEG (■ blu) e HA-EDA-C₁₆-CRN (* arancione) rispetto al controllo (non mostrato nel grafico)

Le micelle polimeriche, essendo costituite da polimeri anfifilici, sono potenzialmente in grado di interagire con i componenti idrofili e lipofili della membrana corneale, alterando reversibilmente la complessa struttura corneale in modo da favorire l'ingresso di farmaci verso le porzioni più interne dell'occhio. Al fine di valutare la capacità *enhancer* delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN sono stati effettuati studi di permeazione trans-corneale *in vitro* ed *ex vivo* utilizzando rispettivamente gli inserti *transwell* e celle di diffusione verticale di Franz.

Innanzitutto è stato studiato il profilo di permeazione delle micelle fluorescenti, preparate legando chimicamente la sonda AlexaFluor₄₈₈ alle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN, sia *in vitro* che *ex vivo*. Questo studio è stato condotto allo scopo di dimostrare l'abilità dei carrier micellari di interagire con l'epitelio corneale e di permearlo opportunamente (Figura 37).

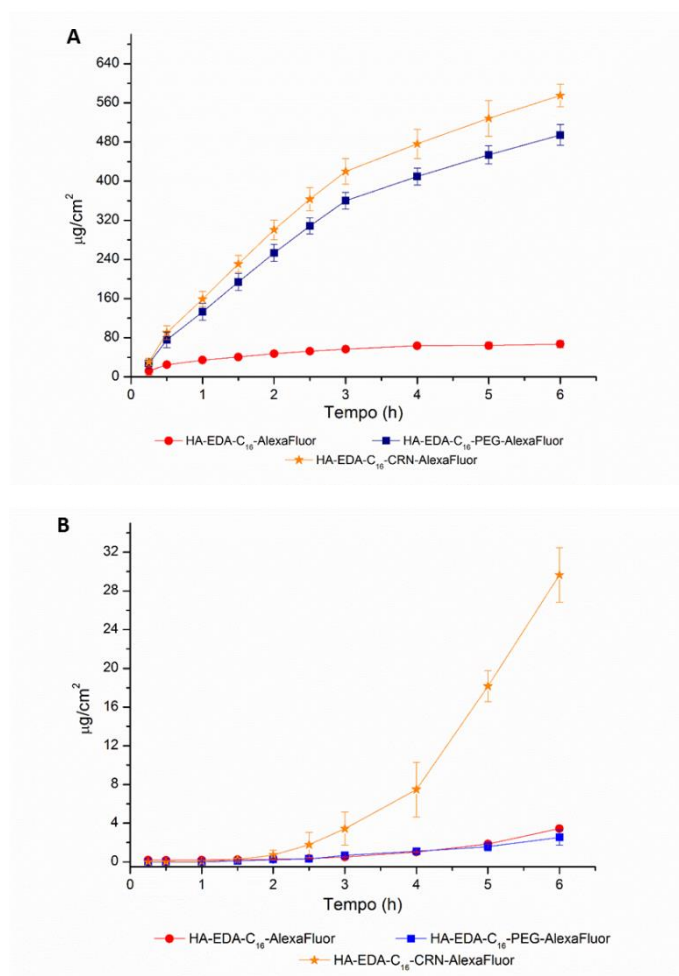


Figura 37. Profilo di permeazione trans-corneale *in vitro* attraverso il monolayer di HCEpiC (A) ed *ex vivo* attraverso le cornee bovine (B) delle micelle HA-EDA-C₁₆ (● rosso), HA-EDA-C₁₆-PEG (■ blu) e HA-EDA-C₁₆-CRN (* arancione) marcate con la sonda AlexaFluor₄₈₈

Le micelle HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN sono in grado di permeare attraverso il *monolayer* cellulare (studio *in vitro*) con un profilo nettamente differente rispetto alle micelle HA-EDA-C₁₆; probabilmente la modifica chimica con il PEG o la L-carnitina dello *shell* esterno delle micelle aumenta l'interazione con le cellule e la permeazione trans-epiteliale. Per quanto riguarda lo studio *ex vivo* invece, le micelle HA-EDA-C₁₆ e HA-EDA-C₁₆-PEG mostrano un profilo di permeazione analogo, mentre il sistema funzionalizzato con la L-carnitina è trattenuto meno nello stroma corneale e quindi in grado di permeare più velocemente attraverso la barriera corneale.

È stato quindi condotto uno studio analogo utilizzando le micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN cariche di imatinib; come confronto sono state utilizzate una soluzione (opportunitamente preparata in metanolo e successivamente diluita in mezzo cellulare completo) ed una sospensione di imatinib. I dati ottenuti *in vitro* ed *ex vivo* sono riportati in Figura 38, ed espressi come µg/cm² di imatinib permeato nel tempo.

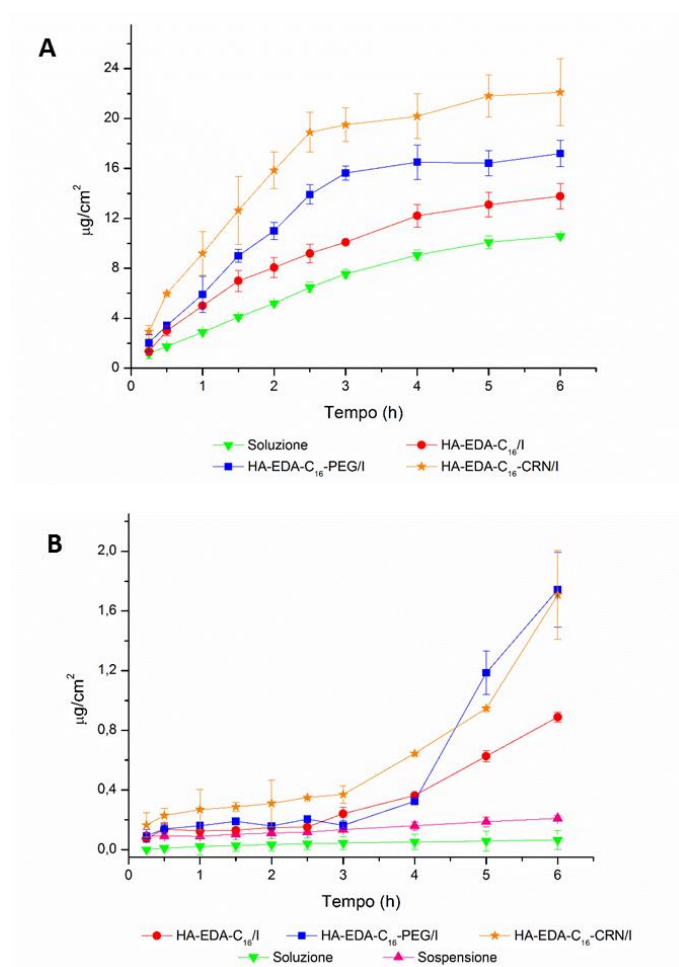


Figura 38. Profilo di permeazione trans-corneale *in vitro* attraverso il monolayer di HCEpiC (**A**) ed *ex vivo* attraverso le cornee bovine (**B**) dell'imatinib incorporato nelle micelle HA-EDA-C₁₆ (● rosso), HA-EDA-C₁₆-PEG (■ blu) e HA-EDA-C₁₆-CRN (* arancione), o da una sospensione (▲ rosa) e da una soluzione (▼ verde) di farmaco

La quantità di imatinib permeata *in vitro* (espressa come $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in presenza delle micelle polimeriche risulta essere statisticamente maggiore rispetto a quella permeata utilizzando la soluzione di farmaco; inoltre, i sistemi HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN promuovono maggiormente la permeazione del farmaco attraverso il monostrato di cellule epiteliali. Tuttavia, è necessario ricordare che l'impiego delle micelle polimeriche preparate risulta essere ulteriormente vantaggioso poiché per la preparazione della soluzione di imatinib è necessario utilizzare un solvente organico (metanolo); non è da escludere che, nonostante la diluizione di 100 volte della soluzione con mezzo cellulare, parte del metanolo potrebbe interferire nel processo di permeazione agendo come *enhancer*, alterando l'integrità dello strato cellulare.

I dati ottenuti dallo studio di permeazione trans-corneale *ex vivo* permettono di confermare l'azione di *permeation enhancer* delle micelle polimeriche. La permeazione del farmaco è notevolmente limitata dopo la somministrazione in forma di sospensione e di soluzione. Nel caso della sospensione di imatinib, probabilmente si assiste ad un parziale deposito di farmaco solido sulla superficie oculare che potrebbe dar luogo a fenomeni di occlusione limitando il passaggio trans-corneale della frazione solubile di farmaco. Per quanto riguarda la soluzione, le molecole di farmaco non riescono ad interagire con la struttura corneale a causa del loro carattere fortemente idrofobico. Il profilo di permeazione dell'imatinib caricato all'interno delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN risulta essere completamente diverso. Dopo un *lag time* di circa 2 ore, la quantità di imatinib permeato aumenta considerevolmente se paragonato alla soluzione e alla sospensione. Ciò è ragionevolmente dovuto al fatto che le micelle polimeriche sono in grado di interagire con la struttura anfifilica corneale fungendo da *permeation enhancer*, favorendo il passaggio del farmaco lipofilo attraverso i vari strati della cornea. Inoltre, tale fenomeno è accentuato per le micelle HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN, confermando così l'effettivo vantaggio della funzionalizzazione chimica del derivato polimerico HA-EDA-C₁₆ nella permeazione trans-corneale dell'imatinib.

Al termine del test di permeazione *ex vivo*, è stata determinata la quantità di farmaco intrappolato all'interno della struttura corneale; i dati ottenuti sono espressi come $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e riportati in Tabella 16.

Tabella 16. Quantità di imatinib ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) trattenuto nella cornea alla fine dell'esperimento di permeazione trans-corneale *ex vivo*

Soluzione imatinib	Sospensione imatinib	Micelle HA-EDA-C ₁₆	Micelle HA-EDA-C ₁₆ -PEG	Micelle HA-EDA-C ₁₆ -CRN
1.29 ± 0.27	1.57 ± 0.21	14.86 ± 0.88	6.67 ± 1.2	16.97 ± 1.07

I dati ottenuti confermano ulteriormente la capacità delle micelle di agire come *penetration enhancer* a livello della barriera corneale. In particolare, le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆ consentono un incremento della ritenzione dell'imatinib di 11.51 e di 9.46 volte rispetto alla soluzione e alla sospensione di farmaco libero, mentre le micelle HA-EDA-C₁₆-CRN di 13.15 e di 10.81 volte rispetto alla soluzione e alla sospensione. Le micelle HA-EDA-C₁₆-PEG determinano un incremento della quantità di imatinib trattenuta nella cornea di 5.17 e di 4.25 volte (sempre rispetto alla soluzione ed alla sospensione); pertanto, in questo caso, l'effetto di *penetration enhancer* risulta essere di entità inferiore rispetto

agli altri sistemi progettati. Probabilmente la presenza del PEG sullo *shell* idrofilo esterno conferisce alla micella una migliore affinità con lo stroma della cornea (di natura idrofila), facilitando pertanto la permeazione del farmaco idrofobo e riducendone la sua ritenzione a livello della barriera tissutale.

Comunque in ogni caso è possibile ottenere un effetto *reservoir* di farmaco, grazie all'interazione tra cornea e micelle; questo accumulo potrebbe contribuire nel tempo ad incrementare ulteriormente la quantità di farmaco in grado di permeare la cornea e successivamente di distribuirsi nelle porzioni più interne dell'occhio, in modo da migliorare la biodisponibilità intraoculare e potenzialmente l'efficacia terapeutica.

Per dimostrare il reale vantaggio nell'utilizzo delle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆c di agire come *permeation* e *penetration enhancer*, i dati ottenuti dagli studi di permeazione transcorneale *in vitro* ed *ex vivo* sono stati rielaborati per calcolare il flusso del farmaco (**J_s**), il coefficiente di permeabilità (**K_p**). I valori calcolati sono stati riportati in **Tabella 17-A** per lo studio *in vitro* e in **Tabella 17-B** per lo studio *ex vivo*; le equazioni utilizzate per calcolare tali parametri sono state riportate nella sezione 3.3.2.

Tabella 17. Valori di **J_s** e **K_p** del farmaco in soluzione e in sospensione, e del farmaco veicolato nelle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN relativi allo studio di permeazione transcorneale *in vitro* (**A**) ed *ex vivo* (**B**)

A	J_s	K_p
Soluzione imatinib	2.330 ± 0.171	0.09321 ± 0.00832
HA-EDA-C₁₆ / I	3.071 ± 0.164	0.06143 ± 0.00351
HA-EDA-C₁₆ -PEG/ I	5.042 ± 0.104	0.10086 ± 0.00208
HA-EDA-C₁₆ -CRN/ I	6.802 ± 0.139	0.13604 ± 0.00173

B	J_s	K_p
Soluzione imatinib	0.007 ± 0.001	0.00028 ± 0.00003
Sospensione imatinib	0.020 ± 0.004	0.00004 ± 0.00002
HA-EDA-C₁₆ / I	0.208 ± 0.011	0.00042 ± 0.00002
HA-EDA-C₁₆ -PEG/ I	0.406 ± 0.009	0.00082 ± 0.00003
HA-EDA-C₁₆ -CRN/ I	0.331 ± 0.005	0.00066 ± 0.00004

Le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN sono in grado di aumentare il flusso (J_S) del farmaco sia attraverso il monostrato cellulare (studio *in vitro*) che attraverso la barriera corneale bovina (studio *ex vivo*).

L'analisi più significativa è costituita dalla comparazione dei valori di K_P ottenuti. *In vitro*, il coefficiente di permeabilità dell'imatinib quando veicolato con le micelle HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN è superiore di 1.08 e di 1.46 volte rispetto alla soluzione di farmaco. Questo confronto non può essere preso in considerazione poiché per preparare la soluzione di imatinib è necessario utilizzare un solvente organico, la cui presenza (seppure dell'1%) potrebbe causare un'alterazione dell'integrità tissutale e l'ottenimento di un risultato falsato.

Analizzando i valori di K_P ottenuti dall'esperimento *ex vivo*, è possibile confermare definitivamente la capacità delle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN di agire da *permeation* e *penetration enhancer* per l'imatinib incorporato. In particolare, le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN aumentano il valore di K_P dell'imatinib rispettivamente di 10.5, 20.5 e 16.5 volte rispetto alla sospensione di farmaco libero.

Come già discusso nella sezione introduttiva (paragrafo 1.2), la neoangiogenesi è un evento di formazione di nuovi vasi sanguigni da vasi maturi già esistenti; è un processo multi-step che coinvolge la migrazione e la proliferazione di cellule endoteliali e di periciti, guidato da una varietà di fattori di crescita tra cui il VEGF, il *basic-fibroblast growth factor* (bFGF) e il *platelet derived growth factor-B* (PDGF-B). Un *dual-targeting* sui *pathway* del VEGF e del PDGF-B permette di ottenere un'inibizione sinergica dell'angiogenesi in modelli di neovascolarizzazione oculare, rispetto ad una terapia singola con anti-VEGF [254,255]. Inoltre, le *small molecule kinase inhibitors* possono essere impiegate come agenti anti-angiogenici in modelli di patologie oculari [256–259]. Considerando che l'imatinib ha un'azione inibitoria sull'attività tirosin-chinasica, lo scopo ultimo di questo lavoro di ricerca è stato quello di valutare la proprietà anti-angiogenica dell'imatinib utilizzando un modello *in vitro* di neovascolarizzazione coroidale. *In vitro*, il processo di neoangiogenesi è costituito da diverse fasi tempo-dipendenti: migrazione e allineamento cellulare, seguito dallo sviluppo e dallo *sprouting* di nuovi capillari e formazione di *networks* cellulari. Variando il tempo di analisi è possibile ottenere diverse informazioni riguardo al meccanismo di azione degli agenti anti-angiogenici e gli *step* in cui essi agiscono. Le HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sono

ampiamente utilizzate come modello oftalmologico *in vitro* per valutare il comportamento delle cellule endoteliali in un processo di formazione di neo-vasi [260,261].

Per lo scopo prefissato, è stato inizialmente valutato l'effetto citotossico dell'imatinib a diverse concentrazioni sulle HUVEC in coltura bidimensionale, dopo 24 ore di esposizione; in particolare è stato utilizzato un range di concentrazione di farmaco compreso tra 0.5 e 125 $\mu\text{g/ml}$, corrispondenti ad un range di molarità pari a 1.01 – 253.24 pM (Figura 39).

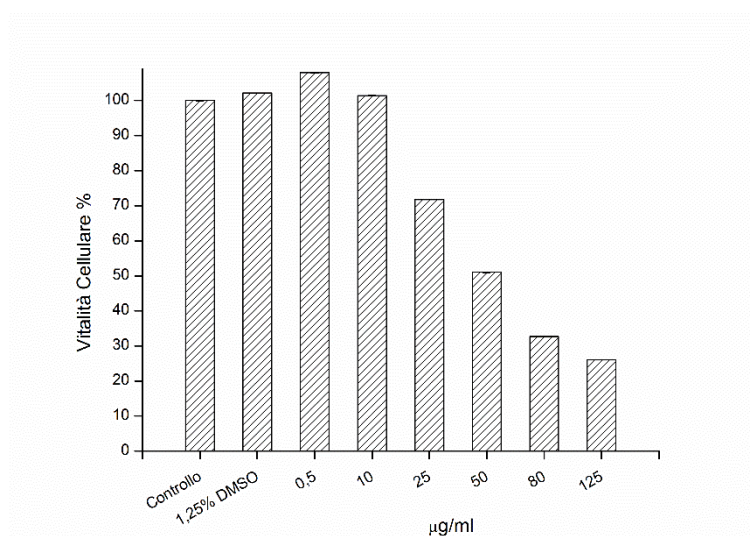


Figura 39. Vitalità cellulare % delle HUVEC trattate con diverse concentrazioni ($\mu\text{g/ml}$) di imatinib in soluzione dopo 24 ore di incubazione

Per concentrazioni inferiori a 25 $\mu\text{g/m}$ (quindi minori a 50.65 pM) la vitalità cellulare è ottimale (superiore del 70% rispetto al controllo). Inoltre, è stato dimostrato che l'eventuale presenza di solvente organico residuo (DMSO utilizzato per la preparazione di una soluzione di imatinib alla concentrazione di 10mg/ml) nei diversi campioni non è citotossico.

È stata quindi preparata una coltura di HUVEC su matrigel allo scopo di creare un sistema modello di neoangiogenesi, come riportato in letteratura [255,260]. Inizialmente è stata valutata la capacità dell'imatinib in soluzione e a differente concentrazione (nel range di 5-25 $\mu\text{g/ml}$) di inibire l'organizzazione e lo *sprouting* cellulare (Figura 40).

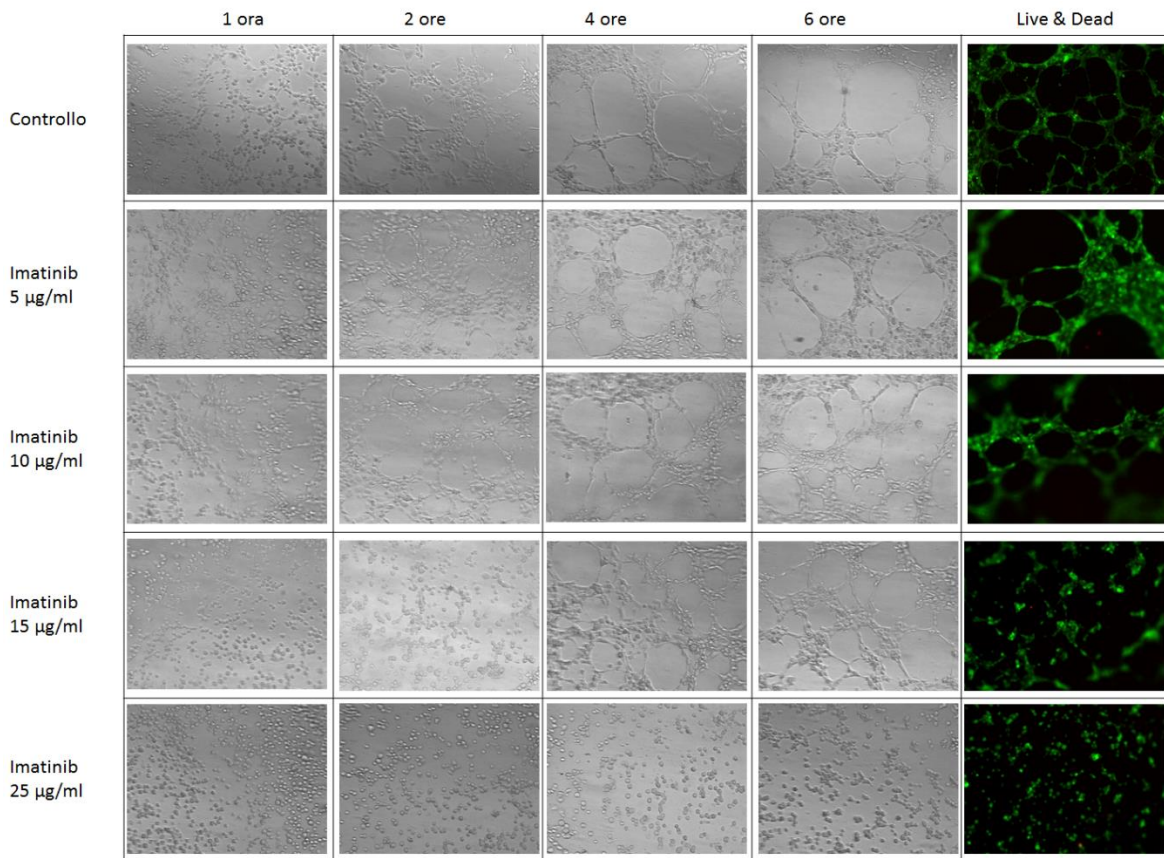


Figura 40. Analisi qualitativa dello *sprouting* delle HUVEC trattate con concentrazioni crescenti di imatinib (5-25 µg/ml) per 6 ore; a destra le immagini concernenti il saggio *Live&Dead* condotto sui campioni alla fine dell'esperimento

L'effetto inibitorio dell'imatinib sullo *sprouting* delle HUVEC si osserva per concentrazioni superiori a 15 µg/ml. Inoltre, passando da 15 a 25 µg/ml il processo di migrazione e orientamento cellulare sembra avvenire più lentamente; dopo le 6 ore si evince una strutturazione ridotta (15 µg/ml) o assente (25 µg/ml) delle HUVEC. Nonostante il marcato effetto inibitorio, la vitalità cellulare non è compromessa confermando quindi l'assenza di citotossicità del farmaco a tali concentrazioni.

Parallelamente, è stato eseguito un secondo studio per valutare la capacità dell'imatinib di indurre una regressione strutturale dei *network* cellulari già formati (Figura 41). Dopo 6 ore di incubazione, i campioni trattati con la concentrazione maggiore di imatinib subiscono una parziale regressione strutturale; tuttavia, dopo 24 ore si osserva tale effetto per tutte le concentrazioni utilizzate.

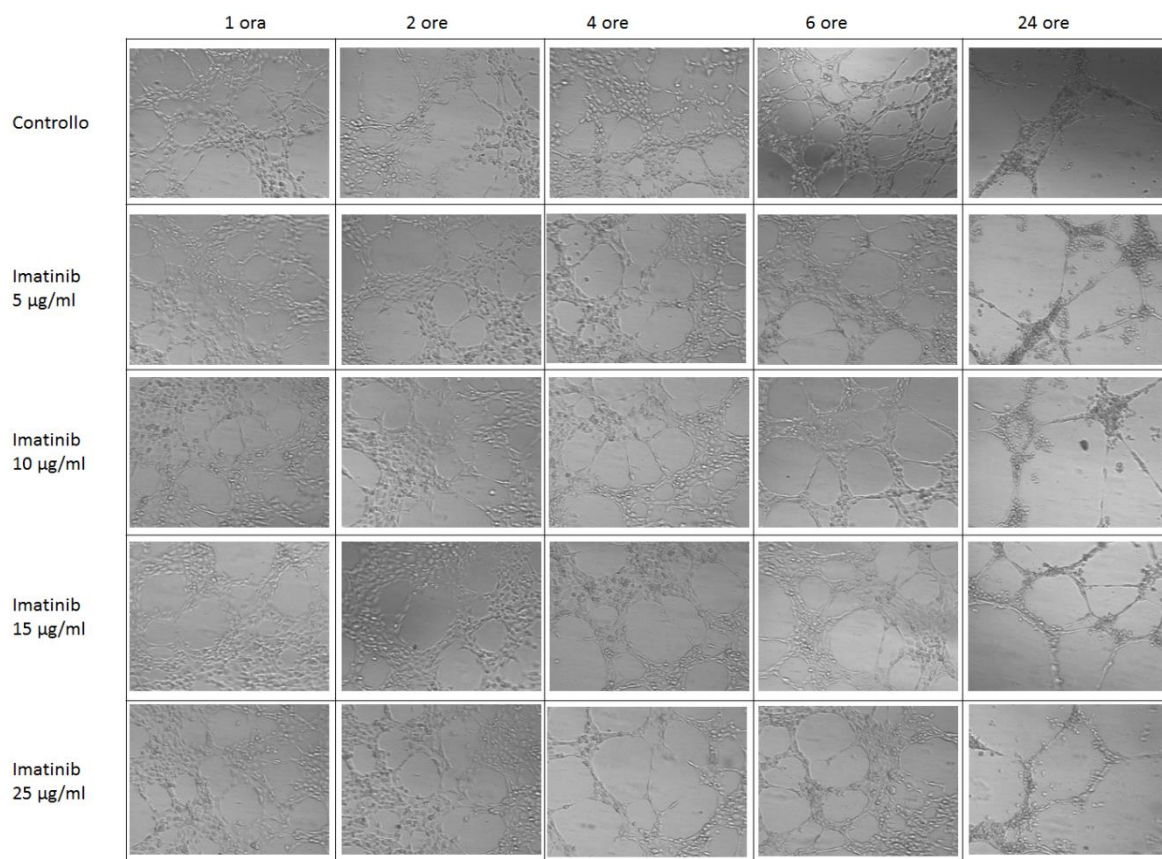


Figura 41. Analisi qualitativa della variazione strutturale del *network* di HUVEC trattate per 24 ore con concentrazioni crescenti di imatinib (5-25 µg/ml)

Dall'analisi dei risultati ottenuti è stato possibile confermare che l'imatinib è potenzialmente in grado di agire in un processo di neoangiogenesi inibendo la formazione di nuovi vasi e riducendo la struttura capillare già formata. Pertanto, uno studio analogo è stato condotto utilizzando le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I e HA-EDA-C₁₆-CRN/I allo scopo di valutare l'efficacia del farmaco quando caricato all'interno di un nanocarrier polimerico. La concentrazione di farmaco utilizzata è di 40µg/ml; considerando il profilo di rilascio graduale del farmaco dalle micelle polimeriche (in un tampone simulante i fluidi biologici, vedi Figura 34), è stato presupposto che nell'arco delle 24 ore di esperimento la concentrazione di farmaco sia tale da indurre un effetto inibitorio senza indurre la morte cellulare. Questa ipotesi è stata opportunamente confermata dal risultato ottenuto dal saggio di vitalità condotto sulle HUVEC in coltura bidimensionale. I sistemi micellari vuoti e carichi di farmaco sono citocompatibili, e consentono di mantenere una vitalità al di sopra del 70% (rispetto al controllo) (Figura 42).

