

G. Capuano¹, J. Alongi¹, A. Manfredi¹, R. Cavalli², E. Marti³, X. Fernandez-Busquets³, P. Ferruti¹, E. Ranucci¹

¹ Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Chimica, via Camillo Golgi 19, 20133 Milano, Italy; ² Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, via Pietro Giuria 9, 10125 Torino, Italy; ³ Nanomalaria Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Baldori Reixac 10-12, ES-08028 Barcelona, Spain

e-mail: giovanna.capuano@unimi.it

Introduzione

Nei sistemi a rilascio controllato (DDs), l'acido poli(lattico-glicolico), PLGA, è uno tra i biomateriali maggiormente usati come componente idrofobica.^{1,2} Approvato dal FDA, il PLGA è un copolimero biodegradabile e lo si trova spesso coniugato ad un polimero idrofilico, biocompatibile, in modo da risultare invisibile al sistema immunitario ed evitare la rapida eliminazione dal flusso sanguigno.³ Il poli(N-vinilpirrolidone), PVP, non induce la risposta del RES e non è soggetto al fenomeno chiamato *accelerated blood clearance* (ABC), che consiste in una rapida diminuzione della concentrazione dei DDs dopo una seconda iniezione fatta a determinati intervalli di tempo dalla prima.⁴ Il PVP non è biodegradabile, quindi, può essere utilizzato in formulazioni iniettabili, solo in presenza di polimeri con Mw sufficientemente bassi (10k- 30k) da essere bioeliminabili attraverso filtrazione renale.

Recentemente sono stati sintetizzati copolimeri PLGA-g-PVP, aventi una catena principale ad alto peso molecolare di PLGA (50:50) e segmenti laterali oligomeric di PVP.⁵ Il processo sintetico a singolo step consiste in una polimerizzazione a trasferimento di catena dell' N-vinilpirrolidin-2-one (N-VP) a partire da PLGA fuso. Diverse percentuali di PVP sono state innestate sulla catena principale, e sono state valutate diverse proprietà dei copolimeri ottenuti.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di utilizzare i copolimeri PLGA-g-PVP per la formulazione di farmaci idrofobici, quali l'artemisinina⁶ e la curcumina,⁷ noti farmaci antimalariali. La necessità di sviluppare DDs di questi due farmaci trova spiegazione nella loro ridotta biodisponibilità e solubilità in acqua, nelle scarse proprietà farmacocinetiche e nella bassa stabilità chimica. Come DDs sono state preparate delle nanocapsule consistenti di un cuore oleoso, in cui i farmaci sono solubili, e una corona polimerica formata dai copolimeri PLGA-g-PVP. Le formulazioni ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico, chimico-fisicamente e sono state eseguite prove di rilascio del farmaco e di attività antimalariale *in vitro*.

Copolimeri PLGA-g-PVP

Radical polymerization

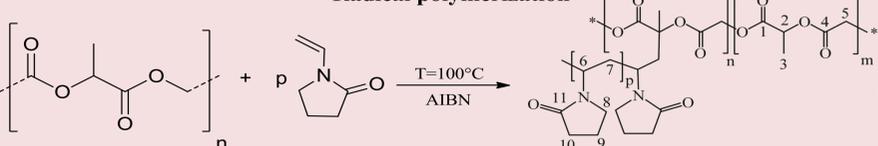


Figura 1. Sintesi dei copolimeri del PLGA-g-PVP mediante polimerizzazione radicalica del N-VP sul PLGA.

I copolimeri PLGA-g-PVP sono stati ottenuti mediante l'aggiunta del N-VP a 100°C al PLGA 50:50 con tre rapporti w/w di PLGA/N-VP, 10:1 (PLGA-g-PVP₀₁), 10:2 (PLGA-g-PVP₀₂) e 10:3 (PLGA-g-PVP₀₃), e l'aggiunta dell'1% w/w (basato sul N-VP) di AIBN come iniziatore radicalico. Le catene laterali di PVP sono state liberate mediante saponificazione e analizzate tramite SEC, per valutare i pesi molecolari (destra), e mediante MALDI-TOF per evidenziarne i terminali (sotto).

Picco	T1	Terminali		Catione	m/z	
		T2	Struttura		Sperimentale	Calcolato
1	H			H+	1425.1	1424.8
2	H			Na+	1432.1	1431.7
3	H			H+	1443.3	1443.7
4	H			Na+	1447.0	1445.7
5	H			Na+	1455.1	1453.7
6	H			H+	1469.0	1468.8
7	H			H+	1482.0	1482.8
8	H			H+	1497.0	1496.8
9	H			Na+	1511.0	1511.7
10	H			Na+	1522.0	1522.7

Tabella 2. Terminali del prodotto saponificato del PLGA-g-PVP₀₁, con X_n= 12.

Conclusioni

Nanocapsule di artemisinina e curcumina, potenti farmaci antimalariali con ridotta biodisponibilità, sono state ottenute utilizzando copolimeri ad innesto PLGA-g-PVP con diverse percentuali di PVP legato ad una catena di PLGA (50:50). Misure di scattering dinamico (DLS) hanno evidenziato dimensioni comprese tra 50 e 100 nm, stabili in soluzione acquosa per almeno un mese a temperatura ambiente. L'efficacia di incapsulamento è risultata elevata con entrambi i farmaci, in particolar modo nel caso dell'artemisinina è quasi del 100%.

Test *in vitro* hanno evidenziato una maggiore efficacia rispetto al farmaco libero, nel caso della curcumina, nei confronti del parassita *Plasmodium falciparum*.

Riferimenti bibliografici

[1] H. K. Makadia, S. J. Siegel, *Polymers*, 3, 1377-1397, (2011). [2] F. Danhier, E. Amsorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, *J. Control. Release*, 161, 505-522, (2012). [3] S. Parveen, S.K. Sahoo, *European Journal of Pharmacology*, 670, 372-383, (2011). [4] T. Ishihara, T. Maeda, H. Sakamoto, N. Takasaki, M. Shigyo, T. Ishida, H. Kiwada, Y. Mizushima, T. Mizushima, *Biomacromolecules*, 11, 2700-2706, (2010). [5] E. Ranucci, G. Capuano, A. Manfredi, P. Ferruti, *J. Polym. Sci.: Part A: Polymer Chemistry*, 54, 1919-1928, (2016). [6] G. A. Balint, *Pharm. & Therap.*, 90, 261-265, (2001). [7] R.C. Reddy, P.G. Vatsala, V.G. Keshamouni, G. Padmanabhan, P.N. Rangarajan, *Biochem. Biophys. Res. Com. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326, 472-474, (2005).

Campione	Resa %	PVP \overline{M}_n	PVP \overline{M}_w	$C_T \times 10^3$ (a)	$C_T \times 10^5$ (b)
PLGA-g-PVP ₀₁	98,6	2 700	5 600	1,25	1,46
PLGA-g-PVP ₀₂	99,8	12 100	31 000	5,58	0,65
PLGA-g-PVP ₀₃	95,0	28 000	49 500	3,62	0,42

Tabella 1. Resa della reazione, pesi molecolari delle catene laterali di PVP e stima delle CT medie delle unità ripetenti (a) CT del PLGA; (b) CT media per unità di PLGA.