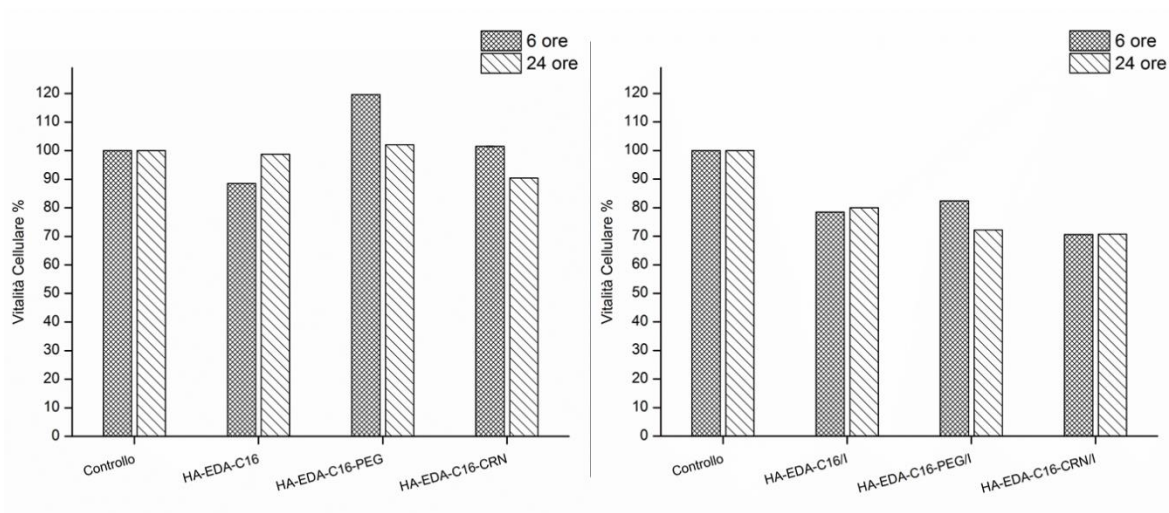


Figura 42. Vitalità cellulare % delle HUVEC trattate con le micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN vuote e cariche di imatinib dopo 6 e 24 ore di incubazione

Le HUVEC sono state opportunamente caricate sul matrigel insieme ad una sospensione di micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I o HA-EDA-C₁₆-CRN/I in mezzo cellulare. È stata quindi valutata l'inibizione dello *sprouting* cellulare entro le 24 ore (Figura 43).

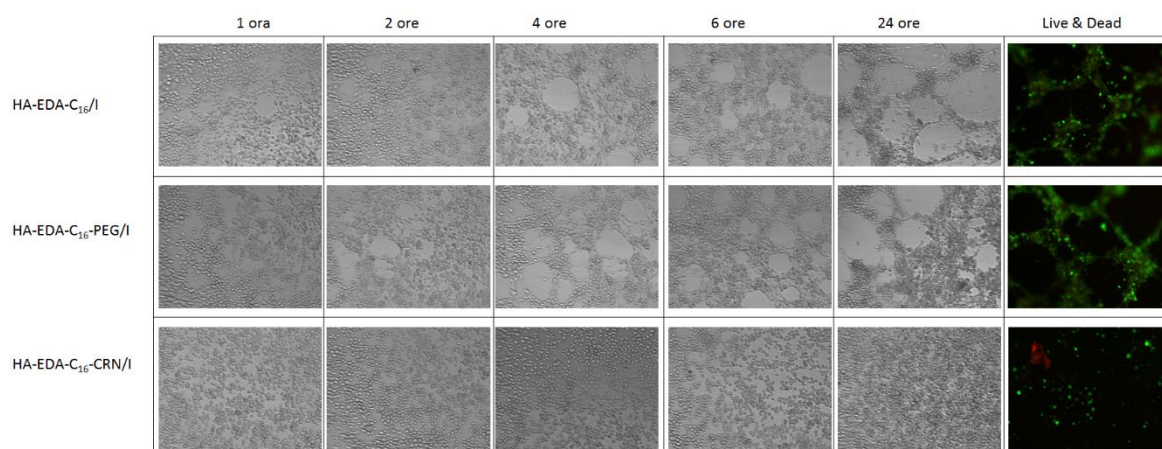


Figura 43. Analisi qualitativa dello *sprouting* delle HUVEC trattate con le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I e HA-EDA-C₁₆-CRN/I (concentrazione di imatinib 40 µg/ml) per 24 ore; a destra le immagini concernenti il saggio *Live&Dead* condotto sui campioni alla fine dell'esperimento

L'imatinib veicolato dalle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆ e HA-EDA-C₁₆-PEG limita inizialmente l'interazione cellulare; lo *sprouting* che si osserva dopo 4 ore è tuttavia disomogeneo e meno organizzato. Le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆-CRN invece consentono di ottenere un effetto inibitorio molto più marcato; anche dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, le cellule non sono in grado di interagire tra di esse con un effetto inibitorio sicuramente evidente.

L'effetto dell'imatinib, quando somministrato all'interno delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG o HA-EDA-C₁₆-CRN, di indurre una regressione strutturale dei *network* cellulari già formati appare evidente già dopo le prime ore di trattamento (Figura 44).

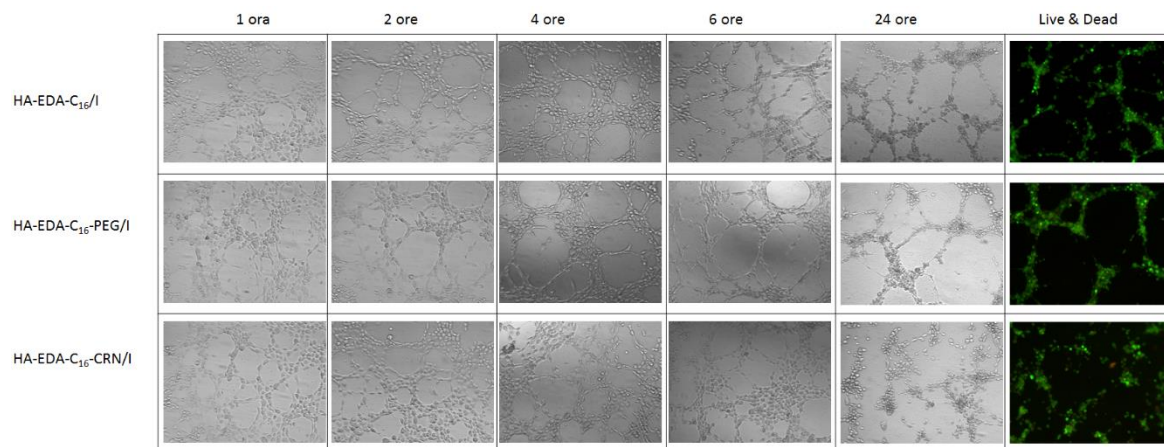


Figura 44. Analisi qualitativa della variazione strutturale del *network* di HUVEC trattate per 24 ore con le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I e HA-EDA-C₁₆-CRN/I (concentrazione di imatinib 40 µg/ml); a destra le immagini concernenti il saggio *Live&Dead* condotto sui campioni alla fine dell'esperimento

Le connessioni tra le cellule sono visibilmente ridotte in numero ed in entità; inoltre, dal saggio *Live&Dead* è possibile confermare che le cellule sono ancora vive confermando ulteriormente che la concentrazione di farmaco utilizzata è opportuna per lo scopo prefissato. Inoltre, anche in questo caso utilizzando le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆-CRN è possibile ottenere un'efficacia inibitoria più evidente. Probabilmente la funzionalizzazione dello *shell* micellare con la L-carnitina migliora l'interazione tra le micelle e le cellule endoteliali vasali, promuovendo il rilascio del farmaco e l'esplicazione della sua azione farmacologica.

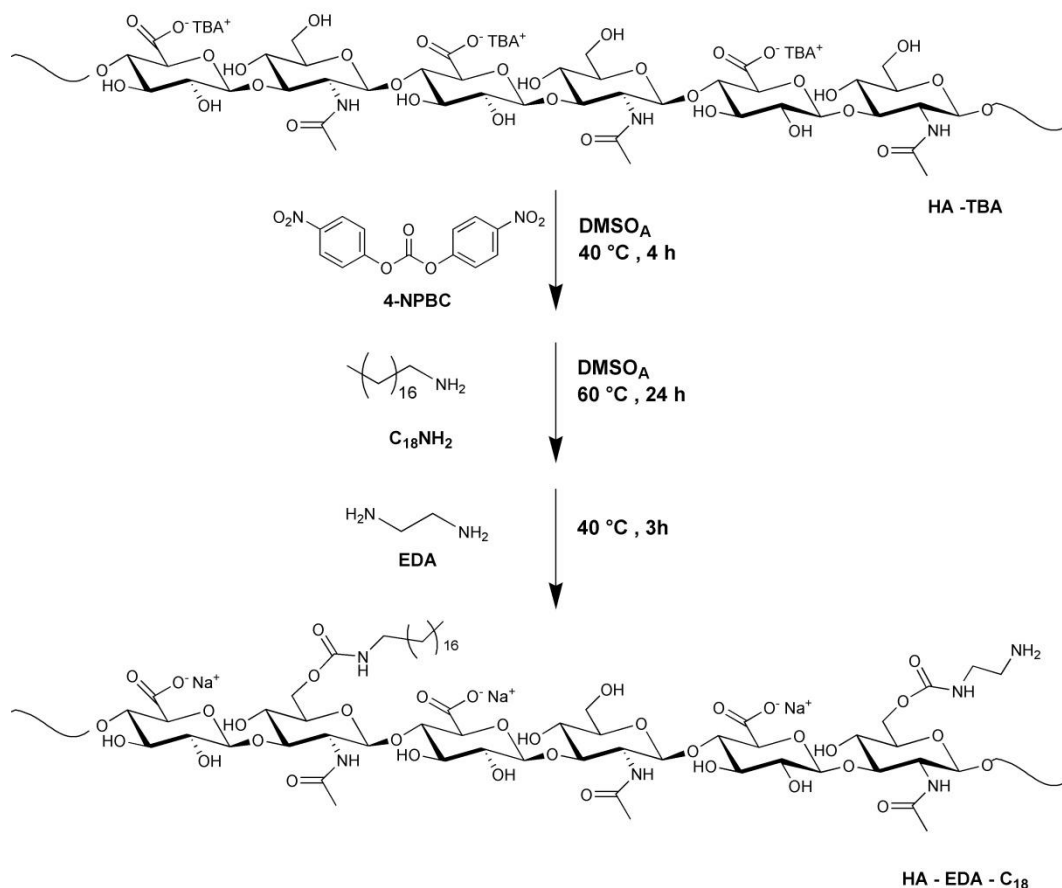
3.3 Nanoparticelle polimeriche a base di HA_{XS}

La microfluidica è una metodologia LOC innovativa e vantaggiosa che consente la manipolazione di piccole quantità di reagenti e di controllare accuratamente i processi di miscelazione su micro-scala. Rispetto alle tecniche convenzionali di preparazione, la microfluidica offre un controllo superiore nella resa e nelle proprietà chimicofisiche dei nanosistemi preparati [262]; in particolare, la dimensione delle nanoparticelle può essere facilmente modulata variando la velocità di flusso, la polarità dei solventi, la composizione dei polimeri e la loro concentrazione [263].

Considerando pertanto i vantaggi già esposti, la seconda linea di ricerca sviluppata durante il Dottorato di Ricerca ha previsto la preparazione di nanoparticelle polimeriche mediante tecnica microfluidica. Inizialmente, è stato studiato il comportamento di due derivati polimerici sintetizzati partendo dall'HA a differente peso molecolare; una riduzione del peso molecolare dell'acido ialuronico utilizzato consentirebbe di ottenere dei derivati polimerici che in dispersione acquosa (a parità di concentrazione) abbiano una viscosità differente. Pertanto, lo scopo iniziale è stato quello di ottenere un miglior controllo sulla fluidità e sulla viscosità delle dispersioni acquose preparate.

In un precedente studio, la piattaforma microfluidica è stata utilizzata per la realizzazione di microfibre utilizzando un derivato ottadecilamminico ed etilendiamminico dell'HA, siglato HA_{LMW}-EDA-C₁₈ (M_w 300 kDa circa); è stato dimostrato che modulando la forza ionica del mezzo di coacervazione le microfibre presentano una differente morfologia e capacità di rilasciare il desametasone incorporato [264].

Partendo da tali dati, è stato preparato un derivato utilizzando l'HA_{XS} 100 kDa e siglato HA_{XS}-EDA-C₁₈. Entrambi i derivati sono stati sintetizzati seguendo un protocollo di sintesi che prevede l'attivazione dei gruppi ossidrilici primari della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA con il 4-NPBC e la successiva funzionalizzazione con l'ottadecilammina e l'etilendiammina (Schema 6).



Schema 6. Schema di sintesi dei derivati HA_{LMW}-EDA-C₁₈ ed HA_{Xs}-EDA-C₁₈

I due derivati, opportunamente caratterizzati, non hanno mostrato differenze significative nel grado di derivatizzazione molare in ottadecilammina (DD_{C18}mol%) e in etilendiammina (DD_{EDA}mol%), indicando che l'efficienza della funzionalizzazione chimica non è influenzata dal peso molecolare dell'HA di partenza (Tabella 18). Inoltre, la determinazione del peso molecolare medio pesato (M_w) mostra che il peso molecolare di entrambi i derivati aumenta rispetto all'HA di partenza proporzionalmente al grado di funzionalizzazione ottenuto.

Tabella 18. Grado di derivatizzazione molare percentuale in ottadecilammina ed etilendiammina, resa % in peso, valori di M_w e PDI dei derivati HA-EDA-C₁₈ e HA_{Xs}-EDA-C₁₈

	DD_{C18}mol %	DD_{EDA}mol %	Resa% in Peso	M_w	PDI
HA_{LMW}-EDA-C₁₈	12.0 ± 1.3	30.0 ± 0.5	87.1 ± 2.9	321992	1.83
HA_{Xs}-EDA-C₁₈	13.4 ± 0.5	29.8 ± 0.5	85.7 ± 3.1	125029	2.13

L'analisi viscosimetrica è stata eseguita sulle dispersioni polimeriche acquose dei due derivati (alla stessa concentrazione dell'1% p/v) allo scopo di valutare l'effetto della riduzione del peso molecolare sul profilo reologico. Come è possibile osservare in Figura 45, il comportamento reologico delle due dispersioni è completamente differente. Il derivato a più alto peso molecolare presenta un comportamento pseudoplastico, ed a bassi sforzi di taglio presenta valori di viscosità (50-60 Pa·s) che risultano non compatibili con la possibilità di processare la dispersione tramite tecnica microfluidica. Il derivato HA_{Xs}-EDAC₁₈ (a più basso peso molecolare) in dispersione acquosa all'1 % (p/v) perde il comportamento pseudoplastico e presenta una viscosità massima inferiore a 5 Pa·s; pertanto risulta processabile tramite microfluidica.

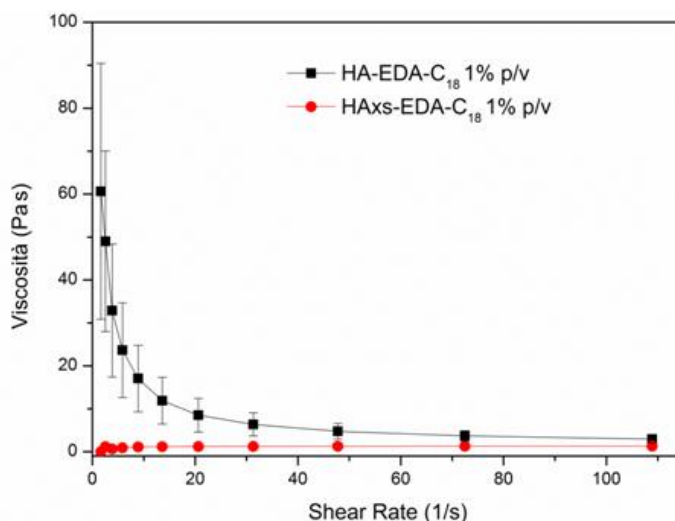


Figura 45. Profilo di viscosità in funzione della velocità di taglio del derivato HA_{LMW}-EDA-C₁₈ (■ nero) e HA_{XS}-EDA-C₁₈ (● rosso) all'1% (p/v) in acqua bidistillata

L' HA_{XS}-EDA-C₁₈ è stato impiegato per la produzione di nanoparticelle usando un micromixer chip a laminazione sequenziale (Figura 46). In questa particolare geometria il flusso principale in entrata è suddiviso in n sottoflussi che sono di seguito ricongiunti in un flusso laminare. In particolare il *micromixer chip* utilizzato in questa procedura presenta 12 regioni di miscelazione che amplificano il numero dei flussi laminari migliorando significativamente l'efficienza di miscelazione, la velocità e la completezza del processo di nanoprecipitazione.

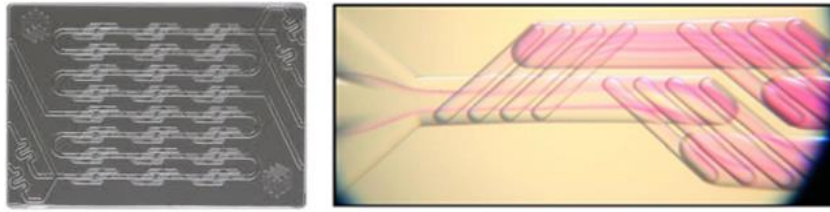


Figura 46. *Micromixer chip* a laminazione sequenziale; a destra, la geometria *split-and-recombine* che consente la scissione e il ricongiungimento del flusso

Partendo da una soluzione di HA_{XS}-EDA-C₁₈ all'1 % (p/v) in acqua bidistillata, il processo di nanoprecipitazione è stato indotto utilizzando come fase esterna il DPBS poiché il derivato HA_{XS}-EDA-C₁₈ precipita in soluzioni saline a causa dell'effetto di desolvatazione indotto dalla presenza dei sali. Il processo di nanoprecipitazione controllato avviene per diffusione dell'HA_{XS}-EDA-C₁₈ dalla lamella di fluido focalizzato verso la soluzione salina precipitante. La dimensione delle nanoparticelle di HA_{XS}-EDA-C₁₈ è stata modulata variando il rapporto di flusso interno ed esterno, cioè tra la fase polimerica flussata nel canale interno e la soluzione precipitante flussata nei canali esterni del chip (Figura 47).

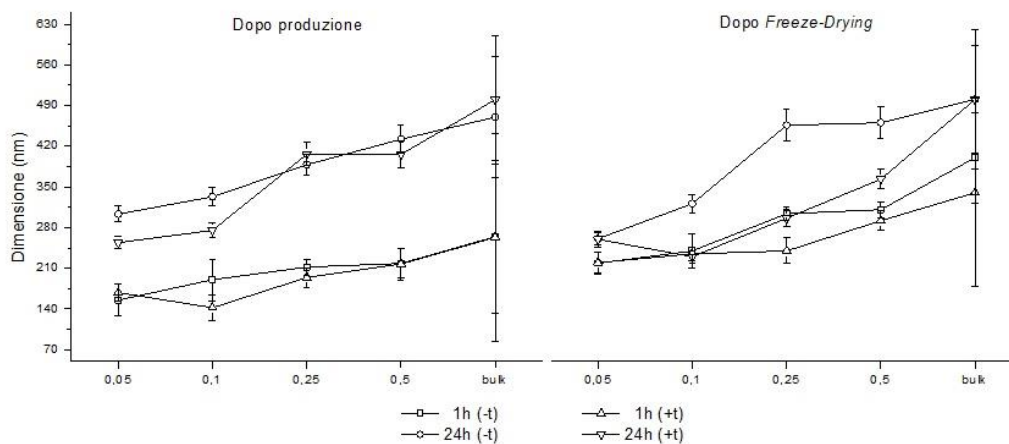


Figura 47. Dimensione delle nanoparticelle (nm) in funzione del rapporto di flusso. Le misurazioni sono state eseguite sui campioni con e senza trealosio (-t e +t rispettivamente), dopo 1 e 24 ore; i dati sono paragonati ai valori dimensionali relativi alle particelle prodotte in *bulk*. **SINISTRA:** campioni analizzati dopo produzione in DPBS; **DESTRA:** campioni dispersi in DPBS dopo *freeze-drying*

In accordo con l'incremento del rapporto di flusso da 0.05 a 0.5, la dimensione media delle particelle prodotte (valutata mediante analisi al DLS) aumenta da 150 a 210 nm dopo 1 ora dalla loro produzione. Il confronto dei valori di *particle size* tra le nanoparticelle prodotte nel *micromixer chip* e le nanoparticelle prodotte per semplice nanoprecipitazione in *bulk* mette in evidenza il miglioramento in termini di dimensioni medie e distribuzione

dimensionale ottenuto grazie alla tecnica microfluidica. Inoltre, dai dati riportati in Figura 47, è possibile notare un incremento delle dimensioni nell'arco delle 24 ore per le nanoparticelle prodotte e lasciate in DPBS, con e senza trealosio. Questo identico comportamento delle nanoparticelle, in assenza ed in presenza del crioprotettore, suggerisce che l'incremento dimensionale potrebbe essere attribuito allo *swelling* delle particelle piuttosto che alla loro aggregazione. Dopo 7 giorni in DPBS le dimensioni rimangono pressoché costanti (dati non mostrati) suggerendo che è stato raggiunto l'equilibrio di *swelling* e che i nanosistemi sono stabili nel tempo.

I campioni raccolti ed essiccati tramite *freeze-drying* sono stati opportunamente dispersi in DPBS; rispetto al campione non liofilizzato, queste nanoparticelle mostrano dimensioni più grandi dopo 1 ora di idratazione probabilmente perché raggiungono rapidamente l'equilibrio di *swelling*. Inoltre, la presenza di trealosio sembra avere un effetto stabilizzante limitando l'incremento dimensionale osservato per i campioni essiccati tramite *freeze-drying* in assenza del crioprotettore. Per quanto riguarda invece le nanoparticelle prodotte in *bulk*, queste mostrano una maggiore dimensione, per tutte le condizioni studiate. Per quanto riguarda i valori di potenziale- ζ , le nanoparticelle sono caratterizzate da valori compresi tra -10 e -15 mV; questi valori si mantengono costanti nel tempo.

Le immagini TEM hanno confermato l'incremento dimensionale delle particelle all'aumentare del rapporto di flusso impiegato. È possibile notare una distribuzione dimensionale omogenea in tutti i campioni e una morfologia tondeggianti (Figura 48). Il diametro particellare medio è compreso tra 150 e 400 nm, in accordo con le misure ottenute tramite il DLS. Alcune particelle appaiono elettronicamente più dense rispetto alle altre, mostrando un core leggermente più traslucido e suggerendo che il rapporto di flusso può influenzare anche la morfologia e lo stato di aggregazione delle nanoparticelle dopo la nanoprecipitazione (Figura 48-C). Inoltre è possibile notare un evidente incremento dell'aggregazione particellare a rapporti di flussi più alti (Figura 48-D).

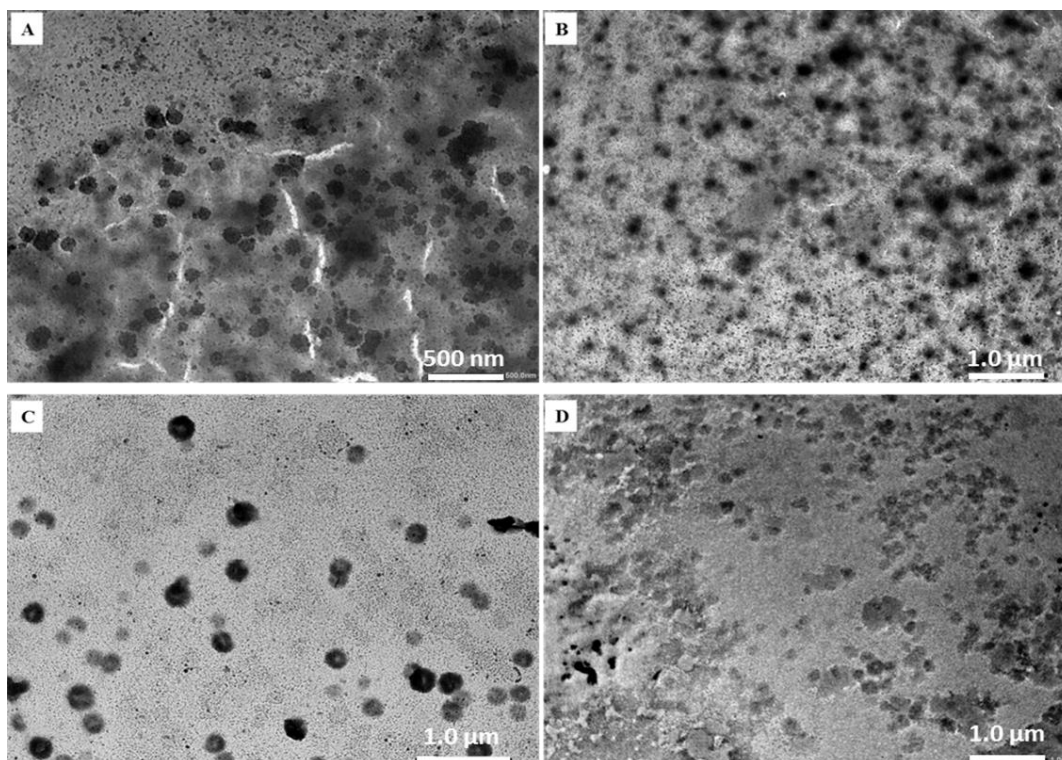


Figura 48. Microfotografie TEM delle nanoparticelle di HAXS-EDA-C₁₈ ottenute con differenti rapporti di flusso 0.05 (A), 0.1 (B), 0.25 (C) e 0.5 (D); i campioni sono stati fissati per l'osservazione 1 ora dopo la preparazione

Sono state preparate le nanoparticelle cariche di imatinib utilizzando esclusivamente il valore di RF pari a 0.1, poiché questo rapporto consente di ottenere nanoparticelle più piccole ed idonee per la somministrazione intra-vitrea (200-250 nm). Inoltre, per tale rapporto di flusso non è necessario utilizzare il trealosio come crioprotettore.

Le nanoparticelle sono state prodotte utilizzando come fase esterna due mezzi acquosi a differente forza ionica, allo scopo di valutare come questo parametro potesse influenzare il processo di nanoprecipitazione e le proprietà chimicofisiche delle nanoparticelle ottenute, le rese di produzione, i valori di *Drug Loading %* (DL%), nonché i profili di rilascio del farmaco incorporato. I mezzi scelti sono stati il DPBS, isotonico con i fluidi biologici (0.15 M), ed una soluzione di NaCl 9% (p/v), ipertonica e caratterizzata da un valore di molarità pari a 1.5 M.

Innanzitutto, le nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈ vuote sono state preparate in NaCl 9%. Le analisi al DLS sono state condotte sulle nanoparticelle: (I) dopo 1 ora dalla produzione e in dispersione nel mezzo di precipitazione, (II) dopo ultracentrifugazione e dispersione in DPBS, (III) dopo ultracentrifugazione, liofilizzazione e dispersione in DPBS (Tabella 19).

Tabella 19. Valori di *particle size* (nm) e PDI delle nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈ preparate in NaCl 9% analizzati: (I) dopo 1 ora dalla produzione e in dispersione nel mezzo di precipitazione, (II) dopo ultracentrifugazione e dispersione in DPBS, (III) dopo ultracentrifugazione, liofilizzazione e dispersione in DPBS

	<i>Particle size</i> (nm)	PDI
(I)	198.2 ± 2.9	0.207
(II)	224. ± 4.2	0.098
(III)	203.3 ± 4.3	0.137

Anche aumentando la forza ionica del mezzo di nanoprecipitazione, le nanoparticelle posseggono dei valori di *particle size* opportuni ed analoghi ai valori ottenuti inducendo la nanoprecipitazione in DPBS (dati riportati in Figura 47); inoltre, i valori dimensionali non cambiano anche disperdendo le nanoparticelle in DPBS sia dopo l'ultracentrifugazione che dopo liofilizzazione.

Sono state quindi preparate le nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈ cariche di imatinib, utilizzando il DPBS o la soluzione di NaCl 9% come fase esterna. Dall'analisi dei dati ottenuti si evince che non si ottengono differenze significative in termini di DL% tra le nanoparticelle prodotte nei due mezzi a diversa forza ionica (Tabella 20). Considerando che la quantità totale di farmaco inizialmente caricato nella fase polimerica è pari al 25% in peso rispetto alla quantità totale di polimero utilizzato, l'efficienza d'incorporazione è circa pari al 40 % per entrambi i lotti prodotti.

Tabella 20. Valori di DL% (p/p) e resa % in peso delle nanoparticelle preparate in DPBS e in NaCl 9%. Valori di *particle size* (nm) e PDI delle nanoparticelle: (I) dopo produzione e in dispersione nel mezzo di precipitazione; (II) dopo ultracentrifugazione, liofilizzazione e dispersione in DPBS

	DL %	Resa %	(I)		(II)	
			<i>Particle size</i> (nm)	PDI	<i>Particle size</i> (nm)	PDI
DPBS	10.6 ± 0.5	8.8 ± 3	191.6 ± 4.6	0.091	220.8 ± 4.9	0.183
NaCl 9%	9.5 ± 0.3	47.9 ± 6	228.9 ± 6.2	0.109	173.2 ± 6.7	0.143

Si osserva un incremento significativo del valore di resa % in peso quando è utilizzata la soluzione acquosa a più alta molarità. Bisogna infatti considerare che per la preparazione delle nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈/I è necessario utilizzare una quantità minima di co-solvente (THF) per favorire la solubilizzazione del farmaco lipofilo nel mezzo acquoso

durante la fase di produzione. Verosimilmente, la presenza del co-solvente riduce la sensibilità alla forza ionica del derivato polimerico che diffonde dalla fase interna verso la fase esterna all'interno del *micromixer chip*, riducendo l'efficienza di nanoprecipitazione e pertanto la resa finale delle nanoparticelle prodotte. I dati ottenuti confermano che la forza ionica del mezzo di nanoprecipitazione influenza la completezza del processo di coacervazione del polimero HAXs-EDAC₁₈ all'interno dei canali del *micromixer chip*.

Per quanto riguarda la dimensione, le nanoparticelle HAXs-EDA-C₁₈/I dopo produzione in NaCl 9% mostrano dei valori opportuni inferiori a 250 nm; tuttavia, dopo il processo di liofilizzazione e la successiva dispersione in DPBS, la dimensione particellare si riduce in maniera statisticamente significativa. Probabilmente, la strutturazione nanoparticellare del polimero all'interno del *micromixer chip* avviene rapidamente e in maniera più stabile, guidata da una maggiore forza ionica e dalla presenza del farmaco lipofilo.

Lo studio di rilascio dell'imatinib dalle nanoparticelle HAXs-EDAC₁₈ prodotte in DPBS e in NaCl 9% è stato condotto *in vitro* utilizzando il metodo della dialisi (Figura 49).

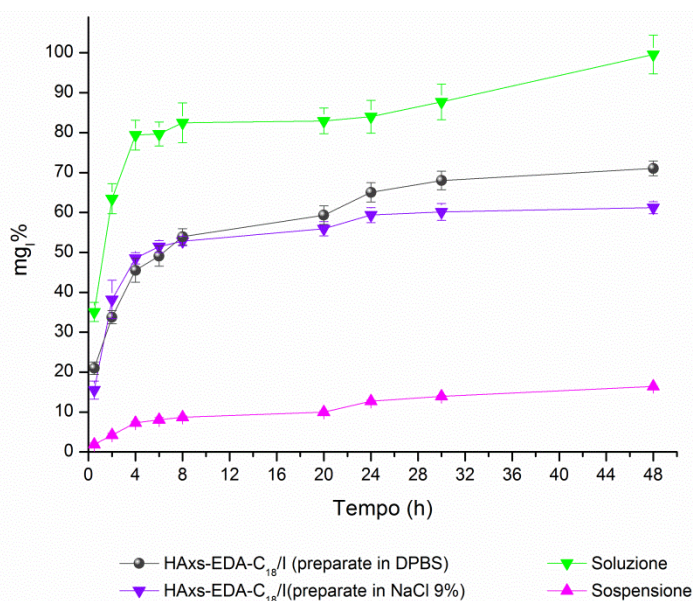
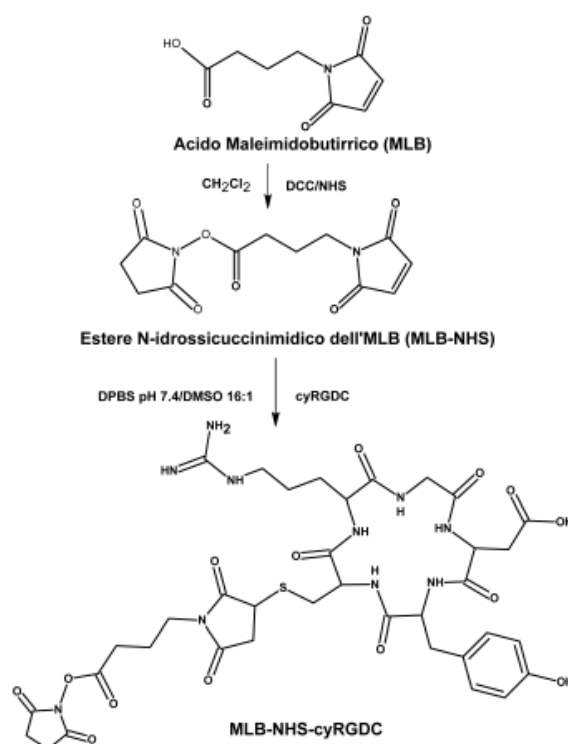


Figura 49. Profili di rilascio *in vitro* dell'imatinib dalle nanoparticelle HAXs-EDA-C₁₈ prodotte in DPBS (● grigio) e in NaCl 9% (▼ viola); profilo di dissoluzione del farmaco dalla sospensione (▲ rosa) e di diffusione dalla soluzione (▼ verde)

Rispetto al farmaco in sospensione, entrambe le tipologie di nanoparticelle prodotte consentono di prolungare il rilascio del farmaco entro le 48 ore. Inoltre, le nanoparticelle prodotte in mezzo a più alta forza ionica (rispetto al sistema prodotto in DPBS) mostrano una maggiore capacità di trattenere il farmaco incorporato, confermando la maggiore strutturazione del nanocarrier durante la fase di nanoprecipitazione.

Considerando le proprietà dimensionali delle nanoparticelle HAXs-EDA-C₁₈ progettate nonché la loro capacità di modulare la disponibilità dell'imatinib in mezzo acquoso, è possibile ipotizzare l'impiego di questi nanocarriers come *ocular DDS* da somministrare per via intra-vitreal per il trattamento delle retinopatie a carattere neoangiogenico. Il lavoro di ricerca svolto ha previsto la funzionalizzazione dello *shell* nanoparticellare con il peptide ciclico (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) (RGDC), allo scopo di ottenere un *targeting* attivo per la veicolazione dell'imatinib alle cellule endoteliali vascolari. La sequenza RGD è capace di legare diverse integrine tra cui l'isoforma $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$, essenziali per la formazione di nuovi vasi sanguigni ed iper-esprese nello stato angiogenico [208]. Il motivo di questa iper-espressione è dovuto alla funzione dell'integrina $\alpha\beta3$, durante l'angiogenesi, di conferire alle cellule endoteliali la capacità di migrare e legarsi alla matrice extra-cellulare nel processo di rimodellamento [239].

È stato sintetizzato il derivato HAXS-EDA-C₁₈-RGDC. Inizialmente è stato prodotto il derivato N-idrossisuccinimidico dell'MLB, quindi si è proceduto all'addizione di Michael tra la funzione maleimidica dell'MLB-NHS e la porzione tiolica del residuo di cisteina del RGDC (Schema 7).



Schema 7. Schema di sintesi relativo al derivato N-idrossisuccinimidico del peptide ciclico RGDC, siglato MLB-NHS-RGDC

Nel secondo step di reazione l'intermedio RGDC-MLB-NHS è stato utilizzato per la funzionalizzazione dell'HA_{Xs}-EDA-C₁₈. Il derivato HA_{Xs}-EDA-C₁₈-RGDC (Figura 50) è stato caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR; il grado di derivatizzazione molare, pari al 5 % rispetto alle moli di unità ripetitive del derivato polimerico HA_{Xs}EDA-C₁₈ (corrispondente a 25 µg di RGDC per mg di HA_{Xs}EDA-C₁₈), è stato calcolato rapportando l'integrale del picco a δ 7.2, attribuibile al residuo di tirosina della peptide ciclico, con l'integrale del picco a δ 1.9, relativo al gruppo metilico della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA.

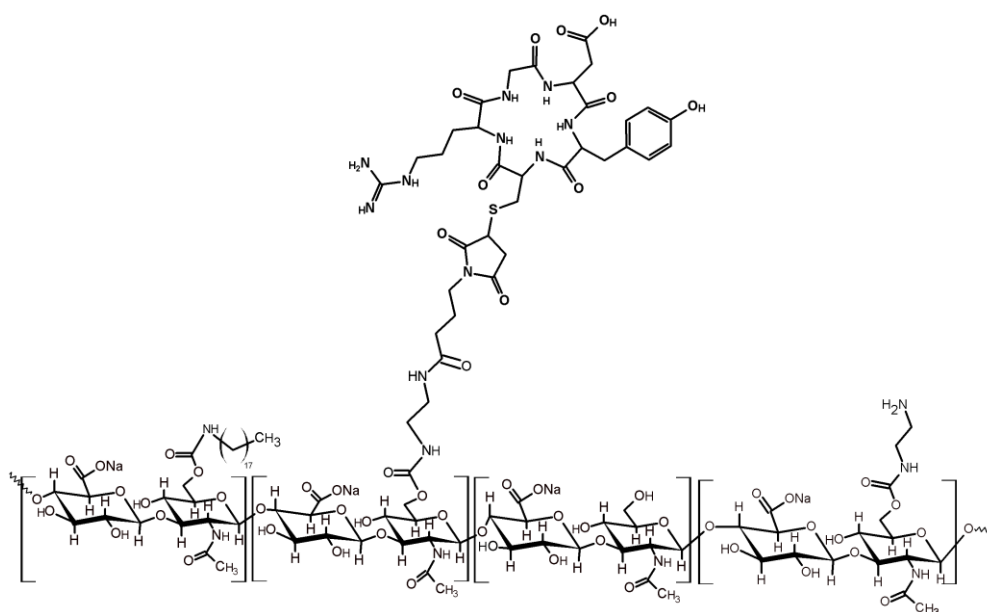


Figura 50. Struttura chimica del derivato HA_{Xs}-EDA-C₁₈-RGDC

Sono state quindi preparate e caratterizzate le nanoparticelle HA_{Xs}-EDA-C₁₈-RGDC vuote e cariche di imatinib, utilizzando come fase esterna di nanoprecipitazione la soluzione NaCl 9% (Tabella 21).

Tabella 21. Valori di DL% (p/p) delle nanoparticelle HA_{Xs}-EDA-C₁₈-cyRGDC e HA_{Xs}-EDA-C₁₈-RGDC/I preparate in NaCl 9%. Valori di *particle size* (nm) e PDI delle nanoparticelle prodotte: (I) dopo produzione e in dispersione nel mezzo di precipitazione; (II) dopo ultracentrifugazione, liofilizzazione e dispersione in DPBS

	DL %	(I)		(II)	
		<i>Particle size</i> (nm)	PDI	<i>Particle size</i> (nm)	PDI
HA_{Xs}-EDA-C₁₈-RGDC	/	220.5 ± 3.7	0.192	246.9 ± 6.1	0.183
HA_{Xs}-EDA-C₁₈-RGDC/I	8.7 ± 1.4	229.5 ± 7.6	0.163	242.9 ± 5.7	0.090

Le nanoparticelle HA_xs-EDA-C₁₈-RGDC preparate sono in grado di incorporare efficacemente l'imatinib; sebbene presentino una dimensione maggiore rispetto alle nanoparticelle HA_xs-EDA-C₁₈, i valori dimensionali rientrano nel range opportuno per un'eventuale somministrazione intra-vitrea.

Nella prima fase di ricerca svolta è stata dimostrata la capacità dell'imatinib di agire in un processo di neoangiogenesi inibendo la formazione di nuovi vasi e riducendo la struttura capillare già formata. Pertanto, è stato condotto uno studio utilizzando le nanoparticelle HA_xs-EDA-C₁₈/I e HA_xs-EDA-C₁₈-RGDC/I allo scopo di valutare l'efficacia del farmaco quando somministrato all'interno di tali sistemi carriers. Considerando i risultati positivi ottenuti utilizzando i sistemi micellari su un sistema *in vitro* di HUVEC (paragrafo 3.2.2), è stata scelta ed utilizzata una concentrazione di farmaco pari a 40µg/ml.

Inizialmente è stata valutata e confermata la citocompatibilità dei sistemi vuoti e carichi di imatinib nei confronti delle HUVEC, dopo 6 e 24 ore di incubazione con i nanosistemi preparati (Figura 51).

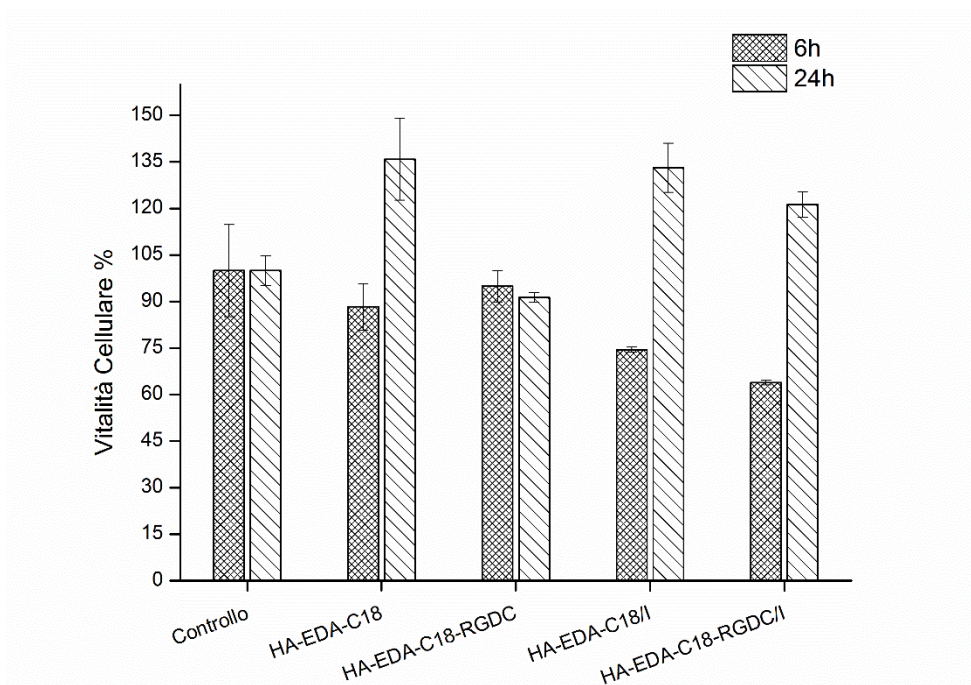


Figura 51. Vitalità cellulare % delle HUVEC trattate con le nanoparticelle HA-EDA-C₁₈ e HA-EDA-C₁₈-RGDC vuote e cariche di imatinib dopo 6 e 24 ore di incubazione

Pertanto, utilizzando un modello *in vitro* di neoangiogenesi costituito dalle HUVEC opportunamente caricate sul matrigel, è stata valutata l'inibizione dello *sprouting* vascolare

e la regressione strutturale dei *network* cellulari già formati utilizzando le nanoparticelle HAXs-EDA-C₁₈/I e HAXs-EDA-C₁₈-RGDC/I. Nel primo studio, la sospensione nanoparticellare (con una concentrazione di farmaco pari a 40 µg/ml) è stata caricata sul matrigel insieme alla sospensione cellulare; l'analisi qualitativa è stata condotta per 24 ore (Figura 52).

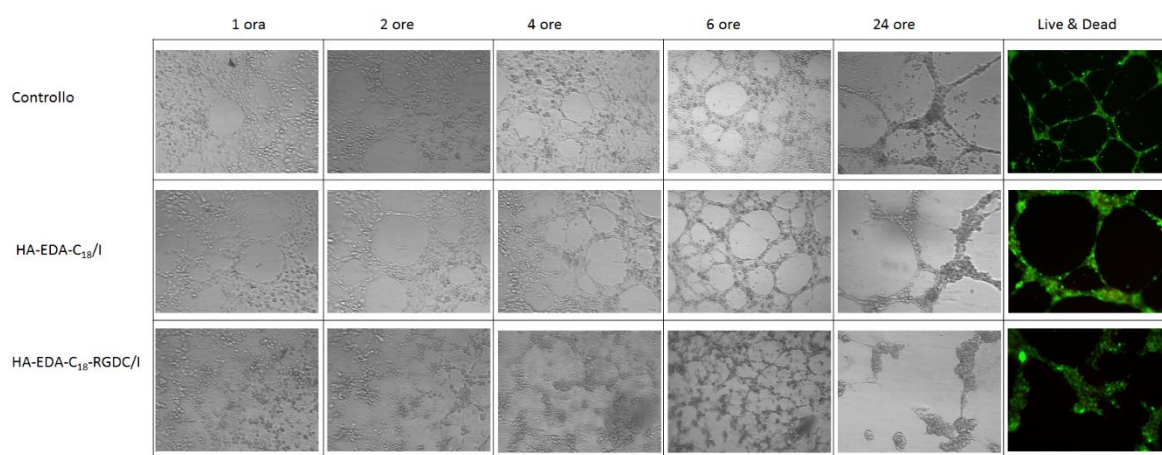


Figura 52. Analisi qualitativa dello *sprouting* delle HUVEC trattate con le nanoparticelle HA-EDA-C₁₈/I e HA-EDA-C₁₈-RGDC/I (concentrazione di imatinib 40 µg/ml) per 24 ore; a destra le immagini relative al saggio *Live&Dead* condotto sui campioni alla fine dell'esperimento

L'imatinib veicolato dalle nanoparticelle HAXs-EDA-C₁₈ e HAXs-EDA-C₁₈-RGDC è in grado di agire sulle HUVEC; infatti, utilizzando i sistemi di *drug carrier* è possibile notare un ridotto fenomeno di *sprouting*, rispetto al controllo di cellule non trattate. Dall'analisi delle immagini acquisite in fluorescenze (saggio *Live&Dead*) dopo 24 ore di incubazione, è possibile osservare che le cellule sono in grado di interagire tra di esse poiché sono presenti dei *cluster* cellulari; tuttavia utilizzando le nanoparticelle funzionalizzate con l'RGDC è possibile limitare la formazione di protrusioni citoplasmatiche.

Inoltre, utilizzando le nanoparticelle HAXs-EDA-C₁₈ e HAXs-EDA-C₁₈-RGDC è stato dimostrato l'effetto dell'imatinib di indurre una regressione strutturale dei *network* cellulari già formati (Figura 53). In particolare, utilizzando il carrier HAXs-EDA-C₁₈-RGDC è possibile ridurre le connessioni tra le cellule già dopo le prime ore di incubazione.

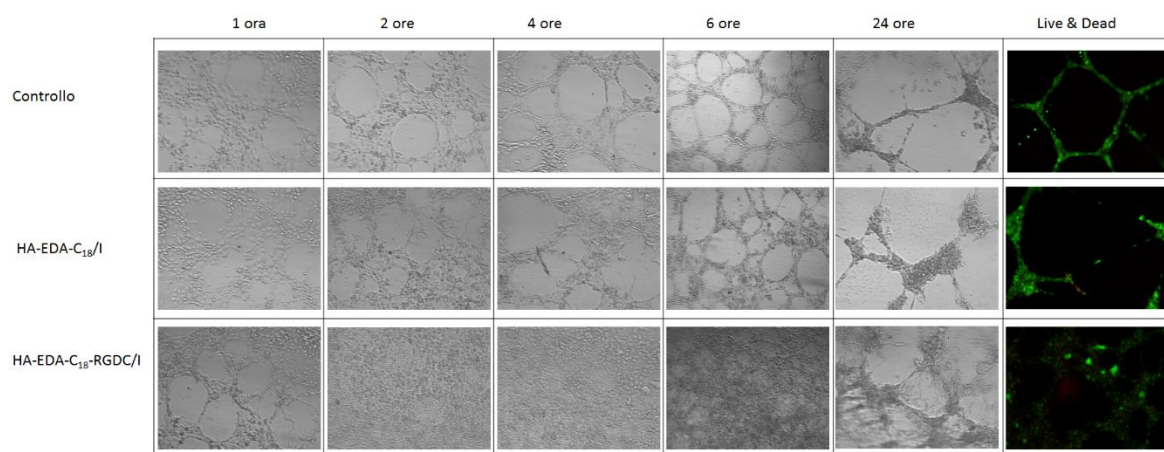


Figura 53. Analisi qualitativa della variazione strutturale del *network* di HUVEC trattate per 24 ore con le nanoparticelle HA-EDA-C₁₈/I e HA-EDA-C₁₈-RGDC/I (concentrazione di imatinib 40 µg/ml)

4. CONCLUSIONI

Nella presente tesi di Dottorato di Ricerca, lo scopo prefissato di realizzare differenti *ocular drug delivery systems* è stato raggiunto utilizzando l'acido ialuronico a differente peso molecolare come biopolimero di partenza. L'HA è stato opportunamente funzionalizzato per ottenere nuovi derivati da utilizzare per la realizzazione di micelle polimeriche o nanoparticelle polimeriche, potenzialmente in grado di veicolare farmaci idrofobici efficaci per il trattamento delle retinopatie.

Nella prima fase del lavoro sperimentale svolto, sono stati ottenuti diversi risultati positivi utilizzando l'HA_{MINI} con un Mw < 10 kDa per la preparazione di micelle polimeriche. Tre derivati anfifilici dell'HA_{MINI} sono stati sintetizzati usando una differente quantità di esadecilammina come catena idrofobica. Tali derivati sono stati siglati HAC_{16a}, HAC_{16b} e HAC_{16c}, e sono rispettivamente caratterizzati da un valore di DD_{C16mol%} pari a 15, 12 e 7%. Per ogni derivato HAC₁₆ è stata dimostrata la capacità di *self-assembly* in differenti mezzi acquosi e di incorporare efficacemente differenti corticosteroidi di natura idrofobica (desametasone, triamcinolone, triamcinolone acetone), utilizzati convenzionalmente in ambito oculare come sospensioni farmaceutiche. Tra i sistemi preparati, le micelle HAC_{16b} (DD_{C16mol%} del 12%) hanno mostrato ottimi valori di *particle size* (inferiori a 300 nm), un appropriato valore di *drug loading* (nel range 2.3-6.0%) e un profilo di rilascio controllato nel tempo per ciascun farmaco incorporato; inoltre, sono in grado di interagire stabilmente *in vitro* con le mucine. Pertanto, le opportune proprietà chimicofisiche e la capacità mucoadesiva di questo *ocular drug carriers* potrebbero essere vantaggiose per aumentare l'efficacia terapeutica dei farmaci incorporati limitando il *washing-out* dopo somministrazione oculare topica. L'impiego delle micelle HAC_{16b} in tale ambito potrebbe essere ulteriormente vantaggioso poiché è stato dimostrato che questi *carriers* sono in grado di agire da *penetration e/o permeation enhancers* per i corticosteroidi incorporati, sia in un modello di permeazione trans-corneale *in vitro* che soprattutto *ex vivo*.

Considerando i risultati incoraggianti ottenuti, la ricerca tecnologica svolta è stata indirizzata verso la realizzazione di nuovi sistemi micellari per la veicolazione dell'imatinib (I). È stato innanzitutto sintetizzato nuovo derivato anfifilico esadecilamminico dell'HA_{MINI} siglato HA-EDA-C₁₆, caratterizzato da un valore di DD_{C16mol%} pari al 12% e di DD_{EDAmol%} pari al 48.4%. È stato dimostrato che la

presenza dell'EDA sul *backbone* di HA non influenza il *self assembly* del derivato polimerico, che ha mostrato infatti dei valori di CAC analoghi a quelli ottenuti per il derivato HAC₁₆**b** (anch'esso caratterizzato da un DD_{C16}mol% del 12%). Grazie alla presenza dell'etilendiammina, il derivato è stato funzionalizzato con il PEG (derivato HA-EDA-C₁₆-PEG) o con la L-carnitina (derivato HA-EDA-C₁₆-CRN) allo scopo di migliorare il riconoscimento corneale. Le micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN preparate possiedono delle dimensioni adeguate (< 300 nm) tali da presupporre una potenziale somministrazione oculare topica; inoltre è stato dimostrato che la funzionalizzazione dello *shell* micellare migliora le proprietà mucoadesive del *carrier*. Il potenziale impiego di questi sistemi micellari come *ocular drug carriers* per l'imatinib è stato confermato dagli ottimi risultati ottenuti nel caricamento, con valori di *drug loading* compresi tra l'11 e il 13%, e nel profilo di rilascio del farmaco *in vitro* che è controllato nel tempo.

È stato dimostrato che le micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN (marcate con una sonda fluorescente) sono in grado di interagire con un monolayer di cellule epiteliali della cornea (studio *in vitro*) e con la complessa struttura corneale (studio *ex vivo*), confermando la capacità dei polimeri di natura anfifilica di interagire efficacemente con la struttura anfifilica corneale. Inoltre, questi *ocular drug carriers* sono in grado di veicolare l'imatinib attraverso la barriera corneale agendo da *penetration* e *permeation enhancers*, poiché consentono un aumento del valore di K_P del farmaco e che un'opportuna quantità di farmaco possa essere trattenuta all'interno della barriera cornea e fungere da potenziale *reservoir*. Infine, è stata confermata l'efficacia dell'imatinib di inibire lo *sprouting* vascolare e di indurre una regressione strutturale dei *network* cellulari già formati quando tale farmaco è incorporato all'interno delle micelle polimeriche. Pertanto, tutti i risultati ottenuti suggeriscono che le micelle di HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN potrebbero essere potenzialmente utilizzate per il rilascio di imatinib nella regione posteriore dell'occhio nel trattamento di patologie retiniche caratterizzate da un processo di neoangiogenesi.

La seconda linea di ricerca ha avuto come obiettivo la realizzazione di nanoparticelle polimeriche, utilizzando l'HAXs con M_w 100 kDa come biopolimero di partenza e la tecnica microfluidica. È stato sintetizzato il derivato etilendiamminico (EDA) ed ottadecilamminico (C₁₈) dell'HAXs, siglato HAXs-EDA-C₁₈, e le sue proprietà chimicofisiche sono state confrontate con quelle relative al derivato HA_{LMW}-EDA-C₁₈, sintetizzato a partire dall'HA_{LMW} con M_w 240 kDa; il grado di derivatizzazione molare in

C₁₈ e in EDA è analogo per entrambi i polimeri (DD_{C₁₈}mol% del 12% e DD_{EDA}mol% 30%). L'analisi reologica ha confermato la significativa riduzione di viscosità ottenuta con il derivato a più basso peso molecolare (M_w 125 kDa); pertanto l'impiego della dispersione acquosa HA_{XS}-EDA-C₁₈ all'1% è ottimale per la processabilità mediante tecnica microfluidica.

La produzione delle nanoparticelle è stata effettuata in un *micromixer chip* utilizzando DPBS come mezzo di nanoprecipitazione; è stato possibile controllare finemente le proprietà dimensionali dei nanosistemi prodotti (nel range 150-400 nm) modulando il *self assembly* del derivato polimerico all'interno dei canali del *micromixer chip* mediante la scelta di un opportuno rapporto di flusso interno/esterno.

Considerate le blande condizioni utilizzate per la loro produzione, le nanoparticelle HA_{XS}-EDA-C₁₈ possono essere impiegate come *ocular drug carriers* ideali per la veicolazione ed il rilascio d'imatinib alla retina, presupponendo un'eventuale somministrazione intravitreale. Le nanoparticelle HA_{XS}-EDA-C₁₈/I preparate sono caratterizzate da un'ottimale valore di *drug loading* pari al 13% circa; inoltre, modulando la molarità della fase acquosa per la nanoprecipitazione, è possibile ottenere un miglioramento nella resa in peso e un differente profilo di rilascio del farmaco nel tempo.

Le nanoparticelle sono state opportunamente funzionalizzate sullo *shell* esterno con un piccolo peptide RGD ciclico (RGDC) allo scopo di migliorare il riconoscimento da parte delle cellule endoteliali vasali mediante l'interazione con i recettori integrinici. È stata quindi messa a punto la sintesi del derivato polimerico HA_{XS}-EDA-C₁₈-RGDC, caratterizzato da un grado di derivatizzazione molare in RGDC pari al 5%. Pertanto, sono state prodotte le nanoparticelle HA_{XS}-EDA-C₁₈-RGDC e HA_{XS}-EDA-C₁₈-RGDC/I, dimostrando che la funzionalizzazione del polimero con il piccolo peptide non altera il processo di nanoprecipitazione in un mezzo a forza ionica controllata, le dimensioni particellari e la capacità di incorporare efficientemente l'imatinib. Inoltre, è stata confermata la capacità di entrambi i sistemi HA_{XS}-EDA-C₁₈/I e HA_{XS}-EDA-C₁₈-RGDC/I di veicolare il farmaco quando a contatto con le HUVEC, e l'efficacia dell'imatinib di inibire lo *sprouting* vascolare e di indurre la regressione strutturale dei *network* cellulari già formati. Infine, è stato possibile dimostrare qualitativamente la maggiore efficacia dell'imatinib quando veicolate all'interno delle nanoparticelle funzionalizzato con l'RGDC.

Pertanto, le nanoparticelle polimeriche progettate potrebbero costituire dei vantaggiosi *ocular drug delivery systems* per la veicolazione dell'imatinib e quindi per il suo impiego *off-label* nel trattamento di retinopatie a carattere neoangiogenico.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 Materiali

L'acido ialuronico (HA) con M_w inferiore a 10 kDa (HA_{MINI}) e con M_w pari a 100 kDa (HA_{XS}) sono stati acquistati presso Biophil Italia S.P.A. L'acido ialuronico (HA) a basso peso molecolare (HA_{LMW} , M_w pari a 240 kDa, indice di polidispersità 1.9) è stato prodotto come riportato precedentemente partendo dal sodio ialuronato EP Altergon (grado iniettabile ultrapuro) di origine biofermentativa ad elevato peso molecolare (HA_{HMW} , M_w di 1058 kDa, con una viscosità intrinseca a 25 °C compresa tra 1.60 e 2.00 m^3/kg) acquistato alla IBSA Farmaceutici Italia s.r.l. [265]. Il sale di tetrabuttilammonio dell'acido ialuronico (HA_{LMW} -TBA; HA_{XS} -TBA, HA_{MINI} -TBA) è stato prodotto seguendo una procedura riportata precedentemente [265].

L'esadecilammina ($C_{16}NH_2$), l'ottadecilammina ($C_{18}NH_2$), il bis(4-nitrofenil)carbonato (4-NPBC), il pirene, l'idrossido di tetrabuttilammonio (TBA-OH), il metossi-amminopolietilenglicole (PEG-NH₂, M_w 2 kDa), il O-metil-O'-[2-(6-oxocaproilammino)etil]polietilenglicole (PEG-aldeide M_w 2 kDa), la L-carnitina (CRN), il diclofenac sale sodico, la fluoresceina sale sodico, il tampone fosfato a pH 7.4 (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, DPBS), l'etanolo, il dimetilsolfossido anidro ($DMSO_A$), il dietil etere, il cloroformio ($CHCl_3$), il metanolo (MeOH), l'acetone, l'acetonitrile, la soluzione 5 % (p/v) di acido picrossolfonico (acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico, TNBS), il tetrametilammonio cloruro (TMACl), il Sephadex G-25, il desametasone (DEX), il triamcinolone (T), il triamcinolone acetone (TA), l'imatinib (I), l'acido 4-(2-idrossietil-1-piperazinil)-etansolfonico (HEPES), la mucina di tipo III (proveniente da stomaco di maiale, acido sialico legato 0.5-1.5% p/p), l'N-idrossisuccinimide (NHS), l'N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimide (EDC), gli inserti transwell Corning®Transwell®-COL rivestiti superiormente con il collagene (0.4 μm pores-6.5 mm Transwell-PTFE), *ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma* sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Italia).

L'etilendiammina (EDA) e l'acido 4-maleimidobutirrico (MLB) sono acquistati presso Fluka (Italia). Il peptide Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-ciclico (RGDC) è stato acquistato presso la Bachem (Svizzera).

Il tampone HEPES a pH 7.4, simulante i fluidi oculari, è stato preparato solubilizzando 5.96 g di HEPES e 9 g di NaCl in 1 L di acqua bidistillata, e aggiustando il pH con NaOH 5 M.

L'ossido di deuterio (D₂O), il cloruro di sodio (NaCl) e il sodio bicarbonato (NaHCO₃) sono stati acquistati presso la Merk (Italia).

L'AlexaFluor[®]-NHS₄₈₈ (*carboxylic acid, succinimidyl ester*) è stato acquistato presso Life Technologies--Thermo Fisher Scientific (USA). Il tetraidrofurano-d₈ (THF_{d8}) è stato acquistato da VWR (Italy), mentre il tetraidrofurano (THF) presso Alfa Aesar (Italia).

Le cellule epiteliali umane della cornea HCEpiC (*Human Corneal Epithelial Cells*) sono state acquistate presso ScienCell Research Laboratories (USA). Il mezzo di coltura basale utilizzato per le HCEpiC e i relative supplementi (estratto di ghiandola pituitaria BPE, il fattore di crescita epiteliale umano EGF) sono stati acquistati presso Gibco--Thermo Fisher Scientific (USA). Le cellule HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sono state acquistate presso ScienCell Research Laboratories (USA). Il mezzo di coltura *Endothelial Cell Growth Medium (all-in-one ready-to-use)* è stato acquistato presso Sigma-Aldrich (Italia).

Il kit per il saggio *LIVE & DEAD* è stato acquistato alla Thermo Fisher Scientific (Italia).

La vitalità cellulare è stata valutata usando il saggio MTS 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation, PROMEGA), seguendo le istruzioni del produttore (USA).

I bulbi oculari bovini sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" (Palermo, Italia), previa autorizzazione del veterinario competente dell'ASP di Palermo.

5.2 Strumentazioni

Gli spettri ¹H-NMR sono stati registrati con uno strumento Bruker Avance II 300 (300.12 MHz). Le misure UV sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2401PC e uno spettrofotometro Microplate Reader Multiskan Ex. Gli spettri FT-IR sono stati acquisiti con uno strumento Bruker Alpha.

Gli spettri di emissione del pirene sono stati acquisiti utilizzando uno spettrofluorimetro Shimadzu RF-5301 PC; la quantificazione della fluoresceina sodica e delle micelle fluo è stata condotta utilizzando uno spettrofluorimetro Plate Reader AF2200 Eppendorf.

La *Size Exclusion Chromatography* (SEC) è stata effettuata usando lo strumento Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution utilizzando come fase stazionaria la colonna Phenomenex PolySep-GFC-P 4000, il Bio-Dual Angle LS/DLS ed il rivelatore IR. Le analisi sono state effettuate usando come eluente la miscela costituita da una soluzione di TMACl allo 0.025 M e MeOH in rapporto 7:3 (v/v), con un flusso di 0.6 ml/min e con una temperatura di colonna di 35 °C (± 0.1 °C). I campioni sono stati solubilizzati in 700 μ l della soluzione TMACl 0.025 M, e successivamente sono stati aggiunti 300 μ l di MeOH. Gli standard di pullulano (nel range di peso molecolare compreso tra 5.9 e 788 kDa) sono stati usati per ottenere la curva di calibrazione. I campioni e gli standard di pullulano sono stati filtrati con un filtro da 0.45 μ m e sono stati iniettati nell'apparecchiatura SEC.

Le misure di Dynamic Light Scattering (DLS) sono state registrate a 25°C \pm 0.1 utilizzando un Malvern Zetasizer Nano ZS con laser a 532 nm e angolo di scattering fisso a 173°.

La quantificazione dei farmaci studiati è stata effettuata tramite analisi HPLC usando un HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity, accoppiato a Quat Pump VL G1311C Serial N° DEAB812844 e DAD 1260 VL G1315D Serial N° DEAAX05597. In particolare, si è ricorso a una cromatografia su fase inversa impiegando una colonna Luna Phenomenex C18 (100A size 250*4.60 mm) come fase stazionaria e un detector UV settato ad opportuna lunghezza d'onda (DEX: 246 nm; T e TA: 254 nm; I: 257 nm).

Le analisi reologiche sono state effettuate con uno strumento DHR-2 TA usando una geometria a piatti piani paralleli, con 8 mm di diametro e scanalature radiali per impedire la fuoriuscita della soluzione. I campioni sono stati versati direttamente sul piatto fisso (piatto inferiore), e la dipendenza della viscosità dalla velocità di taglio (da 1.6 a 108 s⁻¹) è stata studiata a 25 °C.

Le nanoparticelle sono state preparate utilizzando un'Elveflow[®] *Microfluidic Machine*, costituita da un controller della pressione OB1. La pressione di esercizio utilizzata è compresa tra 2 e 8 Bar, e sono stati utilizzati dei sensori di flusso nel range 0-5000 μ l/min con una precisione di ± 10 μ l/min. È stato utilizzato un micromixer chip a laminazione sequenziale in cui il flusso principale in entrata viene suddiviso in *n* sottoflussi grazie alla presenza di 12 regioni di miscelazione che amplificano il numero dei flussi laminari.

Per visualizzare la forma, la morfologia superficiale e la dimensione, le nanoparticelle sono state analizzate attraverso la microscopia a trasmissione elettronica (TEM). Le sospensioni sono state poste su griglie di rame coperte con pellicole, essiccate ed infine sono state visualizzate utilizzando un microscopio JEOL JEM-1400 Plus, a 80kV.

Le analisi al microscopio ottico e a fluorescenza per gli studi biologici *in vitro* sono state effettuate utilizzando un microscopio CareZeis Axio Vert.

5.3 Acido ialuronico LMW (240 kDa)

5.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei derivati HA_{LMW}C₁₈ e HA_{LMW}C₁₆

È stata adottata una procedura sintetica riportata nel brevetto WO2010/061500A1 [241]. L'HA_{LMW}-TBA è stato solubilizzato in DMSO_A alla concentrazione dell'1% (p/v). I gruppi -OH primari dell'HA sono stati attivati aggiungendo il 4-NPBC secondo una reazione condotta a 40°C per 4 h. I diversi derivati sono stati sintetizzati impostando il rapporto molare teorico $X = \text{mol 4-NPBC/mol u.r.HA}$ pari a 0.20, 0.15, 0.10, 0.05, 0.025 e 0.015. Nel secondo step di sintesi il pallone di reazione è stato posto a 60°C ed è stata aggiunta l'ammina scelta (C₁₈NH₂ o C₁₆NH₂), preventivamente solubilizzata in DMSO_A, impostando un rapporto molare teorico $Y = \text{mol C}_{16}\text{NH}_2/\text{mol 4-NPBC}$ pari a 10. Questa fase di funzionalizzazione è stata condotta per 20 h. Il work-up della reazione prevede l'aggiunta di un'aliquota opportuna di soluzione satura di NaCl (1 ml per ogni grammo di HA-TBA iniziale) sotto agitazione per 15 minuti, al fine di consentire lo scambio dello ione TBA con lo ione Na. La precipitazione del prodotto di reazione viene condotta in miscela di etere/cloroformio 1:1 (v/v). Sono stati eseguiti un paio di lavaggi nella stessa miscela, 3-4 lavaggi in etanolo 80% e infine in etanolo assoluto. Il prodotto è stato quindi essiccato.

La reazione di ogni singolo derivato è stata eseguita in triplicato. La resa in peso, espressa in funzione del peso iniziale dell'HA, e il grado di derivatizzazione molare (DDmol%) in ammina sono stati espressi come valore medio. Il grado di funzionalizzazione in catene alchilica (DD_{C₁₈}mol% o DD_{C₁₆}mol%) è stato calcolato attraverso analisi ¹H-NMR. Un tipico spettro ¹H-NMR in D₂O mostra segnali a: δ 0.75 (-CH₃ terminale della catena alchilica); δ 1.5 (gruppi metilenici della catena alchilica -CH₂-(CH₂)_n-CH₃, dove n=16 per C₁₈NH₂, e n=14 per C₁₆NH₂); δ 1.9 (gruppo metilico della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA); δ 3.3-4.0 (gruppi piranosidici dell'unità disaccaride dell'HA).

La determinazione della capacità di self-*assembling* dei copolimeri HA_{LMW}C₁₈ e HA_{LMW}C₁₆ sintetizzati è stata valutata mediante spettroscopia a fluorescenza impiegando il pirene come sonda fluorescente [266]. Il pirene è stato solubilizzato in acetone ad una

concentrazione di $6 \cdot 10^{-5}$ M. Aliquote di tale soluzione sono state poste nei vials e lasciati in orbital shaker a 37°C per far evaporare l'acetone, quindi è stata aggiunto un volume noto di soluzione di polimero a differente concentrazione, secondo un rapporto volumetrico 1:100 tra soluzione di pirene e soluzione di polimero. La concentrazione finale di pirene risulta essere pari a $6 \cdot 10^{-7}$ M. Per ogni copolimero studiato è stata preparata una serie di diluizioni in acqua e in DPBS considerando il range di concentrazione da $1 \cdot 10^{-4}$ mg/ml a 2 mg/ml. I campioni preparati sono incubati a 37°C over night. Gli spettri di emissione di fluorescenza del pirene sono stati registrati impiegando come lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente 373 nm e 333 nm; il rapporto delle intensità di fluorescenza I_{373}/I_{384} (riportato come I_1/I_3) derivante dallo spettro di emissione del pirene è riportato in grafico contro il logaritmo decimale della concentrazione polimerica. Il valore della CAC può essere determinato dal punto di intersezione della tangente alla porzione di curva crescente con la tangente alla porzione piana della curva stessa [267].

5.3.2 Preparazione e caratterizzazione delle micelle polimeriche $\text{HA}_{\text{LMW}}\text{C}_{16}$ e $\text{HA}_{\text{LMW}}\text{C}_{16}/\text{DEX}$

Le micelle polimeriche cariche di desametasone (DEX) sono state preparate utilizzando il metodo della dialisi, usando il derivato $\text{HA}_{\text{LMW}}\text{C}_{16}\mathbf{B}$ ($\text{DD}_{\text{C}_{16}}\text{mol}\%$ pari a 10.1%). Il farmaco è stato solubilizzato in miscela $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 1:1 (v/v); a questa soluzione è stato aggiunto il derivato $\text{HA}_{\text{LMW}}\text{C}_{16}$ scelto alla concentrazione del 0.3% (p/v), al fine di ottenere un rapporto in peso polimero/farmaco 1:0.5. La soluzione ottenuta è stata posta in dialisi MWCO 3.5 kDa contro H_2O per 4 ore, effettuando 6 cambi circa. La sospensione colloidale recuperata è stata opportunamente purificata per centrifugazione e filtrazione su $1 \mu\text{m}$. La dispersione micellare è stata quindi liofilizzata. In maniera analoga sono state preparate le micelle $\text{HA}_{\text{LMW}}\text{C}_{16}$ vuote.

Le micelle polimeriche vuote e contenenti il DEX sono state caratterizzate al DLS, disperdendo il campione liofilizzato in H_2O o in DPBS alla concentrazione di 1 mg/ml, per valutare la dimensione (nm) e il potenziale- ζ (mV).

Per la valutazione della *drug loading* % (DL%), i campioni sono stati solubilizzati in miscela $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 1:1 (v/v), filtrati su $0.45 \mu\text{m}$ e iniettati all'HPLC. È stata utilizzata la miscela acetonitrile/ H_2O 42:58 (v/v) come fase mobile, un flusso di 0.8 ml/min, e un valore di λ pari a 246 nm; in queste condizioni il tempo di ritenzione del DEX è pari a 8.5

minuti. La curva di taratura è stata costruita solubilizzando il farmaco miscela H₂O/THF 1:1 (v/v) in un range di concentrazione compreso tra 1 e 1·10⁻⁴ mg/ml.

I valori di DL% calcolati sono espressi come il rapporto percentuale tra i mg di farmaco nelle micelle e il peso totale delle micelle cariche.

5.3.3 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA_{LMW}-EDA-C₁₈

L'HA_{LMW}-TBA è stato solubilizzato in DMSO_A alla concentrazione dell'1% (p/v). L'attivazione dei gruppi ossidrilici primari è stata effettuata aggiungendo una quantità opportuna di 4-NPBC secondo un rapporto molare teorico (X) tra le moli di 4-NPBC e le moli di unità ripetitive di HA-TBA pari a 0.7; la reazione di attivazione è stata condotta a 40 °C per 4 ore. Trascorso questo tempo, alla soluzione è stata aggiunta sotto agitazione la C₁₈-NH₂ secondo un rapporto molare teorico (Y) tra le moli di C₁₈-NH₂ e le moli di unità ripetitive di 4-NPBC pari a 0.5. La fase di funzionalizzazione è stata condotta per 24 h a 60°C. Successivamente, la temperatura è stata nuovamente impostata a 40 °C ed è stato aggiunto il volume opportuno di etilendiammina (EDA) secondo un rapporto molare (Z) tra le moli di EDA e le moli di 4-NPBC pari a 10. Dopo 3 h, il work-up della reazione ha previsto l'aggiunta di un'opportuna aliquota di soluzione satura di NaCl (1 ml per ogni grammo di HA-TBA) sotto agitazione per 30 minuti per consentire lo scambio dello ione TBA con lo ione Na. È stata quindi effettuata la precipitazione del prodotto di reazione in una miscela dietil etere/cloroformio 1:1 (v/v). Sono stati eseguiti 4-5 lavaggi a caldo nella stessa miscela, poi 3-4 lavaggi in etanolo 80%, ed infine in etanolo assoluto. Il prodotto è stato quindi essiccato; la polvere ottenuta è stata solubilizzata in acqua bidistillata, congelata e liofilizzata.

Il derivato HA_{LMW}-EDA-C₁₈ è stato caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR e saggio colorimetrico al TNBS, per determinare rispettivamente il grado di derivatizzazione molare in ottadecilammina ed in EDA. Un tipico spettro ¹H-NMR del derivato HA_{LMW}-EDA-C₁₈ in D₂O/THFd₈ 2:1 (v/v) mostra i segnali a: δ 0.99 (-CH₃ terminale della catena ottadecilamminica); δ 1.5 (gruppi metilenici delle catene alchiliche -CH₂(CH₂)₁₆CH₃); δ 1.9 (gruppo metilico della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA); δ 3.3-4.0 (gruppi piranosidici delle unità disaccaridiche dell'HA). La derivatizzazione molare in gruppi amminici è stata determinata attraverso il saggio colorimetrico al TNBS, preparando una curva di calibrazione con il PEG-NH₂ (M_w 2 kDa) [242,268].

Il peso molecolare (M_w) e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati determinati tramite analisi SEC (vedi paragrafo 5.2). Inoltre è stata effettuata una caratterizzazione volta a valutare il profilo reologico della soluzione di HA_{LMW}-EDA-C₁₈ all'1% p/v in acqua distillata (vedi paragrafo 5.2).

5.4 Acido ialuronico MINI (<10 kDa) e i derivati HAC₁₆

5.4.1 Sintesi e caratterizzazione dei derivati HAC₁₆

La sintesi dei derivati dell'HA_{MINI} con l'esadecilammina è stata condotta seguendo una procedura di sintesi simile a quella riportata precedentemente (vedi paragrafo 5.3.1). In particolare, tre derivati sono stati sintetizzati variando il rapporto molare teorico (X) tra le moli 4-NPBC e le moli u.r. HA, che risulta essere pari a 0.20, 0.15 e 0.10. Il rapporto molare teorico $Y = \text{mol C}_{16}\text{NH}_2 / \text{mol 4-NPBC}$ utilizzato risulta essere pari a 10 per tutti i derivati. Il work-up della reazione segue la procedura già riportata precedentemente. Dopo l'isolamento del prodotto finale per precipitazione, il polimero è stato opportunamente lavato un paio di volte nella miscela di precipitazione; successivamente sono stati condotti 3-4 lavaggi in etanolo 90% e infine in etanolo assoluto. Il prodotto è stato quindi essiccato. La reazione di ogni singolo derivato è stata eseguita in triplicato; la resa in peso è espressa in funzione del peso iniziale dell'HA ed espressa come valore medio. Il grado di derivatizzazione molare in C₁₆ (DD_{C16}mol%) è stato calcolato attraverso analisi ¹H-NMR (in miscela D₂O/THF_{d8} 3:2 v/v). Inoltre, l'HA_{MINI} e i derivati ottenuti, siglati rispettivamente HAC_{16a} (per X=0.20), HAC_{16b} (per X=0.15) e HAC_{16c} (per X=0.10), sono stati caratterizzati tramite analisi SEC.

Per tutti i derivati polimerici sintetizzati è stata effettuata la determinazione della CAC, mediante saggio del pirene, in acqua, DPBS e in tampone HEPES pH 7.4. L'analisi è stata condotta in triplicato (vedi paragrafo 5.3.1).

5.4.2 Preparazione e caratterizzazione delle micelle HAC₁₆

Il metodo dell'evaporazione del co-solvente è stato scelto per la preparazione delle micelle polimeriche HAC₁₆ e il caricamento di corticosteroidi. Inizialmente il farmaco (DEX, T, TA) e il derivato HAC₁₆ vengono solubilizzati in miscela THF/H₂O 1:1 (v/v) (nel caso del DEX) o 1:0.5 (v/v) (per T e TA), ad una concentrazione polimerica pari a 0.3% p/v. In tutti i casi, il rapporto in peso tra HAC₁₆ e farmaco è pari a 1:0.75. La soluzione di polimero e

farmaco è posta su una piastra agitante, quindi viene indotta l'evaporazione del THF sotto agitazione vorticoso (1000 rpm) per 3 ore a temperatura ambiente. Successivamente viene aggiunta un'opportuna aliquota di H₂O per ristabilire il volume iniziale, e la dispersione è lasciata agitare per altre 2 ore. La dispersione colloidale finale viene centrifugata, filtrata su 1 µm, e successivamente liofilizzata.

Le micelle vuote sono state preparate in maniera analoga usando la miscela THF/H₂O 1:1 (v/v) come fase iniziale di solubilizzazione.

Le micelle HAC_{16a}, **b** e **c** vuote e cariche di farmaco (DEX, T o TA) sono state caratterizzate tramite DLS in H₂O bidistillata, DPBS e tampone HEPES pH 7.4; ogni analisi è stata condotta in triplicato. La stabilità delle micelle vuote e cariche, in termini di dimensione (nm) e potenziale-ζ (mV), è stata valutata in DPBS a 25°C entro 7 giorni.

La *Drug Loading* % (DL%) delle micelle cariche di DEX, T e TA è stata valutata tramite analisi HPLC (vedi paragrafo 5.3.2 per DEX). Per la quantificazione del T e TA, i campioni vengono direttamente dispersi in MeOH e l'estrazione del farmaco viene condotta *overnight*. La metodica HPLC prevede l'impiego del MeOH come fase mobile, con un flusso pari a 0.5 ml/min; in queste condizioni il tempo di ritenzione è 5.4 e 5.8 min rispettivamente per T e TA.

I valori di DL% calcolati sono espressi come rapporto percentuale tra i mg di farmaco nelle micelle e il peso totale delle micelle cariche.

5.4.3 Studio di rilascio *in vitro* dei corticosteroidi dalle micelle

Il rilascio dei corticosteroidi dalle micelle HAC_{16a} e HAC_{16b} è stato studiato *in vitro* per 48 ore utilizzando il metodo della dialisi. Ogni campione è stato disperso in DPBS alla concentrazione dell'1% (p/v), ponendo all'interno della dialisi (MWCO 1 kDa) una quantità di campione tale da avere una concentrazione di farmaco pari a 0.5 mg/ml. La dialisi è posta in DPBS, impostando un rapporto tra volume interno ed esterno alla dialisi pari a 1:10. Lo studio è condotto per 48 ore a 37°C ponendo i campioni in orbital shaker (100 rpm). A tempi prestabili, 1 ml di mezzo esterno è prelevato e sostituito con mezzo fresco, in modo tale da garantire le condizioni sink.

La quantità di DEX e di T rilasciata nel tempo è determinata mediante analisi UV-VIS ($\lambda=246$ nm per DEX, $\lambda=254$ nm per T) dei campioni prelevati. La quantità di TA è stata valutata mediante analisi HPLC; i campioni sono stati liofilizzati, trattati con MeOH *overnight*, filtrati su 0.45 µm e iniettati all'HPLC.

Le soluzioni di farmaco (DEX e T=0.05mg/ml; TA=0.01 mg/ml) e le sospensioni di farmaco libero (0.5 mg/ml) in DPBS sono state utilizzate come confronto.

5.4.4 Studio di trasmittanza delle micelle HAC₁₆

La proprietà mucoadesiva delle micelle HAC_{16a} e HAC_{16b} è stata valutata effettuando uno studio di trasmittanza. La dispersione micellare è miscelata con la dispersione di mucina secondo un rapporto volumetrico 1:1, utilizzando il DPBS come mezzo disperdente. La concentrazione finale della mucina è pari a 1 mg/ml, mentre la concentrazione finale delle micelle è pari a 0.5, 1 e 5 mg/ml. I campioni sono incubati a 35°C e a tempi prestabiliti (da 0 a 360 min) è stata valutata l'assorbanza a 500 nm. Il comportamento dell'HA_{XS} è stato studiato analogamente per valutare come la funzionalizzazione e la riorganizzazione in micelle possa influenzare la proprietà mucoadesiva propria del polisaccaride. I valori di assorbanza ottenuti sono stati rielaborati ed espressi come Trasmittanza %, mettendo in rapporto la trasmittanza del campione con quella della dispersione di mucina. La diminuzione del valore di Trasmittanza % di un campione è indice di un fenomeno mucoadesivo. Ogni esperimento è stato condotto su sei campioni.

5.4.5 Studio di citocompatibilità *in vitro*

Per valutare la citocompatibilità delle micelle HAC_{16b} preparate, le cellule HCEpiC (passaggio 2-3) sono state piastrate alla densità di 10000 cellule per pozzetto in una piastra da 96, e incubate a 37°C *overnight* (5% CO₂).

È stata preparata una dispersione micellare in DPBS alla concentrazione di 10 mg/ml, e questa è stata sterilizzata per filtrazione su 0.22 µm. Per dimostrare che tale processo non altera le caratteristiche del campione, la dimensione particellare è stata valutata prima e dopo filtrazione tramite analisi di DLS.

Le micelle vengono successivamente diluite con mezzo cellulare nel range 0.01–0.7 mg/ml. Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 200 µl di dispersione micellare; dopo 6 e 24 ore di incubazione è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS. I valori di assorbanza ($\lambda=490$ nm) ottenuti sono stati rielaborati ed espressi come Vitalità cellulare %, calcolando il rapporto tra la densità ottica del campione e quella del controllo positivo di HCEpiC in TCPS (*Tissue Culture Polystyrene*) non trattate.

Inoltre, la stabilità (dimensione e potenziale- ζ) delle micelle HAC_{16b} vuote e cariche di DEX, T e TA (alla concentrazione di 1 mg/ml) è stata valutata in mezzo cellulare completo a 37 °C per 7 giorni dopo la preparazione.

5.4.6 Studi di permeazione trans-corneale

5.4.6.1 Permeazione trans-corneale *in vitro*

Lo studio di permeazione trans-corneale *in vitro* è stato condotto utilizzando le HCEpiC e sistemi transwell rivestiti superiormente da un film di collagene (0.4 μ m pores-6.5 mm Transwell-PTFE membrane insert, Corning). Le cellule sono state così incubate indisturbate per 24 ore (5% CO₂) alla concentrazione di 10⁵ cellule/transwell; il mezzo è stato quindi sostituito con mezzo fresco ogni giorno fino a completa confluenza delle cellule [134,269,270]. In particolare, sono stati posti rispettivamente 150 μ l e 650 μ l di mezzo cellulare completo nel compartimento donatore e nell'accettore. Il giorno dell'esperimento, nel compartimento donatore il mezzo è stato sostituito con 150 μ l di una dispersione micellare contenente una concentrazione di farmaco pari a 100 μ g/ml. I campioni sono stati incubati a 37 °C (5% CO₂), e a tempi prestabiliti, nell'intervallo di 0-6 ore, aliquote da 200 μ l sono state prelevate dal compartimento accettore e immediatamente sostituite con mezzo cellulare fresco. I campioni raccolti sono stati liofilizzati, trattati con un solvente organico (THF per il DEX, MeOH per T e TA) e analizzati all'HPLC.

La stessa procedura è stata utilizzata per valutare il profilo di permeazione trans-corneale del farmaco in soluzione (50 μ g/ml per DEX e T; 25 μ g/ml per TA). Nel caso della soluzione di TA, il farmaco è stato inizialmente solubilizzato in MeOH e successivamente diluito in mezzo cellulare, considerando una quantità residua di MeOH dell'1% (v/v).

I risultati sono espressi come farmaco permeato attraverso lo strato cellulare (μ g/cm²) in funzione del tempo di incubazione. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

5.4.6.2 Permeazione trans-corneale *ex vivo*

Lo studio di permeazione trans-corneale *ex vivo* è stato condotto su cornee bovine estratte da bulbi oculari bovini ottenuti da un mattatoio locale. In particolare, tutti i tessuti sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A. Mirri" (Palermo, Italia) previa autorizzazione del Dipartimento di Prevenzione Veterinario (ASP-Palermo, Italia).

Gli occhi bovini recuperati sono stati immersi per 2 ore in DPBS contenente streptomina al 2% (v/v). Le cornee sono state isolate mediante asportazione della parte anteriore del

bulbo oculare e successivo distacco manuale della cornea integra dal sottostante iride. I campioni tissutali così ottenuti sono stati lavati in tampone HEPES pH 7.4 e immediatamente usati per gli esperimenti di permeazione trans-corneale, utilizzando la cella di diffusione verticale di Franz come modello *ex vivo*. La cornea bovina è stata utilizzata come membrana interposta tra il compartimento donatore e il compartimento accettore, entrambi riempiti con tampone HEPES pH 7.4 alla temperatura di $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Dopo un iniziale condizionamento del sistema (15 min), nel compartimento donatore sono stati posti 300 μl di una dispersione di HAC₁₆**b**/DEX, HAC₁₆**b**/T o HAC₁₆**b**/TA in HEPES pH 7.4; per ogni sistema, la concentrazione di farmaco utilizzata è stata pari a 500 $\mu\text{g/ml}$. Il compartimento accettore è riempito con 4.5 ml di tampone HEPES pH 7.4; ogni esperimento è condotto su sei campioni per 6 ore, sotto costante agitazione (50 rpm), e ad intervalli di tempo prestabiliti (da 0 a 6 ore) sono stati prelevati dal braccio laterale 200 μl di soluzione del compartimento accettore. Questi sono stati immediatamente sostituiti con un uguale volume di tampone HEPES pH 7.4 fresco per mantenere le condizioni sink del sistema. Tutti i campioni sono stati liofilizzati, trattati con un'opportuna aliquota di solvente organico (THF per DEX, MeOH per T e TA) e iniettati all'HPLC. Al termine dell'esperimento, le cornee sono state lavate rapidamente con il tampone, quindi sono state trattate overnight a 37°C con 2 ml di THF o MeOH per estrarre rispettivamente DEX e T o TA intrappolato. Anche in questo caso, i campioni sono stati filtrati su $0.45\ \mu\text{m}$ e iniettati opportunamente all'HPLC allo scopo di determinare la quantità di farmaco trattenuta dalla cornea alla fine dell'esperimento.

Parallelamente, lo studio di permeazione transcorneale è stato effettuato usando 300 μl di una soluzione di farmaco libero alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ e di una sospensione di farmaco libero alla concentrazione di 500 $\mu\text{g/ml}$. Nel caso del TA, la soluzione è stata preparata dissolvendo inizialmente il farmaco in MeOH e diluendo successivamente in tampone HEPES. Tutti i risultati sono espressi come $\mu\text{g/cm}^2$ di farmaco permeato in funzione del tempo.

La convalida del modello *ex vivo* è stata condotta per 6h usando la fluoresceina sale sodico (FLUO) ed il diclofenac sale sodico (DICL) come molecole modello, alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$. Al termine dello studio, le cornee sono state trattate con 2 ml di DMSO per 3h per estrarre il DICL, mentre con EtOH per 3h per estrarre la FLUO. Per la quantificazione del DICL, tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda 277 nm; per la quantificazione della FLUO invece è stata condotta un'analisi spettrofluorimetrica alle lunghezze d'onda di emissione e

di eccitazione pari a 520 nm e 485 nm rispettivamente. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su sei campioni.

5.5 Acido ialuronico MINI (<10 kDa) e i derivati HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN

5.5.1 Sintesi e caratterizzazione dei derivati HA-EDA-C₁₆

La sintesi dei derivati dell'HA ($M_w < 10$ kDa) con l'esadecilammina (C₁₆NH₂) e l'etilendiammina (EDA) è stata condotta seguendo una procedura di sintesi simile a quella riportata precedentemente (vedi paragrafo 5.3.3). In particolare, tutti i derivati sono stati sintetizzati impostando il rapporto molare teorico (X) tra le moli 4-NPBC e le moli u.r. HA pari a 0.70. Il rapporto molare teorico Y tra le moli C₁₆NH₂ e le moli 4-NPBC cambia per ogni derivato, e risulta essere pari a 0.30, 0.20 e 0.15. Infine, il rapporto molare teorico Z tra le moli di EDA e le moli 4-NPBC risulta essere sempre pari a 2.

Il work-up della reazione prevede, dopo l'aggiunta di un'aliquota di soluzione satura di NaCl, l'isolamento del prodotto finale per precipitazione in EtOH; il derivato polimerico è stato opportunamente lavato un paio di volte in EtOH, poi 3-4 volte in EtOH 90% e infine nuovamente in etanolo assoluto. Il prodotto è stato quindi essiccato. La reazione di ogni singolo derivato è stata eseguita in triplicato; la resa in peso è calcolata in funzione del peso iniziale dell'HA ed espressa come valore medio. Il grado di derivatizzazione molare in esadecilammina (DD_{C₁₆}mol%) è stato calcolato attraverso analisi ¹H-NMR solubilizzando il campione in miscela D₂O/THF_{d8} 3:2 (v/v), mentre il grado di derivatizzazione molare in EDA (DD_{EDAM}mol%) è stato calcolato tramite saggio colorimetrico TNBS [268].

La determinazione della CAC dei derivati HA-EDA-C₁₆**A**, HA-EDA-C₁₆**B** e HA-EDA-C₁₆**C** sintetizzati è stata effettuata mediante saggio del pirene in acqua, in DPBS e in tampone HEPES pH 7.4 (vedi paragrafo 5.3.1).

5.5.2 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA-EDA-C₁₆-PEG

Per la sintesi del derivato HA-EDA-C₁₆-PEG, il derivato HA-EDA-C₁₆ è stato solubilizzato in H₂O a pH 6.5; il PEG-aldeide è stato aggiunto alla soluzione impostando un rapporto molare tra le moli di PEG e le moli di HA-EDA-C₁₆ pari a 0.10. Il pH della soluzione è stato controllato e impostato ad un valore di 6.5; la reazione è condotta a temperatura

ambiente per 24 ore, sotto costante agitazione. Il work-up della reazione ha previsto un processo di purificazione mediante dialisi (MWCO 3.5 kDa); il derivato polimerico così ottenuto è stato trattato mediante freeze-drying.

La reazione è stata eseguita in triplicato; la resa in peso è calcolata rispetto al peso iniziale del derivato HA-EDA-C₁₆ ed espressa come valore medio.

Il grado di derivatizzazione molare in PEG (DD_{PEGmol%}) è stato calcolato direttamente attraverso analisi ¹H-NMR, ed indirettamente tramite il saggio colorimetrico TNBS. In particolare, lo spettro del derivato HA-EDA-C₁₆-PEG in D₂O mostra i segnali a: δ 0.99 (-CH₃ terminale della catena esadecilamminica); δ 1.5 (gruppi metilenici delle catene alchiliche -CH₂(CH₂)₁₄CH₃); δ 1.9 (gruppo metilico della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA); δ 3.3-4.0 (gruppi piranosidici delle unità disaccaridiche dell'HA); δ 3.6 (gruppi metilenici del PEG).

La determinazione della CAC del derivato HA-EDA-C₁₆-PEG è stata effettuata mediante saggio del pirene in acqua, in DPBS e in tampone HEPES pH 7.4 (vedi paragrafo 5.3.1).

5.5.3 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA-EDA-C₁₆-CRN

Per la sintesi del derivato HA-EDA-C₁₆-CRN, la L-carnitina è stata solubilizzata in H₂O a pH 5 ed è stata aggiunta un'opportuna quantità di NHS e successivamente di EDC, secondo un rapporto molare mol_{NHS}/mol_{CRN} e mol_{EDC}/mol_{CRN} pari a 1.5. La reazione di attivazione del gruppo carbossilico della L-carnitina è stata condotta per 4 ore a temperatura ambiente. Successivamente, la soluzione preparata è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione vorticoso ad una soluzione acquosa di HA-EDA-C₁₆ all'1% (p/v), secondo un rapporto molare tra L-carnitina e polimero pari a 0.10. La reazione di funzionalizzazione è stata condotta per 20 ore a temperatura ambiente, sotto costante agitazione.

Il work-up della reazione ha previsto un processo di purificazione mediante dialisi (MWCO 2 kDa); il derivato polimerico così ottenuto è stato essiccato mediante freeze-drying. La reazione è stata eseguita in triplicato; la resa in peso è espressa in funzione del peso iniziale del derivato HA-EDA-C₁₆ ed espressa come valore medio.

Il grado di derivatizzazione molare in CRN (DD_{CRNmol%}) è stato calcolato direttamente attraverso analisi ¹H-NMR, ed indirettamente tramite il saggio colorimetrico TNBS. In particolare, lo spettro del derivato HA-EDA-C₁₆-CRN in D₂O mostra i segnali a: δ 0.99 (-CH₃ terminale della catena esadecilamminica); δ 1.5 (gruppi metilenici delle catene

alchiliche $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$); δ 1.9 (gruppo metilico della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA); δ 2.8 ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ della L-carnitina); δ 3.3-4.0 (gruppi piranosidici delle unità disaccaridiche dell'HA).

La determinazione della CAC del derivato HA-EDA-C₁₆-CRN è stata effettuata mediante saggio del pirene in acqua, in DPBS e in tampone HEPES pH 7.4 (vedi paragrafo 5.3.1).

5.5.4 Preparazione e caratterizzazione delle micelle vuote e cariche di imatinib

Il metodo dell'evaporazione del co-solvente è stato scelto per la preparazione delle micelle polimeriche HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG, HA-EDA-C₁₆-CRN e il caricamento di imatinib (I). Inizialmente il derivato polimerico ed il farmaco sono solubilizzati in una miscela THF/H₂O 1:1 (v/v) ad una concentrazione polimerica pari a 0.3% (p/v), e impostando un rapporto in peso polimero/farmaco pari a 1:0.5. La soluzione preparata è posta su una piastra agitante e viene indotta l'evaporazione del solvente organico sotto agitazione vorticoso (1000 rpm) per 3 h a temperatura ambiente. Successivamente viene aggiunta un'opportuna aliquota di H₂O al fine di ristabilire il volume iniziale impiegato; il campione viene lasciato sotto agitazione vorticoso per un'ora. La dispersione colloidale finale viene centrifugata, filtrata su 1 μm , e successivamente liofilizzata.

Le micelle vuote sono state preparate in maniera analoga.

Le micelle vuote HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG, HA-EDA-C₁₆-CRN e le micelle cariche di farmaco HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I, HA-EDA-C₁₆-CRN/I sono state caratterizzate tramite DLS disperdendo il campione in H₂O bidistillata, DPBS e tampone HEPES pH 7.4. Ogni analisi è stata condotta in triplicato. La stabilità delle micelle vuote e cariche, in termini di dimensione (nm) e potenziale ζ (mV), è stata valutata in DPBS a 25°C entro 7 giorni.

La *Drug Loading* % delle micelle cariche è stata valutata tramite analisi HPLC. In particolare, il campione è stato disperso in MeOH *overnight*, quindi filtrato su 0.45 μm e iniettato all'HPLC. Il metodo HPLC utilizzato per l'imatinib prevede l'impiego di MeOH come fase mobile, un flusso pari a 0.8 ml/min e una lunghezza d'onda del detector UV pari a 257 nm; in queste condizioni, il tempo di ritenzione dell'imatinib è di 3.9 min. I valori di DL% calcolati sono espressi come il rapporto percentuale tra i mg di farmaco nelle micelle e il peso totale delle micelle cariche.

5.5.5 Studio di trasmittanza delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN

La proprietà mucoadesiva delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN è stata valutata effettuando uno studio di trasmittanza su una miscela di micelle (5mg/ml) e di mucina (1 mg/ml) in dispersione acquosa (DPBS), come riportato precedentemente (paragrafo 5.4.4).

5.5.6 Studio di rilascio *in vitro* dell'imatinib dalle micelle

Il profilo di diffusione dell'imatinib caricato nelle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN è stato studiato utilizzando il metodo della dialisi per 48 ore, come descritto precedentemente (paragrafo 5.4.3). In particolare, è stata preparata la dispersione micellare all'1% (p/v) in DPBS utilizzando una quantità di campione tale da avere una quantità di farmaco pari a 0.5 mg/ml.

I dati di rilascio ottenuti sono stati confrontati con il profilo di diffusione dell'imatinib dalla soluzione (0.025 mg/ml) e con il profilo di dissoluzione dalla sospensione (0.5 mg/ml). In particolare, per la soluzione di I è stata preparata inizialmente una soluzione concentrata in MeOH (2.5 mg/ml) che è stata successivamente diluita in DPBS fino ad ottenere la concentrazione desiderata. La quantità di I rilasciata nel tempo è determinata mediante analisi UV-VIS ($\lambda = 257$ nm) dei campioni prelevati. Lo studio è stato condotto in triplicato.

5.5.7 Studio di citocompatibilità *in vitro*

Per valutare la citocompatibilità delle micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN, è stato condotto un saggio di vitalità su differenti linee cellulari. Innanzitutto, è stata preparata una dispersione micellare in DPBS, sterilizzata per filtrazione su 0.22 μ m; l'analisi al DLS è stata condotta sul campione pre- e post-filtrazione. Inoltre è stata valutata la stabilità (dimensione e potenziale- ζ) delle micelle polimeriche vuote e cariche di I (alla concentrazione di 1 mg/ml) in mezzo cellulare completo per le HCEpiC a 37 °C per 7 giorni dopo la preparazione.

Il saggio di vitalità sulle cellule HCEpiC è stato condotto in maniera analoga a quello riportato nel paragrafo 5.4.5.

Il saggio di vitalità sulle HUVEC è stato condotto utilizzando le cellule al passaggio 6-7. Le cellule sono state piastrate alla densità di $3 \cdot 10^4$ cell/pozzetto in una piastra da 96, e

incubate a 37°C *overnight* (5% CO₂). Il primo studio di vitalità cellulare è stato condotto utilizzando concentrazioni crescenti di imatinib in soluzione; è stata preparata una soluzione di imatinib in DMSO (10 mg/ml) che è stata opportunamente diluita in mezzo cellulare per le HUVEC nel range di 0.5-125 µg/ml. In tali condizioni operative la massima quantità di solvente organico residua è dell'1.25% (v/v); è stata anche valutata la citocompatibilità del mezzo cellulare per le HUVEC con una quantità di DMSO pari all'1.25% (v/v). Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 150 µl di ogni soluzione preparata; dopo 24 ore di incubazione è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS.

Per il secondo studio, le micelle HA-EDA-C₁₆, HA-EDA-C₁₆-PEG e HA-EDA-C₁₆-CRN vuote e cariche di imatinib sono state disperse in DPBS (3 mg/ml) e diluite in mezzo cellulare alla concentrazione polimerica finale di 0.3 mg/ml. Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 150 µl di dispersione micellare; dopo 6 e 24 ore di incubazione è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS.

Per tutti gli esperimenti, i valori di assorbanza ($\lambda=490$ nm) ottenuti sono stati rielaborati ed espressi come Vitalità cellulare %, calcolando il rapporto tra la densità ottica del campione e quella del controllo positivo di HUVEC in TCPS (*Tissue Culture Polystyrene*) non trattate.

5.5.8 Studi di permeazione trans-corneale

5.5.8.1 Permeazione trans-corneale *in vitro*

Lo studio di permeazione trans-corneale *in vitro* è stato condotto utilizzando le cellule HCEpiC (1•10⁵ cellule per pozzetto) e sistemi transwell, come descritto precedentemente (paragrafo 5.4.6.1). In particolare, l'esperimento è stato condotto utilizzando 150 µl di una dispersione micellare HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I e HA-EDA-C₁₆-CRN/I (concentrazione di farmaco pari a 100 µg/ml), una soluzione di imatinib (solubilizzato in MeOH alla concentrazione di 2.5 mg/ml, poi diluita con mezzo cellulare ad una concentrazione di 25 µg/ml), e una dispersione di micelle fluorescenti alla concentrazione di 2 mg/ml.

Le micelle fluorescenti, siglate HA-EDA-C₁₆-AlexaFluor₄₈₈, HA-EDA-C₁₆-PEG-AlexaFluor₄₈₈ e HA-EDA-C₁₆-CRN-AlexaFluor₄₈₈, sono state preparate disperdendo le micelle vuote (25 mg) in 5 ml di una soluzione tampone di NaHCO₃ a pH 8.3. Successivamente alla dispersione micellare è stato aggiunto l'AlexaFluor-NHS₄₈₈ (1 mg), preventivamente solubilizzato in 100 µl di DMSO. Il pH è stato corretto per ottenere un

valore di 8.3, e la reazione è stata condotta per 1 h a temperatura ambiente sotto continua agitazione e al riparo dalla luce. Ogni prodotto ottenuto è stato purificato mediante GPC, usando il Sephadex G25, quindi liofilizzato. Le rese in peso delle micelle HA-EDA-C₁₆-AlexaFluor₄₈₈, HA-EDA-C₁₆-PEG-AlexaFluor₄₈₈ e HA-EDA-C₁₆-CRN-AlexaFluor₄₈₈ preparate sono rispettivamente pari a 95.1 ± 0.9 , 97.4 ± 1.6 e 96.8 ± 2.1 .

Per studio di permeazione trans-corneale *in vitro* con le micelle fluorescenti, le aliquote prelevate ai tempi prestabiliti sono state direttamente analizzate allo spettrofluorimetro (λ_{ECC} : 485 nm; λ_{EM} : 520 nm). Tutti gli altri campioni raccolti sono stati liofilizzati, trattati con MeOH, filtrati su 0.45 μm e analizzati all'HPLC; i risultati sono espressi come quantità di farmaco permeata attraverso lo strato cellulare ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in funzione del tempo di incubazione (h). Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

5.5.8.2 Permeazione trans-corneale ex vivo

Lo studio di permeazione trans-corneale *ex vivo* è stato condotto utilizzando celle di diffusione verticale di Franz, e le cornee bovine come membrane interposte tra il compartimento donatore e il compartimento accettore (paragrafo 5.4.6.2). Nel compartimento donatore sono stati posti 300 μl di una dispersione di HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I e HA-EDA-C₁₆-CRN/I, considerando una concentrazione di farmaco pari a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Lo studio di permeazione trans-corneale è stato effettuato anche usando la soluzione di farmaco libero alla concentrazione di 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (l'imatinib è solubilizzato in MeOH alla concentrazione di 2.5 mg/ml, poi diluito con tampone HEPES pH 7.4), la sospensione di farmaco libero alla concentrazione di 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e le micelle HA-EDA-C₁₆-AlexaFluor₄₈₈, HA-EDA-C₁₆-PEG-AlexaFluor₄₈₈ e HA-EDA-C₁₆-CRN-AlexaFluor₄₈₈ (3 mg/ml).

Le aliquote raccolte per lo studio di permeazione delle micelle fluorescenti sono state direttamente analizzate allo spettrofluorimetro (λ_{ECC} : 485 nm; λ_{EM} : 520 nm); tutti gli altri campioni sono stati liofilizzati, trattati con MeOH, filtrati su 0.45 μm e iniettati all'HPLC.

Inoltre, al termine dell'esperimento, le cornee sono state lavate rapidamente con il tampone, quindi sono state trattate overnight a 37 °C con 2 ml di MeOH per estrarre l'imatinib intrappolato. Anche in questo caso, i campioni sono stati filtrati su 0.45 μm e iniettati opportunamente all'HPLC allo scopo di determinare la quantità di farmaco trattenuta dalla cornea alla fine dell'esperimento.

5.5.9 Saggio di *sprouting* vascolare

La *sprouting* vascolare è stato studiato preparando un modello *in vitro* di HUVEC sul matrigel (*ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma*). In particolare, ogni pozzetto di una piastra a 96 è stato rivestito con una quantità opportuna di matrigel (50 μ l), gelificato a 37 °C, allo scopo di creare una membrana basale ricca di fattori pro-angiogenici sulla quale le HUVEC ($3 \cdot 10^4$ cell/pozzetto) possono formare strutture tubulari. Il primo studio ha previsto il caricamento simultaneo delle HUVEC e dell'imatinib (soluzione o caricato all'interno della micelle) sul matrigel, per studiare la capacità del farmaco di inibire lo *sprouting* delle cellule. Nel caso della soluzione, l'imatinib è stato utilizzato a diverse concentrazioni nel range 5-25 μ g/ml (la soluzione di imatinib in DMSO alla concentrazione di 10 mg/ml è stata diluita in mezzo cellulare); il processo di formazione dei tubuli cellulari è stato studiato per 6 ore. Nel caso delle micelle polimeriche, i campioni sono stati dispersi in DPBS (1 mg/ml), filtrati su 0.2 μ m, e diluiti opportunamente (0.3 mg/ml) per ottenere una concentrazione di farmaco pari a 40 μ g/ml. In questo caso, la valutazione dell'inibizione dello *sprouting* è stata condotta per 24 ore. Nel secondo studio, è stata effettuata un'analisi qualitativa della variazione strutturale del *network* cellulare preformato sul matrigel. In particolare, le HUVEC sono state caricate sul matrigel ($3 \cdot 10^4$ cell/pozzetto); dopo completa formazione del *network* capillare, ad ogni pozzetto è stata aggiunta un'opportuna aliquota (150 μ l) di imatinib in soluzione (range 5-25 μ g/ml; è stata preparata una soluzione in DMSO alla concentrazione di 10 mg/ml, successivamente diluita in mezzo cellulare) o di dispersione micellare HA-EDA-C₁₆/I, HA-EDA-C₁₆-PEG/I e HA-EDA-C₁₆-CRN/I, considerando una concentrazione di farmaco pari a 40 μ g/ml (ogni dispersione micellare è stata preparata come descritto precedentemente in questo paragrafo). L'analisi è stata condotta per 24 ore. Le immagini sono state acquisite con un ingrandimento 10X, utilizzando un microscopio ottico CareZeis Axio Vert. Inoltre, il saggio *Live&Dead* è stato condotto seguendo la procedura riportata dalla casa produttrice.

5.6 Acido ialuronico XS (100 kDa) e i derivati HA_{XS}-EDA-C₁₈ e HA_{XS}-EDA-C₁₈-RGDC

5.6.1 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA_{XS}-EDA-C₁₈

L'HA_{XS}-EDA-C₁₈ è stato ottenuto mediante un procedimento sintetico analogo a quello già riportato nel paragrafo 5.3.3. In particolare, in seguito alla fase di scambio ionico tra lo ione TBA⁺ e lo ione Na⁺, la soluzione di reazione è stata precipitata in miscela dietil etere/cloroformio 1:1 (v/v). Il prodotto, recuperato mediante filtrazione sotto vuoto è stato lavato a caldo diverse volte con la stessa miscela, successivamente con EtOH 90% (v/v) ed infine con etanolo assoluto. Il prodotto essiccato è stato solubilizzato in acqua distillata e dializzato contro acqua bidistillata (MWCO 1kDa). Il prodotto purificato è stato infine liofilizzato ed utilizzato come tale.

Il derivato HA_{XS}-EDA-C₁₈ è stato caratterizzato tramite ¹H-NMR e saggio colorimetrico al TNBS, per determinare rispettivamente il grado di derivatizzazione molare in ottadecilammina ed in etilendiammina. Inoltre, il peso molecolare (M_w) e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati determinati tramite analisi SEC, mentre il profilo reologico è stato valutato su una soluzione di HA_{XS}-EDA-C₁₈ all'1% (p/v) in acqua distillata.

5.6.2 Sintesi e caratterizzazione del derivato HA_{XS}-EDA-C₁₈-RGDC

5.6.2.1 Sintesi dell'estere N-idrossisuccinimidico dell'acido maleimidobutirrico (MLB-NHS)

Un'opportuna quantità di acido maleimidobutirrico (MLB) è stata solubilizzata sotto agitazione in 4 ml di CH₂Cl₂; è stata quindi aggiunta un'opportuna quantità di N-idrossisuccinimide (NHS) secondo un rapporto molare tra le moli di NHS e le moli di MLB pari a 1.1. La funzione carbossilica dell'MLB è stata attivata aggiungendo la dicicloesilcarbodiimide (DCC), secondo un rapporto molare tra le moli di DCC e quelle di MLB pari a 1.1. La reazione è stata condotta *overnight* a temperatura ambiente, sotto costante agitazione. Al termine, la soluzione è stata filtrata mediante filtro di carta per eliminare la dicicloesilurea (DCU) precipitata, concentrata al rotavapor, quindi posta in frigo per 20 minuti. Dopo una seconda filtrazione, la soluzione ottenuta è stata essiccata al rotavapor. Al residuo secco è stata aggiunta un'aliquota di una miscela di acetato di etile/dietil etere 1:1 (v/v), ed il prodotto cristallizzato è stato recuperato per centrifugazione.

La procedura è stata ripetuta 3-4 volte sul surnatante sino a completo recupero del prodotto. Il prodotto finale siglato MLB-NHS è stato infine essiccato.

5.6.2.2 Grafting del peptide RGDC

Per la funzionalizzazione del derivato HAXS-EDA-C₁₈ con il peptide ciclico (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) (RGDC) è stata innanzitutto preparata una dispersione di HAXS-EDA-C₁₈. Il polimero è stato dapprima solubilizzato in acqua bidistillata, e successivamente è stata aggiunta un'opportuna aliquota di DPBS secondo un rapporto volumetrico H₂O/DPBS 3:5 (v/v) ottenendo una concentrazione polimerica finale pari a 0.625% (p/v). Parallelamente 1 ml di una soluzione di MLB-NHS in DPBS/DMSO 16:1 (v/v) è stata miscelata con 1 ml di una soluzione di RGDC in DPBS, secondo un rapporto molare tra moli di MLB-NHS e moli di RGDC pari a 1. La reazione tra il gruppo maleimidico e il gruppo tiolico del peptide è stata condotta per 2 ore a 37 °C ± 0.5 in orbital shaker (100 rpm). Successivamente, alla dispersione polimerica è stata aggiunta goccia a goccia la soluzione di MLB-NHS-RGDC; la reazione tra il gruppo amminico del derivato HAXS-EDA-C₁₈ e la porzione carbossilica attivata dell'MLB è stata condotta a 37 °C ± 0.5 in orbital shaker (100 rpm) *overnight*. Il prodotto così ottenuto è stato lavato in DPBS per 3 volte e dializzato usando una membrana con MWCO pari a 1kDa. Dopo liofilizzazione il derivato sintetizzato è stato caratterizzato tramite ¹H-NMR in D₂O. Lo spettro ha mostrato i seguenti picchi caratteristici: δ 0.86 (s, -CH₃ del C₁₈), δ 1.29 (m, -CH₂-CH₂- del C₁₈), δ 1.9 (s, CH₃ porzione N-acetilglucosamminica dell'HA), δ 7.2 (m, -CH- fenilici della tirosina del RGDC).

5.6.3 Produzione e caratterizzazione delle nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈ e HAXS-EDA-C₁₈-RGDC vuote e cariche di imatinib

Per la produzione delle nanoparticelle polimeriche è stato utilizzato un *micromixer chip* con una sezione trasversale interna al canale (125µm x 350µm and 50µm x 125µm) (Dolomite, UK).

Il derivato HAXS-EDA-C₁₈ o HAXS-EDA-C₁₈-RGDC è stato solubilizzato in acqua bidistillata all'1% (p/v); questa soluzione è stata filtrata con filtri da 1 µm e posta in un FalconTM da 15 ml connesso al chip attraverso tubi in PTFE, ed al controller OB1 che lavora con una pressione massima di 8 Bar. La soluzione polimerica è stata connessa al canale interno, mentre il FalconTM contenente il DPBS (0.15 M) o la soluzione NaCl 9%

(p/v) (1.5 M) è stato connesso ai canali esterni. Il flusso interno è stato impostato a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, mentre il flusso esterno utilizzato è variabile e rientra nel range di 2000-200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Sono stati impiegati quattro differenti rapporti di flusso pari a 0.05, 0.1, 0.25 e 0.5, espressi come il rapporto tra il flusso interno della soluzione polimerica e quello esterno del DPBS. Il tubo d'uscita è stato immerso in DPBS o in una soluzione di DPBS con trealosio, scelto come crioprotettore, oppure posto in un FalconTM di raccolta vuoto. Le nanoparticelle raccolte e quelle risospese in DPBS dopo *freeze-drying* sono state caratterizzate tramite DLS e Microscopio a Trasmissione Elettronica (TEM).

La nanoparticelle di HAXs-EDA-C₁₈ sono state preparate *in bulk* tramite precipitazione diretta di una soluzione polimerica acquosa all'1% (p/v) in un opportuno volume di DPBS, sotto vigorosa agitazione, come confronto.

Per quanto riguarda le nanoparticelle HAXs-EDA-C₁₈ e HAXs-EDA-C₁₈-RGDC cariche di imatinib (I), queste sono state preparate mediante microfluidica utilizzando esclusivamente un rapporto di flusso 0.1. Inizialmente è stata preparata una soluzione di farmaco in THF alla concentrazione di 1.25% (p/v); questa è stata aggiunta goccia a goccia sotto agitazione ad una soluzione polimerica in acqua per ottenere una concentrazione finale di farmaco pari a 0.25% (p/v) e di polimero pari all'1% (p/v) (rapporto in peso tra polimero e farmaco pari a 1:4). Tale soluzione è stata posta nel reservoir connesso al canale interno del *micromixer chip*, utilizzando come fase esterna il DPBS oppure una soluzione di NaCl 9% (p/v).

Le nanoparticelle preparate sono state raccolte direttamente in un FalconTM vuoto. I campioni sono stati posti in ultracentrifuga a 20000 rpm ed alla temperatura di 10 °C per 10 minuti. Il surnatante è stato rimosso, il pellet è stato congelato e liofilizzato.

Le nanoparticelle sono state disperse opportunamente in DPBS e caratterizzate tramite DLS. È stata valutata la DL% tramite analisi HPLC; i campioni liofilizzati sono stati dispersi in MeOH, e l'estrazione del farmaco è stata condotta *overnight* sotto vigorosa agitazione. I campioni sono stati quindi filtrati su un filtro da 0.45 μm ed iniettati all'HPLC. I valori di DL% calcolati sono stati espressi come il rapporto in peso percentuale tra i mg di farmaco nelle nanoparticelle ed il peso totale delle nanoparticelle cariche.

5.6.4 Studio di rilascio *in vitro* dell'imatinib dalle nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈

Lo studio di rilascio dell'imatinib dalle nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈ preparate in DPBS e NaCl 9% è stato condotto *in vitro* mediante la tecnica della dialisi. Le nanoparticelle sono disperse in DPBS in modo tale da avere una concentrazione di farmaco pari a 0.50 mg/ml; la dispersione è stata caricata all'interno di una membrana da dialisi (MWCO di 1 kDa) e posta contro DPBS, secondo un rapporto 1:10 tra il volume interno ed esterno alla dialisi. Lo studio è stato condotto per 48 ore, ponendo i campioni in orbital shaker (100 rpm) ad una temperatura di 37 °C ± 0.5. Ad intervalli di tempo stabiliti è stato prelevato 1 ml di mezzo esterno e ricostituito ogni volta con uno stesso volume di mezzo fresco. Come confronto sono state utilizzate una soluzione (0.25 mg/ml) e una sospensione (0.50 mg/ml) di farmaco in DPBS; nel caso della soluzione, è stata preparata una soluzione concentrata (2.5 mg/ml) in MeOH che è stata opportunamente diluita in DPBS alla concentrazione desiderata. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato ed i campioni prelevati sono stati analizzati mediante spettrofotometro UV-Vis alla lunghezza d'onda di 257 nm. I risultati sono stati espressi come percentuale di farmaco nel compartimento ricevente rispetto alla quantità di farmaco contenuta nel compartimento donatore, considerando la diluizione ad ogni prelievo.

5.6.5 Studio di citocompatibilità *in vitro*

Per valutare la citocompatibilità delle nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈ e HAXS-EDA-C₁₈-RGDC vuote e cariche di imatinib, è stato condotto un saggio di vitalità sulle HUVEC secondo una procedura riportata nel paragrafo 5.5.7.

I campioni sono stati dispersi in DPBS (10 mg/ml) e diluiti in mezzo cellulare alla concentrazione polimerica finale di 1 mg/ml o una concentrazione di farmaco pari a 40 µg/ml. Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 150 µl di dispersione micellare; dopo 6 e 24 ore di incubazione è stata valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTS. Per tutti gli esperimenti, i valori di assorbanza ($\lambda=490$ nm) ottenuti sono stati rielaborati ed espressi come Vitalità cellulare %, calcolando il rapporto tra la densità ottica del campione e quella del controllo positivo di HUVEC in TCPS (*Tissue Culture Polystyrene*) non trattate.

5.6.6 Saggio di *sprouting* vascolare

La *sprouting* vascolare è stato studiato preparando un modello *in vitro* di HUVEC sul matrigel (*ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma*) (paragrafo 5.5.9).

Il primo studio ha previsto il caricamento simultaneo delle HUVEC e delle nanoparticelle HAXS-EDA-C₁₈/I e HAXS-EDA-C₁₈-RGDC/I sul matrigel, per studiare la capacità del farmaco di inibire lo *sprouting* delle cellule. I campioni sono stati dispersi in DPBS (10 mg/ml), filtrati su 0.45 µm, e diluiti opportunamente per ottenere una concentrazione di farmaco pari a 40 µg/ml. In questo caso, la valutazione dell'inibizione dello *sprouting* è stata condotta per 24 ore.

Nel secondo studio, è stata effettuata un'analisi qualitativa della variazione strutturale del *network* cellulare preformato sul matrigel. In particolare, dopo completa formazione del *network* capillare delle HUVEC, ad ogni pozzetto è aggiunta un'opportuna aliquota (150 µl) di dispersione nanoparticellare considerando una concentrazione di farmaco pari a 40 µg/ml. L'analisi è stata condotta per 24 ore.

Le immagini sono state acquisite con un ingrandimento 10X, utilizzando un microscopio ottico CareZeis Axio Vert. Inoltre, il saggio *Live&Dead* è stato condotto seguendo la procedura riportata dalla casa produttrice.

5.7 Analisi Statistica

Tutti i risultati sono stati riportati come valori medi ± deviazione standard (S.D.) e quando possibile è stata effettuata l'analisi statistica utilizzando il test di comparazione multipla di Bonferroni (Grappa software). I valori con $p < 0.05$ sono considerati statisticamente significativi (*), mentre i valori con $p < 0.01$ (**) e $p < 0.001$ (***) sono considerati molto significativi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B.D. Kels, A. Grzybowski, J.M. Grant-Kels, Human ocular anatomy, *Clin. Dermatol.* 33 (2015) 140–146. doi:10.1016/j.clindermatol.2014.10.006.
- [2] J.L. Greaves, C.G. Wilson, Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11 (1993) 349–383. doi:10.1016/0169-409X(93)90016-W.
- [3] H.H. Sigurdsson, J. Kirch, C.M. Lehr, Mucus as a barrier to lipophilic drugs, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 56–64. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.040.
- [4] M.E. V Johansson, D. Ambort, T. Pelaseyed, A. Schutte, J.K. Gustafsson, A. Ermund, D.B. Subramani, J.M. Holmén-Larsson, K.A. Thomsson, J.H. Bergstrom, S. Van Der Post, A.M. Rodriguez-Pineiro, H. Sjovall, M. Backstrom, G.C. Hansson, Composition and functional role of the mucus layers in the intestine, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 3635–3641. doi:10.1007/s00018-011-0822-3.
- [5] K. Khanvilkar, M.D. Donovan, D.R. Flanagan, Drug transfer through mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 173–193. doi:10.1016/S0169-409X(01)00115-6.
- [6] S.K. Sahoo, F. Dilnawaz, S. Krishnakumar, Nanotechnology in ocular drug delivery, *Drug Discov. Today.* 13 (2008) 144–151. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.021.
- [7] J.M. Tiffany, Tears in health and disease., *Eye (Lond).* 17 (2003) 923–926. doi:10.1038/sj.eye.6700566.
- [8] W.D. Mathers, J.A. Lane, J.E. Sutphin, M.B. Zimmerman, Model for ocular tear film function., *Cornea.* 15 (1996) 110–119. doi:10.1097/00003226-199603000-00002.
- [9] P.E. King-Smith, B.A. Fink, N. Fogt, K.K. Nichols, R.M. Hill, G.S. Wilson, The thickness of the human precorneal tear film: Evidence from reflection spectra, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000) 3348–3359.
- [10] J.C. Pandit, B. Nagyová, a J. Bron, J.M. Tiffany, Physical properties of stimulated and unstimulated tears., *Exp. Eye Res.* 68 (1999) 247–53. doi:10.1006/exer.1998.0600.
- [11] P. Bishop, The biochemical structure of mammalian vitreous., *Eye.* 10 (1996) 664–670. doi:10.1038/eye.1996.159.
- [12] P.N. Bishop, Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel, *Prog. Retin. Eye Res.* 19 (2000) 323–344. doi:10.1016/S1350-9462(99)00016-6.
- [13] B. Lee, M. Litt, G. Buchsbaum, Rheology of the vitreous body: part 3. Concentration of electrolytes, collagen and hyaluronic acid, *Biorheology.* 31 (1994) 339–351.
- [14] J. Grimshaw, A. Kane, J. Trochagrimshaw, A. Douglas, U. Chakravarthy, D. Archer, Quantitative-Analysis of Hyaluronan in Vitreous-Humor Using Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis.* 15 (1994) 936–940.
- [15] M.S. Chen, P.K. Hou, T.Y. Tai, B.J. Lin, Blood-ocular barriers, *Tzu Chi Med. J.* 20 (2008) 25–34. doi:10.1016/S1016-3190(08)60004-X.
- [16] J. Lee, R.M. Pelis, Drug transport by the blood-aqueous humor barrier of the eye, *Drug Metab. Dispos.* 44 (2016) 1675–1681. doi:10.1124/dmd.116.069369.
- [17] M.L. Occhiutto, F.R. Freitas, R.C. Maranhao, V.P. Costa, Breakdown of the blood-ocular barrier as a strategy for the systemic use of nanosystems, *Pharmaceutics.* 4 (2012) 252–275. doi:10.3390/pharmaceutics4020252.

- [18] K. Fujimoto, Pericyte-endothelial gap junctions in developing rat cerebral capillaries: A fine structural study, *Anat. Rec.* 242 (1995) 562–565. doi:10.1002/ar.1092420412.
- [19] X.L. Yang, Müller cells and retinal function, *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.* 29 (1998) 7–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12501696> (accessed October 1, 2017).
- [20] A. Mandal, R. Bisht, I.D. Rupenthal, A.K. Mitra, Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies, *J. Control. Release.* 248 (2017) 96–116. doi:10.1016/j.jconrel.2017.01.012.
- [21] P.A. Campochiaro, L.P. Aiello, P.J. Rosenfeld, Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents in the Treatment of Retinal Disease: From Bench to Bedside, *Ophthalmology.* 123 (2016) S78–S88. doi:10.1016/j.ophtha.2016.04.056.
- [22] A. Hellström, L.E.H. Smith, O. Dammann, Retinopathy of prematurity, in: *Lancet*, Elsevier, 2013: pp. 1445–1457. doi:10.1016/S0140-6736(13)60178-6.
- [23] I. Bhutto, G. Luty, Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch’s membrane/choriocapillaris complex, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 295–317. doi:10.1016/j.mam.2012.04.005.
- [24] G. Gao, Y. Li, D. Zhang, S. Gee, C. Crosson, J. xing Ma, Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization, *FEBS Lett.* 489 (2001) 270–276. doi:10.1016/S0014-5793(01)02110-X.
- [25] J. Tombran-Tink, C.J. Barnstable, PEDF: a multifaceted neurotrophic factor, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 628–636. doi:10.1038/nrn1176.
- [26] J. Bartlett, S. Jaanus, *Clinical Ocular Pharmacology*, 2008. doi:10.1016/B978-0-7506-7576-5.X5001-0.
- [27] R. Hennig, A. Goepferich, Nanoparticles for the treatment of ocular neovascularizations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95 (2015) 294–306. doi:10.1016/j.ejpb.2015.02.027.
- [28] A. Noël, M. Jost, V. Lambert, J. Lecomte, J.M. Rakic, Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts, *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 345–352. doi:10.1016/j.molmed.2007.06.005.
- [29] D.S. Friedman, B.J. O’Colmain, B. Muñoz, S.C. Tomany, C. McCarty, P.T.V.M. de Jong, B. Nemesure, P. Mitchell, J. Kempen, Prevalence of age-related macular degeneration in the United States, *Arch. Ophthalmol.* 122 (2004) 564–572. doi:10.1001/archophth.122.4.564.
- [30] K. Michalska-Malecka, A. Kabiesz, M. Nowak, D. Piewak, Age related macular degeneration - Challenge for future: Pathogenesis and new perspectives for the treatment, *Eur. Geriatr. Med.* 6 (2015) 69–75. doi:10.1016/j.eurger.2014.09.007.
- [31] Q. Mohamed, M.C. Gillies, T.Y. Wong, Management of Diabetic Retinopathy, *JAMA.* 298 (2007) 902. doi:10.1001/jama.298.8.902.
- [32] T.K. Ali, A.B. El-Remessy, Diabetic Retinopathy: Current Management and Experimental Therapeutic Targets, *Pharmacotherapy.* 29 (2009) 182–192. doi:10.1592/phco.29.2.182.
- [33] C.P. Wilkinson, F.L. Ferris, R.E. Klein, P.P. Lee, C.D. Agardh, M. Davis, D. Dills, A. Kampik, R. Pararajasegaram, J.T. Verdager, F. Lum, Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales, *Ophthalmology.* 110 (2003) 1677–1682. doi:10.1016/S0161-6420(03)00475-5.
- [34] S. Scholl, J. Kirchhof, A.J. Augustin, Pathophysiology of Macular Edema, *Ophthalmologica.* 224 (2010) 8–15. doi:10.1159/000315155.
- [35] A.M. Jousseaume, N. Smyth, C. Niessen, Pathophysiology of diabetic macular edema., *Dev.*

- Ophthalmol. 39 (2007) 1–12. doi:10.1159/000098495.
- [36] E.L. Berson, B. Rosner, M.A. Sandberg, K.C. Hayes, B.W. Nicholson, C. Weigel-DiFranco, W. Willett, Vitamin A Supplementation for Retinitis Pigmentosa, *Arch. Ophthalmol.* 111 (1993) 1456. doi:10.1001/archophth.1993.01090110014001.
- [37] E.L. Berson, B. Rosner, M.A. Sandberg, C. Weigel-Difranco, R.J. Brockhurst, K.C. Hayes, E.J. Johnson, E.J. Anderson, C.A. Johnson, A.R. Gaudio, W.C. Willett, E.J. Schaefer, Clinical Trial of Lutein in Patients with Retinitis Pigmentosa Receiving Vitamin A, *Arch Ophthalmol.* 128 (2010) 403–411. doi:10.1001/archophthalmol.2010.32.
- [38] E.M. Vingolo, M. Rocco, P.L. Grenga, S. Salvatore, P. Pelaia, Slowing the degenerative process, long lasting effect of hyperbaric oxygen therapy in retinitis pigmentosa, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 246 (2008) 93–98. doi:10.1007/s00417-007-0652-z.
- [39] E.S. Gragoudas, A.P. Adamis, E.T. Cunningham, M. Feinsod, D.R. Guyer, Pegaptanib for Neovascular Age-Related Macular Degeneration, *N Engl J Med.* 351 (2004) 2805–2816. doi:10.1056/NEJMoa042760.
- [40] S. a Doggrell, Pegaptanib: the first antiangiogenic agent approved for neovascular macular degeneration., *Expert Opin. Pharmacother.* 6 (2005) 1421–3. doi:10.1517/14656566.6.8.1421.
- [41] T.S. Chang, N.M. Bressler, J.T. Fine, C.M. Dolan, Improved vision-related function after ranibizumab treatment of neovascular age-related macular degeneration: results of a randomized clinical trial, *Arch. Ophthalmol.* 125 (2007) 1460–1469. doi:10.1001/archophth.125.11.1460.
- [42] J.B. Gunther, M.M. Altaweel, Bevacizumab (Avastin) for the Treatment of Ocular Disease, *Surv. Ophthalmol.* 54 (2009) 372–400. doi:10.1016/j.survophthal.2009.02.004.
- [43] A.N. Economides, L.R. Carpenter, J.S. Rudge, V. Wong, E.M. Koehler-Stec, C. Hartnett, E.A. Pyles, X. Xu, T.J. Daly, M.R. Young, J.P. Fandl, F. Lee, S. Carver, J. McNay, K. Bailey, S. Ramakanth, R. Hutabarat, T.T. Huang, C. Radziejewski, G.D. Yancopoulos, N. Stahl, Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action, *Nat. Med.* 9 (2002) 47–52. doi:10.1038/nm811.
- [44] Eylea (aflibercept) FDA Approval History - Drugs.com, (n.d.). <https://www.drugs.com/history/eylea.html> (accessed October 7, 2017).
- [45] S. Kaštelan, M. Tomić, V. Mrazovac, Pharmacotherapy for diabetic retinopathy - It is not just a dream, *Diabetol. Croat.* 37 (2008) 57–66.
- [46] R.F. Spaide, Y.L. Fisher, Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage., *Retina.* 26 (2006) 275–8. doi:10.1097/00006982-200603000-00004.
- [47] T. Yoshimura, K.H. Sonoda, M. Sugahara, Y. Mochizuki, H. Enaida, Y. Oshima, A. Ueno, Y. Hata, H. Yoshida, T. Ishibashi, Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases, *PLoS One.* 4 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0008158.
- [48] S. Matsuda, F. Gomi, Y. Oshima, M. Tohyama, Y. Tano, Vascular endothelial growth factor reduced and connective tissue growth factor induced by triamcinolone in ARPE19 cells under oxidative stress., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (2005) 1062–8. doi:10.1167/iovs.04-0761.
- [49] T. Ciulla, J. Walker, D. Fong, M. Criswell, Corticosteroids in posterior segment disease: an update on new delivery systems and new indications., *Curr Opin Ophthalmol.* 15 (2004) 211–220. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=ovftg&NEWS=N&AN=0>

0055735-200406000-00010.

- [50] O. Access, Subtenon vs intravitreal triamcinolone injection in diabetic macular edema : A prospective study in chinese population, *Pakistan J. Med. Sci.* 30 (2014) 749–754. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097510> (accessed October 8, 2017).
- [51] B.D. Kuppermann, Sustained-release dexamethasone intravitreal implant for treatment of diabetic macular edema, *Expert Rev. Ophthalmol.* 6 (2011) 11–20. doi:10.1586/eop.10.82.
- [52] J.A. Haller, F. Bandello, R. Belfort, M.S. Blumenkranz, M. Gillies, J. Heier, A. Loewenstein, Y.H. Yoon, J. Jiao, X.Y. Li, S.M. Whitcup, Dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema related to branch or central retinal vein occlusion: Twelve-month study results, *Ophthalmology.* 118 (2011) 2453–2460. doi:10.1016/j.ophtha.2011.05.014.
- [53] C. Lowder, Dexamethasone Intravitreal Implant for Noninfectious Intermediate or Posterior Uveitis, *Arch. Ophthalmol.* 129 (2011) 545. doi:10.1001/archophthalmol.2010.339.
- [54] I. Zucchiatti, R. Lattanzio, G. Querques, L. Querques, C. Del Turco, M.L. Cascavilla, F. Bandello, Intravitreal dexamethasone implant in patients with persistent diabetic macular edema, *Ophthalmologica.* 228 (2012) 117–122. doi:10.1159/000336225.
- [55] R. Machemer, G. Sugita, Y. Tano, Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids, *Trans Am Ophthalmol Soc.* 77 (1979) 171–180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/545825>.
- [56] T. Hida, D. Chandler, J.E. Arena, R. Machemer, Experimental and clinical observations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations, *Am J Ophthalmol.* 101 (1986) 190–195. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3753824>.
- [57] B.W. McCuen, M. Bessler, Y. Tano, D. Chandler, R. Machemer, The lack of toxicity of intravitreally administered triamcinolone acetonide, *Am. J. Ophthalmol.* 91 (1981) 785–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7246702?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- [58] A. Martidis, J.S. Duker, P.B. Greenberg, A.H. Rogers, C.A. Puliafito, E. Reichel, C. Baumal, Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema, *Ophthalmology.* 109 (2002) 920–927. doi:10.1016/S0161-6420(02)00975-2.
- [59] N.M. Bressler, A.R. Edwards, R.W. Beck, C.J. Flaxel, A.R. Glassman, M.S. Ip, C. Kollman, B.D. Kuppermann, T.W. Stone, Exploratory analysis of diabetic retinopathy progression through 3 years in a randomized clinical trial that compares intravitreal triamcinolone acetonide with focal/grid photocoagulation., *Arch. Ophthalmol.* 127 (2009) 1566–1571. doi:10.1001/archophthalmol.2009.308.
- [60] Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCR.net), Three-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Focal/Grid Photocoagulation and Intravitreal Triamcinolone for Diabetic Macular Edema, *Arch. Ophthalmol.* 127 (2009) 245–251. doi:10.1001/archophthalmol.2008.610.
- [61] S.R.J. Taylor, H. Isa, L. Joshi, S. Lightman, New developments in corticosteroid therapy for uveitis, *Ophthalmologica.* 224 (2010) 46–53. doi:10.1159/000318021.
- [62] P.A. Pearson, T.L. Comstock, M. Ip, D. Callanan, L.S. Morse, P. Ashton, B. Levy, E.S. Mann, D. Elliott, Fluocinolone acetonide intravitreal implant for diabetic macular edema: A 3-year multicenter, randomized, controlled clinical trial, *Ophthalmology.* 118 (2011) 1580–1587. doi:10.1016/j.ophtha.2011.02.048.
- [63] W.B. Messenger, R.M. Beardsley, C.J. Flaxel, Fluocinolone acetonide intravitreal implant for the treatment of diabetic macular edema, *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 425–434.

doi:10.2147/DDDT.S44427.

- [64] M. Sanford, Fluocinolone acetonide intravitreal implant (Iluvien®): In diabetic macular oedema, *Drugs*. 73 (2013) 187–193. doi:10.1007/s40265-013-0010-x.
- [65] S. Sengupta, A. Kulkarni, Design principles for clinical efficacy of cancer nanomedicine: A look into the basics, *ACS Nano*. 7 (2013) 2878–2882. doi:10.1021/nn4015399.
- [66] H.F. Edelhauser, C.L. Rowe-Rendleman, M.R. Robinson, D.G. Dawson, G.J. Chader, H.E. Grossniklaus, K.D. Rittenhouse, C.G. Wilson, D.A. Weber, B.D. Kuppermann, K.G. Csaky, T.W. Olsen, U.B. Kompella, V.M. Holers, G.S. Hageman, B.C. Gilger, P.A. Campochiaro, S.M. Whitcup, W.T. Wong, Ophthalmic Drug Delivery Systems for the Treatment of Retinal Diseases: Basic Research to Clinical Applications, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 51 (2010) 5403–5420. doi:10.1167/iovs.10-5392.
- [67] W.H. De Jong, P.J.A. Borm, Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *Int. J. Nanomedicine*. 3 (2008) 133–149. doi:10.2147/IJN.S596.
- [68] K.M. Sampat, S.J. Garg, Complications of intravitreal injections., *Curr. Opin. Ophthalmol*. 21 (2010) 178–83. doi:10.1097/ICU.0b013e328338679a.
- [69] A. Zimmer, J. Kreuter, Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16 (1995) 61–73. doi:DOI: 10.1016/0169-409X(95)00017-2.
- [70] U.B. Kompella, N. Bandi, S.P. Ayalasonmayajula, Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 44 (2003) 1192–1201. doi:10.1167/iovs.02-0791.
- [71] J.P. Bertram, S.S. Saluja, J. Mckain, E.B. Lavik, Erratum: Sustained delivery of timolol maleate from poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactic acid) microspheres for over 3 months (*Journal of Microencapsulation* (2009) vol. 26 (1) (18-26)), *J. Microencapsul.* 26 (2009) 26. doi:10.1080/02652040802095250.
- [72] S.P. Ayalasonmayajula, U.B. Kompella, Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model, *Eur. J. Pharmacol.* 511 (2005) 191–198. doi:10.1016/j.ejphar.2005.02.019.
- [73] T. Moritera, Y. Ogura, Y. Honda, R. Wada, S.H. Hyon, Y. Ikada, Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous., *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 32 (1991) 1785–1790.
- [74] G.P. Mishra, M. Bagui, V. Tamboli, A.K. Mitra, Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery, *J. Drug Deliv.* 2011 (2011) 1–14. doi:10.1155/2011/863734.
- [75] M. Abrishami, S. Zarei-Ghanavati, D. Soroush, M. Rouhbakhsh, M.R. Jaafari, B. Malaekhe-Nikouei, Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration., *Retina*. 29 (2009) 699–703. doi:10.1097/IAE.0b013e3181a2f42a.
- [76] A. Bochot, E. Fattal, Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art, *J. Control. Release*. 161 (2012) 628–634. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.019.
- [77] S. Ebrahim, G.A. Peyman, P.J. Lee, Applications of liposomes in ophthalmology, *Surv. Ophthalmol.* 50 (2005) 167–182. doi:10.1016/j.survophthal.2004.12.006.
- [78] J.E. Chan, T.A. Pridgen, K.G. Csaky, Episcleral clearance of sodium fluorescein from a bioerodible sub-tenon's implant in the rat, *Exp. Eye Res.* 90 (2010) 501–506. doi:10.1016/j.exer.2010.01.001.
- [79] K. Okabe, H. Kimura, J. Okabe, A. Kato, N. Kunou, Y. Ogura, Intraocular tissue

- distribution of betamethasone after intrascleral administration using a non-biodegradable sustained drug delivery device, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003) 2702–2707. doi:10.1167/iovs.02-0956.
- [80] B.I. Gaynes, A. Onyekwuluje, Topical ophthalmic NSAIDs: a discussion with focus on nepafenac ophthalmic suspension, *Clin. Ophthalmol.* 2 (2008) 355–368. doi:10.2147/OPHTH.S1067.
- [81] G.B. Jaissle, P. Szurman, K.U. Bartz-Schmidt, Nebenwirkungen und komplikationen der intravitrealen triamcinolonacetamid-therapie, *Ophthalmologe.* 101 (2004) 121–128. doi:10.1007/s00347-003-0975-z.
- [82] Y. Mao, S. Kiss, J.L. Boyer, N.R. Hackett, J. Qiu, A. Carbone, J.G. Mezey, S.M. Kaminsky, D.J. D’Amico, R.G. Crystal, Persistent Suppression of Ocular Neovascularization with Intravitreal Administration of AAVrh.10 Coding for Bevacizumab, *Hum. Gene Ther.* 22 (2011) 1525–1535. doi:10.1089/hum.2011.090.
- [83] T.G. Rotsos, M.M. Moschos, Cystoid macular edema., *Clin. Ophthalmol.* 2 (2008) 919–30. doi:10.2147/opth.s4033.
- [84] M. Ahuja, A.S. Dhake, S.K. Sharma, D.K. Majumdar, Topical Ocular Delivery of NSAIDs, *AAPS J.* 10 (2008) 229–241. doi:10.1208/s12248-008-9024-9.
- [85] G. Tiwari, R. Tiwari, A.K. Rai, Cyclodextrins in delivery systems: Applications, *J Pharm Bioallied Sci.* 2 (2010) 72. doi:10.4103/0975-7406.67003.
- [86] M. Talelli, M. Barz, C.J.F. Rijcken, F. Kiessling, W.E. Hennink, T. Lammers, Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation, *Nano Today.* 10 (2015) 93–117. doi:10.1016/j.nantod.2015.01.005.
- [87] A.T. Ogunjimi, S.M.G. Melo, C.G. Vargas-Rechia, F.S. Emery, R.F.V. Lopez, Hydrophilic polymeric nanoparticles prepared from Delonix galactomannan with low cytotoxicity for ocular drug delivery, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 1065–1075. doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.076.
- [88] A. Patel, K. Cholkar, V. Agrahari, A.K. Mitra, Ocular drug delivery systems: An overview., *World J. Pharmacol.* 2 (2015) 47–64. doi:10.5497/wjp.v2.i2.47.
- [89] W. Zhang, M.R. Prausnitz, A. Edwards, Model of transient drug diffusion across cornea, *J. Control. Release.* 99 (2004) 241–258. doi:10.1016/j.jconrel.2004.07.001.
- [90] S. Reichl, C. K€ Olln, M. Hahne, J. Verstraelen, In vitro cell culture models to study the corneal drug absorption, (2011) 559–578. doi:10.1517/17425255.2011.562195.
- [91] A. Urtili, Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1131–1135. doi:10.1016/j.addr.2006.07.027.
- [92] J. Liaw, J.R. Robinson, The effect of polyethylene glycol molecular weight on corneal transport and the related influence of penetration enhancers, *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 125–140. doi:10.1016/0378-5173(92)90309-P.
- [93] J. Barar, M. Asadi, S.A. Mortazavi-Tabatabaei, Y. Omidi, Ocular Drug Delivery; Impact of in vitro Cell Culture Models., *J. Ophthalmic Vis. Res.* 4 (2009) 238–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23198080%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3498862>.
- [94] K.M. Hämäläinen, K. Kananen, S. Auriola, K. Kontturi, A. Urtili, Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (1997) 627–634.
- [95] Y.C. Kim, B. Chiang, X. Wu, M.R. Prausnitz, Ocular delivery of macromolecules, *J.*

- Control. Release. 190 (2014) 172–181. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.043.
- [96] A.S. Guinedi, N.D. Mortada, S. Mansour, R.M. Hathout, Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide, *Int. J. Pharm.* 306 (2005) 71–82. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.09.023.
- [97] R. Gaudana, H.K. Ananthula, A. Parenky, A.K. Mitra, Ocular Drug Delivery, *AAPS J.* 12 (2010) 348–360. doi:10.1208/s12248-010-9183-3.
- [98] J.J. Chen, S.E. Ebmeier, W.M. Sutherland, N.G. Ghazi, Potential penetration of topical ranibizumab (Lucentis) in the rabbit eye, *Eye.* 25 (2011) 1504–1511. doi:10.1038/eye.2011.225.
- [99] A. Medrano-E’Vers, A.E. Morales-Hernández, R. Valencia-López, D.R. Hernández-Salcedo, Enfermedad granulomatosa crónica, *Med. Interna Mex.* 33 (2017) 407–414. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [100] A.K. Agrawal, M. Das, S. Jain, In situ gel systems as “smart” carriers for sustained ocular drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 383–402. doi:10.1517/17425247.2012.665367.
- [101] H. Almeida, M.H. Amaral, P. Lobão, J.M.S. Lobo, In situ gelling systems: A strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations, *Drug Discov. Today.* 19 (2014) 400–412. doi:10.1016/j.drudis.2013.10.001.
- [102] D.S. Kshirsagar, R.B. Saudagar, Microsphere: A Review, *Res. J. Top. Cosmet. Sci.* 7 (2016) 27. doi:10.5958/2321-5844.2016.00006.6.
- [103] U.G. Kapanigowda, S.H. Nagaraja, B. Ramaiah, P.R. Boggarapu, R. Subramanian, Enhanced Trans-Corneal Permeability of Valacyclovir by Polymethacrylic Acid Copolymers Based Ocular Microspheres: In Vivo Evaluation of Estimated Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Indices and Simulation of Aqueous Humor Drug Concentration-Time Profile, *J. Pharm. Innov.* 11 (2016) 82–91. doi:10.1007/s12247-015-9239-0.
- [104] R. Herrero-Vanrell, Microparticles as Drug Delivery Systems for the Back of the Eye, in: *Drug Prod. Dev. Back Eye*, Springer, Boston, MA, 2011: pp. 231–259. doi:10.1007/978-1-4419-9920-7_10.
- [105] U.B. Kompella, A.C. Amrite, R. Pacha Ravi, S.A. Durazo, Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging, *Prog. Retin. Eye Res.* 36 (2013) 172–198. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.04.001.
- [106] J. F. Figueiro, F. Veiga, A. M. Silva, E. B. Souto, J.F. Figueiro, F. Veiga, A.M. Silva, E.B. Souto, Ocular Drug Delivery - New Strategies for Targeting Anterior and Posterior Segments of the Eye, *Curr. Pharm. Des.* (2016). <http://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/cpd/2016/00000022/00000009/art00004> (accessed October 28, 2017).
- [107] V.P. Ranta, E. Mannermaa, K. Lummeppuro, A. Subrizi, A. Laukkanen, M. Antopolsky, L. Murtomäki, M. Hornof, A. Urtti, Barrier analysis of periocular drug delivery to the posterior segment, *J. Control. Release.* 148 (2010) 42–48. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.028.
- [108] F. Mac Gabhann, A.M. Demetriades, T. Deering, J.D. Packer, S.M. Shah, E. Duh, P.A. Campochiaro, A.S. Popel, Protein transport to choroid and retina following periocular injection: Theoretical and experimental study, *Ann. Biomed. Eng.* 35 (2007) 615–630. doi:10.1007/s10439-006-9238-x.
- [109] J. Mains, C.G. Wilson, The Vitreous Humor As a Barrier to Nanoparticle Distribution, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* (2013). doi:10.1089/jop.2012.0138.

- [110] R.D. Jager, L.P. Aiello, S.C. Patel, E.T. Cunningham, Risks of Intravitreal Injection: a Comprehensive Review, *Retina*. 24 (2004) 676–698. doi:10.1097/00006982-200410000-00002.
- [111] M.S. Benz, T.A. Albin, E.R. Holz, R.R. Laxmanpal, A.C. Westfall, M.N. Iyer, P.E. Carvounis, Short-term Course of Intraocular Pressure after Intravitreal Injection of Triamcinolone Acetonide, *Ophthalmology*. 113 (2006) 1174–1178. doi:10.1016/j.ophtha.2005.10.061.
- [112] S. Raghava, M. Hammond, U.B. Kompella, Periocular routes for retinal drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* (2004). doi:10.1517/17425247.1.1.99.
- [113] S.H. Kim, C.J. Galbán, R.J. Lutz, R.L. Dedrick, K.G. Csaky, M.J. Lizak, N.S. Wang, G. Tansey, M.R. Robinson, Assessment of subconjunctival and intrascleral drug delivery to the posterior segment using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (2007) 808–814. doi:10.1167/iovs.06-0670.
- [114] R.S. Kadam, P. Tyagi, H.F. Edelhauser, U.B. Kompella, Influence of choroidal neovascularization and biodegradable polymeric particle size on transscleral sustained delivery of triamcinolone acetonide, *Int. J. Pharm.* 434 (2012) 140–147. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.05.025.
- [115] F. Jian, Y. Zhang, J. Wang, K. Ba, R. Mao, W. Lai, Y. Lin, Toxicity of Biodegradable Nanoscale Preparations, *Curr. Drug Metab.* 13 (2012) 440–446. doi:10.2174/138920012800166517.
- [116] K. Cholkar, A. Patel, A.D. Vadlapudi, A.K. Mitra, Novel Nanomicellar Formulation Approaches for Anterior and Posterior Segment Ocular Drug Delivery, *Recent Patents Nanomed.* 2 (2012) 82–95. doi:10.2174/1877912311202020082.
- [117] S. Liu, L. Jones, F.X. Gu, Nanomaterials for Ocular Drug Delivery, *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 608–620. doi:10.1002/mabi.201100419.
- [118] A. Gothwal, I. Khan, U. Gupta, Polymeric Micelles: Recent Advancements in the Delivery of Anticancer Drugs, *Pharm. Res.* 33 (2016) 18–39. doi:10.1007/s11095-015-1784-1.
- [119] L. Dian, E. Yu, X. Chen, X. Wen, Z. Zhang, L. Qin, Q. Wang, G. Li, C. Wu, Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 684. doi:10.1186/1556-276X-9-684.
- [120] L. Luo, J. Tam, D. Maysinger, A. Eisenberg, Cellular internalization of poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymer micelles, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 1259–1265. doi:10.1021/bc025524y.
- [121] R. Savic, Micellar Nanocontainers Distribute to Defined Cytoplasmic Organelles, *Science* (80-.). 300 (2003) 615–618. doi:10.1126/science.1078192.
- [122] J. Li, Z. Li, T. Zhou, J. Zhang, H. Xia, H. Li, J. He, S. He, L. Wang, Positively charged micelles based on a triblock copolymer demonstrate enhanced corneal penetration, *Int. J. Nanomedicine*. 10 (2015) 6027–6037. doi:10.2147/IJN.S90347.
- [123] Y. Lu, K. Park, Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 198–214. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.04.
- [124] T.F. Tadros, *Applied Surfactants: Principles and Applications*, 2005. doi:10.1002/3527604812.
- [125] H.M. Aliabadi, A. Lavasanifar, Polymeric micelles for drug delivery., *Expert Opin. Drug Deliv.* 3 (2006) 139–162. doi:10.1517/17425247.3.1.139.
- [126] S.C. Owen, D.P.Y. Chan, M.S. Shoichet, Polymeric micelle stability, *Nano Today*. 7 (2012)

53–65. doi:10.1016/j.nantod.2012.01.002.

- [127] V.P. Torchilin, Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1–16. doi:10.1007/s11095-006-9132-0.
- [128] G.S. Kwon, T. Okano, Polymeric micelles as new drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21 (1996) 107–116. doi:10.1016/S0169-409X(96)00401-2.
- [129] U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam, Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (2010) 714–729. doi:10.1016/j.nano.2010.05.005.
- [130] M.L. Adams, A. Lavasanifar, G.S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1343–1355. doi:10.1002/jps.10397.
- [131] J. Lin, J. Zhu, T. Chen, S. Lin, C. Cai, L. Zhang, Y. Zhuang, X.S. Wang, Drug releasing behavior of hybrid micelles containing polypeptide triblock copolymer, *Biomaterials.* 30 (2009) 108–117. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.010.
- [132] Y. Masayuki, G.S. Kwon, O. Teruo, S. Yasuhisa, N. Mayumi, K. Kazunori, Influencing factors on in vitro micelle stability of adriamycin-block copolymer conjugates, *J. Control. Release.* 28 (1994) 59–65. doi:10.1016/0168-3659(94)90153-8.
- [133] X. Yuan, A. Harada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Stabilization of lysozyme-incorporated polyion complex micelles by the ω -end derivatization of poly(ethylene glycol)-poly(α,β -aspartic acid) block copolymers with hydrophobic groups, *Langmuir.* 21 (2005) 2668–2674. doi:10.1021/la0488811.
- [134] C. Civiale, M. Licciardi, G. Cavallaro, G. Giammona, M.G. Mazzone, Polyhydroxyethylaspartamide-based micelles for ocular drug delivery, *Int. J. Pharm.* 378 (2009) 177–186. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.028.
- [135] A. Lavasanifar, G.S. Kwon, Micelles of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-alkyl stearate L-aspartamide): Synthetic analogues of lipoproteins for drug delivery, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 831–835. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<831::AID-JBM29>3.0.CO;2-K.
- [136] G. Dalwadi, H.A.E. Benson, Y. Chen, Comparison of diafiltration and tangential flow filtration for purification of nanoparticle suspensions, *Pharm. Res.* 22 (2005) 2152–2162. doi:10.1007/s11095-005-7781-z.
- [137] J. Djordjevic, B. Michniak, K.E. Uhrich, Amphiphilic star-like macromolecules as novel carriers for topical delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs., *AAPS PharmSci.* 5 (2003) E26. doi:10.1208/ps050426.
- [138] A. Lavasanifar, J. Samuel, G.S. Kwon, The effect of fatty acid substitution on the in vitro release of amphotericin B from micelles composed of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl stearate-L-aspartamide), *J. Control. Release.* 79 (2002) 165–172. doi:10.1016/S0168-3659(01)00537-5.
- [139] E. Başaran, Y. Yazan, Ocular application of chitosan, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 701–712. doi:10.1517/17425247.2012.681775.
- [140] S. Shi, Z. Zhang, Z. Luo, J. Yu, R. Liang, X. Li, H. Chen, Chitosan grafted methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanosuspension for ocular delivery of hydrophobic diclofenac, *Sci. Rep.* 5 (2015). doi:10.1038/srep11337.
- [141] R.D. Vaishya, M. Gokulgandhi, S. Patel, M. Minocha, A.K. Mitra, Novel Dexamethasone-Loaded Nanomicelles for the Intermediate and Posterior Segment Uveitis, *AAPS PharmSciTech.* 15 (2014) 1238–1251. doi:10.1208/s12249-014-0100-4.

- [142] G. Di Prima, S. Saladino, F. Bongiovì, G. Adamo, G. Ghersi, G. Pitarresi, G. Giammona, Novel inulin-based mucoadhesive micelles loaded with corticosteroids as potential transcorneal permeation enhancers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 117 (2017) 385–399. doi:10.1016/j.ejpb.2017.05.005.
- [143] X. Shuai, T. Merdan, A.K. Schaper, F. Xi, T. Kissel, Core-cross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004) 441–448. doi:10.1021/bc034113u.
- [144] K.K. Jette, D. Law, E.A. Schmitt, G.S. Kwon, Preparation and drug loading of poly(ethylene glycol)-block-poly(ε-caprolactone) micelles through the evaporation of a cosolvent azeotrope, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1184–1191. doi:10.1023/B:PHAM.0000033005.25698.9c.
- [145] G. Prosperi-Porta, S. Kedzior, B. Muirhead, H. Sheardown, Phenylboronic-Acid-Based Polymeric Micelles for Mucoadhesive Anterior Segment Ocular Drug Delivery, *Biomacromolecules.* 17 (2016) 1449–1457. doi:10.1021/acs.biomac.6b00054.
- [146] T. Matsuya, S. Tashiro, N. Hoshino, N. Shibata, Y. Nagasaki, K. Kataoka, A Core-Shell-Type Fluorescent Nanosphere Possessing Reactive Poly(ethylene glycol) Tethered Chains on the Surface for Zeptomole Detection of Protein in Time-Resolved Fluorometric Immunoassay, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6124–6132. doi:10.1021/ac034346e.
- [147] N.Y. Rapoport, J.N. Herron, W.G. Pitt, L. Pitina, Micellar delivery of doxorubicin and its paramagnetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: Effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake, *J. Control. Release.* 58 (1999) 153–162. doi:10.1016/S0168-3659(98)00149-7.
- [148] S. Son, E. Shin, B.S. Kim, Light-responsive micelles of spiropyran initiated hyperbranched polyglycerol for smart drug delivery, *Biomacromolecules.* 15 (2014) 628–634. doi:10.1021/bm401670t.
- [149] V.P. Torchilin, Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 2549–2559. doi:10.1007/s00018-004-4153-5.
- [150] X.B. Xiong, A. Falamarzian, S.M. Garg, A. Lavasanifar, Engineering of amphiphilic block copolymers for polymeric micellar drug and gene delivery, in: *J. Control. Release*, 2011: pp. 248–261. doi:10.1016/j.jconrel.2011.04.028.
- [151] N. Zhang, P.R. Wardwell, R.A. Bader, Polysaccharide-based micelles for drug delivery, *Pharmaceutics.* 5 (2013) 329–352. doi:10.3390/pharmaceutics5020329.
- [152] R.K. Shukla, A. Tiwari, Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 399–416. doi:10.1016/j.carbpol.2011.12.021.
- [153] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1650–1662. doi:10.1016/j.addr.2008.09.001.
- [154] T. Dai, M. Tanaka, Y.-Y. Huang, M.R. Hamblin, Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 9 (2011) 857–879. doi:10.1586/eri.11.59.
- [155] E. Young, The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds, *Thromb. Res.* 122 (2008) 743–752. doi:10.1016/j.thromres.2006.10.026.
- [156] K. Reddy, G.K. Mohan, S. Satla, S. Gaikwad, Natural polysaccharides: Versatile excipients for controlled drug delivery systems, *Asian J. Pharm. Sci.* 6 (2011) 275–286.
- [157] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R.H. Müller, J.M. Verbavatz, R. Langer, The

- controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 316–326. doi:10.1016/j.addr.2012.09.008.
- [158] I. Pepić, J. Lovrić, J. Filipović-Grčić, How do polymeric micelles cross epithelial barriers?, *Eur. J. Pharm. Sci.* 50 (2013) 42–55. doi:10.1016/j.ejps.2013.04.012.
- [159] A.K. Gupta, S. Madan, D.K. Majumdar, A. Maitra, Ketorolac entrapped in polymeric micelles: Preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies, *Int. J. Pharm.* 209 (2000) 1–14. doi:10.1016/S0378-5173(00)00508-1.
- [160] S. Mansuri, P. Kesharwani, K. Jain, R.K. Tekade, N.K. Jain, Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *React. Funct. Polym.* 100 (2016) 151–172. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011.
- [161] R. Donnelly, R. Shaikh, T. Raj Singh, M. Garland, Ad. Woolfson, Mucoadhesive drug delivery systems, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3 (2011) 89. doi:10.4103/0975-7406.76478.
- [162] V. V. Khutoryanskiy, *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*, 2014. doi:10.1002/9781118794203.
- [163] V. V. Khutoryanskiy, *Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers*, *Macromol. Biosci.* 11 (2011) 748–764. doi:10.1002/mabi.201000388.
- [164] N.A. Peppas, Y. Huang, Nanoscale technology of mucoadhesive interactions, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1675–1687. doi:10.1016/j.addr.2004.03.001.
- [165] M.T. Cook, V. V. Khutoryanskiy, Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials - A mini-review, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 991–998. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.09.064.
- [166] C. -M Lehr, J.A. Bouwstra, W. Kok, A.G. De Boer, J.J. Tukker, J.C. Verhoef, D.D. Breimer, H.E. Junginger, Effects of the Mucoadhesive Polymer Polycarbophil on the Intestinal Absorption of a Peptide Drug in the Rat, *J. Pharm. Pharmacol.* 44 (1992) 402–407. doi:10.1111/j.2042-7158.1992.tb03633.x.
- [167] D.G. Birch, F. Qi Liang, Age-related macular degeneration: a target for nanotechnology derived medicines, *Int. J. Nanomedicine.* 2 (2007) 65–77. doi:http://dx.doi.org/10.2147/nano.2007.2.1.65.
- [168] C. Yousry, S.A. Elkheshen, H.M. El-laithy, T. Essam, R.H. Fahmy, Studying the influence of formulation and process variables on Vancomycin-loaded polymeric nanoparticles as potential carrier for enhanced ophthalmic delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 100 (2017) 142–154. doi:10.1016/j.ejps.2017.01.013.
- [169] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 75 (2010) 1–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- [170] R.C. Nagarwal, S. Kant, P.N. Singh, P. Maiti, J.K. Pandit, Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery, *J. Control. Release.* 136 (2009) 2–13. doi:10.1016/j.jconrel.2008.12.018.
- [171] T.G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig, Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies, *Nano Today.* 6 (2011) 176–185. doi:10.1016/j.nantod.2011.02.003.
- [172] J.P. Rao, K.E. Geckeler, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, (2011). doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.
- [173] M. Perullini, S.A. Aldabe Bilmes, M. Jobbágy, Cerium oxide nanoparticles: Structure, applications, reactivity, and eco-toxicology, in: *Nanomater. A Danger or a Promise? A Chem. Biol. Perspect.*, 2013: pp. 307–333. doi:10.1007/978-1-4471-4213-3.

- [174] C.I.C. Crucho, M.T. Barros, Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods, *Mater. Sci. Eng. C.* 80 (2017) 771–784. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004.
- [175] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1688–1713. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017.
- [176] J.W. Vanderhoff, J. Ugelstad, S.E.-A. Mohamed, Polymer emulsification process, *United States Pat.* 4 (1979). doi:US4177177 A.
- [177] C. Vauthier, K. Bouchemal, Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles, *Pharm. Res.* 26 (2009) 1025–1058. doi:10.1007/s11095-008-9800-3.
- [178] A.A. Barba, A. Dalmoro, M. D'Amore, C. Vascello, G. Lamberti, Biocompatible nano-micro-particles by solvent evaporation from multiple emulsions technique, *J. Mater. Sci.* 49 (2014) 5160–5170. doi:10.1007/s10853-014-8224-1.
- [179] G. Cavallaro, E.F. Craparo, C. Sardo, G. Lamberti, A.A. Barba, A. Dalmoro, PHEA-PLA biocompatible nanoparticles by technique of solvent evaporation from multiple emulsions, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 719–727. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.09.050.
- [180] J.-C. LEROUX, E. ALLEMANN, E. DOELKER, R. GURNY, New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 14–18. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3408032>.
- [181] D. Moinard-Chécot, Y. Chevalier, S. Briançon, L. Beney, H. Fessi, Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process, *J. Colloid Interface Sci.* 317 (2008) 458–468. doi:10.1016/j.jcis.2007.09.081.
- [182] S. Guinebrière, S. Briançon, J. Lieto, C. Mayer, H. Fessi, Study of the emulsion-diffusion of solvent: Preparation and characterization of nanocapsules, *Drug Dev. Res.* 57 (2002) 18–33. doi:10.1002/ddr.10054.
- [183] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, E. Doelker, H. Fessi, A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique, *Colloid Polym. Sci.* 275 (1997) 640–647. doi:10.1007/s003960050130.
- [184] H. Ibrahim, C. Bindschaedler, E. Doelker, P. Buri, R. Gurny, Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process, *Int. J. Pharm.* 87 (1992) 239–246. doi:10.1016/0378-5173(92)90248-Z.
- [185] F. Ganachaud, J.L. Katz, Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices, *ChemPhysChem.* 6 (2005) 209–216. doi:10.1002/cphc.200400527.
- [186] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 233 (2002) 239–252. doi:10.1016/S0378-5173(01)00944-9.
- [187] H.J. Jeon, Y. Il Jeong, M.K. Jang, Y.H. Park, J.W. Nah, Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics, *Int. J. Pharm.* 207 (2000) 99–108. doi:10.1016/S0378-5173(00)00537-8.
- [188] L. Chronopoulou, I. Fratoddi, C. Palocci, I. Venditti, M. V. Russo, Osmosis based method drives the self-assembly of polymeric chains into micro-and nanostructures, *Langmuir.* 25 (2009) 11940–11946. doi:10.1021/la9016382.
- [189] E. Elizondo, J. Veciana, N. Ventosa, Nanostructuring molecular materials as particles and vesicles for drug delivery, using compressed and supercritical fluids, *Nanomedicine.* 7

- (2012) 1391–1408. doi:10.2217/nmm.12.110.
- [190] D. Sanli, S.E. Bozbag, C. Erkey, Synthesis of nanostructured materials using supercritical CO₂: Part I. Physical transformations, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 2995–3025. doi:10.1007/s10853-011-6054-y.
- [191] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.* 55 (1989). doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0.
- [192] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison, *Adv. Colloid Interface Sci.* 163 (2011) 90–122. doi:10.1016/j.cis.2011.02.005.
- [193] C. V. Sternling, L.E. Scriven, Interfacial turbulence: Hydrodynamic instability and the marangoni effect, *AIChE J.* 5 (1959) 514–523. doi:10.1002/aic.690050421.
- [194] J. Chang, Y. Jallouli, M. Kroubi, X. bo Yuan, W. Feng, C. sheng Kang, P. yu Pu, D. Betbeder, Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 285–292. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.035.
- [195] H. Xie, J.W. Smith, Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system., *J. Nanobiotechnology.* 8 (2010) 18. doi:10.1186/1477-3155-8-18.
- [196] R. Karnik, F. Gu, P. Basto, C. Cannizzaro, L. Dean, W. Kyei-Manu, R. Langer, O.C. Farokhzad, Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles, *Nano Lett.* 8 (2008) 2906–2912. doi:10.1021/nl801736q.
- [197] S.T. Sanjay, W. Zhou, M. Dou, H. Tavakoli, L. Ma, F. Xu, X.J. Li, Recent advances of controlled drug delivery using microfluidic platforms, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2017). doi:10.1016/j.addr.2017.09.013.
- [198] L. Capretto, D. Carugo, S. Mazzitelli, C. Nastruzzi, X. Zhang, Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1496–1532. doi:10.1016/j.addr.2013.08.002.
- [199] P. Paolicelli, M. de la Fuente, A. Sánchez, B. Seijo, M.J. Alonso, Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye, *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (2009) 239–253. doi:10.1517/17425240902762818.
- [200] M. de la Fuente, M. Raviña, P. Paolicelli, A. Sanchez, B.B. Seijo, M.J. Alonso, M. Raviña, P. Paolicelli, A. Sanchez, B.B. Seijo, M.J. Alonso, Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 100–117. doi:10.1016/j.addr.2009.11.026.
- [201] J.G. Souza, K. Dias, T.A. Pereira, D.S. Bernardi, R.F.V. Lopez, Topical delivery of ocular therapeutics: Carrier systems and physical methods, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 507–530. doi:10.1111/jphp.12132.
- [202] K. Tahara, K. Karasawa, R. Onodera, H. Takeuchi, Feasibility of drug delivery to the eye's posterior segment by topical instillation of PLGA nanoparticles, *Asian J. Pharm. Sci.* 12 (2017) 394–399. doi:10.1016/j.ajps.2017.03.002.
- [203] H. Kim, S.B. Robinson, K.G. Csaky, Investigating the movement of intravitreal human serum albumin nanoparticles in the vitreous and retina, *Pharm. Res.* 26 (2009) 329–337. doi:10.1007/s11095-008-9745-6.
- [204] A. Madni, M.A. Rahem, N. Tahir, M. Sarfraz, A. Jabar, M. Rehman, P.M. Kashif, S.F. Badshah, K.U. Khan, H.A. Santos, Non-invasive strategies for targeting the posterior

- segment of eye, *Int. J. Pharm.* 530 (2017) 326–345. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.07.065.
- [205] Q. Xu, N.J. Boylan, J.S. Suk, Y.Y. Wang, E.A. Nance, J.C. Yang, P.J. McDonnell, R.A. Cone, E.J. Duh, J. Hanes, Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo, *J. Control. Release.* 167 (2013) 76–84. doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.018.
- [206] E. Sakurai, H. Ozeki, N. Kunou, Y. Ogura, Effect of Particle Size of Polymeric Nanospheres on Intravitreal Kinetics, *Ophthalmic Res.* 33 (2000) 31–36. doi:10.1159/000055638.
- [207] H. Koo, H. Moon, H. Han, J.H. Na, M.S. Huh, J.H. Park, S.J. Woo, K.H. Park, I. Chan Kwon, K. Kim, H. Kim, The movement of self-assembled amphiphilic polymeric nanoparticles in the vitreous and retina after intravitreal injection, *Biomaterials.* 33 (2012) 3485–3493. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.030.
- [208] M. Millard, S. Odde, N. Neamati, Integrin targeted therapeutics., *Theranostics.* 1 (2011) 154–88. doi:10.7150/thno/v01p0154.
- [209] K. Pollinger, R. Hennig, A. Ohlmann, R. Fuchshofer, R. Wenzel, M. Breunig, J. Tessmar, E.R. Tamm, A. Goepferich, Ligand-functionalized nanoparticles target endothelial cells in retinal capillaries after systemic application., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 6115–20. doi:10.1073/pnas.1220281110.
- [210] L. Luo, X. Zhang, Y. Hirano, P. Tyagi, P. Barab??s, H. Uehara, T.R. Miya, N. Singh, B. Archer, Y. Qazi, K. Jackman, S.K. Das, T. Olsen, S.R. Chennamaneni, B.C. Stagg, F. Ahmed, L. Emerson, K. Zygmunt, R. Whitaker, C. Mamalis, W. Huang, G. Gao, S.P. Srinivas, D. Krizaj, J. Baffi, J. Ambati, U.B. Kompella, B.K. Ambati, Targeted intraceptor nanoparticle therapy reduces angiogenesis and fibrosis in primate and murine macular degeneration, *ACS Nano.* 7 (2013) 3264–3275. doi:10.1021/nn305958y.
- [211] J.H. Sze, J.C. Brownlie, C.A. Love, Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review, *3 Biotech.* 6 (2016) 1–9. doi:10.1007/s13205-016-0379-9.
- [212] G. Tripodo, A. Trapani, M.L. Torre, G. Giammona, G. Trapani, D. Mandracchia, Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 400–416. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.032.
- [213] C.E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T.F. Vandamme, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 85 (2011) 469–489. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.019.
- [214] K. Raemdonck, T.F. Martens, K. Braeckmans, J. Demeester, S.C. De Smedt, Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1123–1147. doi:10.1016/j.addr.2013.05.002.
- [215] J.S. Frenkel, The role of hyaluronan in wound healing, *Int. Wound J.* 11 (2014) 159–163. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x.
- [216] A. D’Agostino, A. Stellavato, L. Corsuto, P. Diana, R. Filosa, A. La Gatta, M. De Rosa, C. Schiraldi, Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells?, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 21–30. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.125.
- [217] F. Dosio, S. Arpicco, B. Stella, E. Fattal, Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97 (2016) 204–236. doi:10.1016/j.addr.2015.11.011.
- [218] L. Tong, A. Petznick, S. Lee, J. Tan, Choice of Artificial Tear Formulation for Patients With Dry Eye, *Cornea.* 31 (2012) S32–S36. doi:10.1097/ICO.0b013e318269cb99.
- [219] Y.H. Liao, S.A. Jones, B. Forbes, G.P. Martin, M.B. Brown, Hyaluronan: Pharmaceutical characterization and drug delivery, *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents.* 12 (2005)

- 327–342. doi:10.1080/10717540590952555.
- [220] X. Zheng, T. Goto, A. Shiraishi, Y. Ohashi, In vitro efficacy of ocular surface lubricants against dehydration., *Cornea*. 32 (2013) 1260–4. doi:10.1097/ICO.0b013e31829cfd44.
- [221] R. Salzillo, C. Schiraldi, L. Corsuto, A. D'Agostino, R. Filosa, M. De Rosa, A. La Gatta, Optimization of hyaluronan-based eye drop formulations, *Carbohydr. Polym.* 153 (2016) 275–283. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.106.
- [222] M. Guter, M. Breunig, Hyaluronan as a promising excipient for ocular drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 113 (2017) 34–49. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.035.
- [223] C. Schramm, M.S. Spitzer, S. Henke-Fahle, G. Steinmetz, K. Januschowski, P. Heiduschka, J. Geis-Gerstorfer, T. Biedermann, K.U. Bartz-Schmidt, P. Szurman, The cross-linked biopolymer hyaluronic acid as an artificial vitreous substitute, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (2012) 613–621. doi:10.1167/iovs.11-7322.
- [224] R.H. Foxton, A. Finkelstein, S. Vijay, A. Dahlmann-Noor, P.T. Khaw, J.E. Morgan, D.T. Shima, Y.S. Ng, VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma, *Am. J. Pathol.* 182 (2013) 1379–1390. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.032.
- [225] S. Reimondez-Troitiño, N. Csaba, M.J. Alonso, M. De La Fuente, Nanotherapies for the treatment of ocular diseases, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95 (2015) 279–293. doi:10.1016/j.ejpb.2015.02.019.
- [226] G.P. Andrews, T.P. Lavery, D.S. Jones, Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 505–518. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.028.
- [227] J.F. Figueiro, A.M. Silva, M.L. Garcia, E.B. Souto, Current nanotechnology approaches for the treatment and management of diabetic retinopathy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95 (2015) 307–322. doi:10.1016/j.ejpb.2014.12.023.
- [228] S. Pandian, V. Jeevanesan, C. Ponnusamy, S. Natesan, RES-loaded pegylated CS NPs: for efficient ocular delivery, *IET Nanobiotechnology*. 11 (2017) 32–39. doi:10.1049/iet-nbt.2016.0069.
- [229] E.A. Mun, P.W.J. Morrison, A.C. Williams, V. V Khutoryanskiy, On the Barrier Properties of the Cornea: A Microscopy Study of the Penetration of Fluorescently Labeled Nanoparticles, Polymers, and Sodium Fluorescein, (2014). doi:10.1021/mp500332m.
- [230] N. Pescosolido, B. Imperatrice, A. Koverech, M. Messano, l-Carnitine and Short Chain Ester in Tears from Patients with Dry Eye, *Optom. Vis. Sci.* 86 (2009) E132–E138. doi:10.1097/OPX.0b013e318194e767.
- [231] Q. Garrett, S. Xu, P.A. Simmons, J. Vehige, J.L. Flanagan, M.D. Willcox, Expression and localization of carnitine/organic cation transporter OCTN1 and OCTN2 in ocular epithelium, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008) 4844–4849. doi:10.1167/iovs.07-1528.
- [232] S. Xu, J.L. Flanagan, P.A. Simmons, J. Vehige, M.D. Willcox, Q. Garrett, Transport of L-carnitine in human corneal and conjunctival epithelial cells., *Mol. Vis.* 16 (2010) 1823–31. doi:197 [pii].
- [233] S. Koch, L.A. Van Meeteren, E. Morin, C. Testini, S. Weström, H. Björkelund, S. Le Jan, J. Adler, P. Berger, L. Claesson-Welsh, NRP1 Presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation, *Dev. Cell.* 28 (2014) 633–646. doi:10.1016/j.devcel.2014.02.010.

- [234] D. Valdembri, P.T. Caswell, K.I. Anderson, J.P. Schwarz, I. König, E. Astanina, F. Caccavari, J.C. Norman, M.J. Humphries, F. Bussolino, G. Serini, Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates $\alpha 5 \beta 1$ integrin traffic and function in endothelial cells, *PLoS Biol.* 7 (2009). doi:10.1371/journal.pbio.1000025.
- [235] C. Raimondi, A. Fantin, A. Lampropoulou, L. Denti, A. Chikh, C. Ruhrberg, Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells., *J. Exp. Med.* 211 (2014) 1167–83. doi:10.1084/jem.20132330.
- [236] J. Colicelli, ABL Tyrosine Kinases: Evolution of Function, Regulation, and Specificity, *Sci. Signal.* 3 (2010) re6-re6. doi:10.1126/scisignal.3139re6.
- [237] A. Fantin, Q. Schwarz, K. Davidson, E.M. Normando, L. Denti, C. Ruhrberg, The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins., *Development.* 138 (2011) 4185–4191. doi:10.1242/dev.070037.
- [238] A. Lanahan, X. Zhang, A. Fantin, Z. Zhuang, F. Rivera-Molina, K. Speichinger, C. Prahst, J. Zhang, Y. Wang, G. Davis, D. Toomre, C. Ruhrberg, M. Simons, The Neuropilin 1 Cytoplasmic Domain Is Required for VEGF-A-Dependent Arteriogenesis, *Dev. Cell.* 25 (2013) 156–168. doi:10.1016/j.devcel.2013.03.019.
- [239] D.G. Stupack, D.A. Cheresh, Integrins and Angiogenesis, *Curr. Top. Dev. Biol.* 64 (2004) 207–238. doi:10.1016/S0070-2153(04)64009-9.
- [240] A.S. Alavi, D.A. Cheresh, Integrins in angiogenesis, in: *Angiogenesis. An Integr. Approach From Sci. to Med.*, 2008; pp. 63–73. doi:10.1007/978-0-387-71518-6_6.
- [241] G. Giammona, F. Palumbo, G. Pitarresi, Method to produce hyaluronic acid functionalized derivatives and formation of hydrogels thereof., 2010.
- [242] F.S. Palumbo, G. Pitarresi, C. Fiorica, P. Matricardi, A. Albanese, G. Giammona, In situ forming hydrogels of new amino hyaluronic acid/benzoyl-cysteine derivatives as potential scaffolds for cartilage regeneration, *Soft Matter.* 8 (2012) 4918. doi:10.1039/c2sm07310b.
- [243] B. A.R., Diabetic retinopathy: The latest in current management, *Retina.* 26 (2006) S71–S79. doi:10.1097/01.iae.0000236466.23640.c9.
- [244] H.C. of the Netherlands, Triamcinolone Triamcinolone acetamide Evaluation of the effects on reproduction, recommendation for classification, Health Council of the Netherlands, 2013. <https://www.gezondheidsraad.nl/en/task-and-procedure/areas-of-activity/healthy-working-conditions/triamcinolonetriamcinolone-acetonide> (accessed November 6, 2017).
- [245] G. Horvát, M. Budai-Szucs, S. Berkó, P. Szabó-Révész, J. Soós, A. Facskó, M. Maroda, M. Mori, G. Sandri, M.C. Bonferoni, C. Caramella, E. Csányi, Comparative study of nanosized cross-linked sodium-, linear sodium- and zinc-hyaluronate as potential ocular mucoadhesive drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* 494 (2015) 321–328. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.08.024.
- [246] A. Sosnik, J. Das Neves, B. Sarmiento, Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 2030–2075. doi:10.1016/j.progpolymsci.2014.07.010.
- [247] A.R. Mackie, F.M. Goycoolea, B. Menchicchi, C.M. Caramella, F. Saporito, S. Lee, K. Stephansen, I.S. Chronakis, M. Hiorth, M. Adamczak, M. Waldner, H.M. Nielsen, L. Marcelloni, Innovative Methods and Applications in Mucoadhesion Research, *Macromol. Biosci.* 201600534 (2017) 1–32. doi:10.1002/mabi.201600534.
- [248] S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, C. Caramella, Characterization of chitosan

- hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements, *Eur. J. Pharm. Sci.* 10 (2000) 251–257. doi:10.1016/S0928-0987(00)00065-8.
- [249] L. Baydoun, C.C. Müller-Goymann, Influence of n-octenylsuccinate starch on in vitro permeation of sodium diclofenac across excised porcine cornea in comparison to Voltaren ophtha, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 73–79. doi:10.1016/S0939-6411(03)00036-5.
- [250] S.R. Kiran Vaka, S.M. Sammeta, L.B. Day, S.N. Murthy, Transcorneal iontophoresis for delivery of ciprofloxacin hydrochloride, *Curr. Eye Res.* 33 (2008) 661–667. doi:10.1080/02713680802270945.
- [251] J.M. Stewart, D.S. Schultz, O.T. Lee, M.L. Trinidad, Collagen cross-links reduce corneal permeability, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 1606–1612. doi:10.1167/iovs.08-2727.
- [252] S. Pescina, P. Govoni, A. Potenza, C. Padula, P. Santi, S. Nicoli, Development of a convenient ex vivo model for the study of the transcorneal permeation of drugs: Histological and permeability evaluation, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 63–71. doi:10.1002/jps.24231.
- [253] Michael E Aulton, *Aulton's Pharmaceutics*, 2013. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [254] R. Mabry, D.G. Gilbertson, A. Frank, T. Vu, D. Ardourel, C. Ostrander, B. Stevens, S. Julien, S. Franke, B. Meengs, J. Brody, S. Presnell, N.B. Hamacher, M. Lantry, A. Wolf, T. Bukowski, R. Rosler, C. Yen, M. Anderson-Haley, K. Brasel, Q. Pan, H. Franklin, P. Thompson, M. Dodds, S. Underwood, S. Peterson, P. V. Sivakumar, M. Snaveley, A dual-targeting PDGFR β /VEGF-A molecule assembled from stable antibody fragments demonstrates anti-angiogenic activity in vitro and in vivo, *MAbs.* 2 (2010) 20–34. doi:10.4161/mabs.2.1.10498.
- [255] J. Siedlecki, C. Wertheimer, A. Wolf, R. Liegl, C. Priglinger, S. Priglinger, K. Eibl-Lindner, Combined VEGF and PDGF inhibition for neovascular AMD: anti-angiogenic properties of axitinib on human endothelial cells and pericytes in vitro, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 255 (2017) 963–972. doi:10.1007/s00417-017-3595-z.
- [256] H. Du, X. Sun, M. Guma, J. Luo, H. Ouyang, X. Zhang, J. Zeng, J. Quach, D.H. Nguyen, P.X. Shaw, M. Karin, K. Zhang, JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 2377–82. doi:10.1073/pnas.1221729110.
- [257] M. Honda, Suppression of Choroidal Neovascularization by Intravitreal Injection of Liposomal SU5416, *Arch. Ophthalmol.* 129 (2011) 317. doi:10.1001/archophthalmol.2011.12.
- [258] S. Kang, Y.J. Roh, I.B. Kim, Antiangiogenic effects of tivozanib, an oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, on experimental choroidal neovascularization in mice, *Exp. Eye Res.* 112 (2013) 125–133. doi:10.1016/j.exer.2013.05.006.
- [259] S. Kang, C.R. Roh, W.-K. Cho, K.C. Park, K.-J. Yang, H.-S. Choi, S.-H. Kim, Y.-J. Roh, Antiangiogenic effects of axitinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on laser-induced choroidal neovascularization in mice., *Curr. Eye Res.* 38 (2013) 119–27. doi:10.3109/02713683.2012.727520.
- [260] Â. Carneiro, M. Falcão, A. Pirraco, P. Milheiro-Oliveira, F. Falcão-Reis, R. Soares, Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells, *Exp. Eye Res.* 88 (2009) 522–527. doi:10.1016/j.exer.2008.11.011.
- [261] Q. Zhou, R. Gallagher, R. Ufret-Vincenty, X. Li, E.N. Olson, S. Wang, Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23 27 24 clusters,

- Proc. Natl. Acad. Sci. 108 (2011) 8287–8292. doi:10.1073/pnas.1105254108.
- [262] P.M. Valencia, O.C. Farokhzad, R. Karnik, R. Langer, Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 623–629. doi:10.1038/nnano.2012.168.
- [263] J.W. Hickey, J.L. Santos, J.M. Williford, H.Q. Mao, Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery, *J. Control. Release.* 219 (2015) 535–547. doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.006.
- [264] S. Agnello, L. Gasperini, R.L. Reis, J.F. Mano, G. Pitarresi, F.S. Palumbo, G. Giammona, Microfluidic production of hyaluronic acid derivative microfibers to control drug release, *Mater. Lett.* 182 (2016) 309–313. doi:10.1016/j.matlet.2016.07.014.
- [265] F.S. Palumbo, G. Pitarresi, D. Mandracchia, G. Tripodo, G. Giammona, New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 379–385. doi:10.1016/j.carbpol.2006.03.023.
- [266] E.F. Craparo, G. Teresi, M.L. Bondi, M. Licciardi, G. Cavallaro, Phospholipid-polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids, *Int. J. Pharm.* 406 (2011) 135–144. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.024.
- [267] J. Gao, J. Ming, B. He, Y. Fan, Z. Gu, X. Zhang, Preparation and characterization of novel polymeric micelles for 9-nitro-20(S)-camptothecin delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 85–93. doi:10.1016/j.ejps.2008.01.016.
- [268] R. Fields, the Rapid Determination of Amino Groups with TNBS, *Methods Enzymol.* 25 (1972) 464–468. doi:10.1016/S0076-6879(72)25042-X.
- [269] K. Kawazu, A. Oshita, T. Nakamura, M. Nakashima, N. Ichikawa, H. Sasaki, Transport of acebutolol through rabbit corneal epithelium., *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 846–849. doi:JST.JSTAGE/bpb/29.846 [pii].
- [270] Y. Chu, N. Chen, H. Yu, H. Mu, B. He, H. Hua, A. Wang, K. Sun, Topical ocular delivery to laser-induced choroidal neovascularization by dual internalizing RGD and TAT peptide-modified nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 1353–1368. doi:10.2147/IJN.S126865.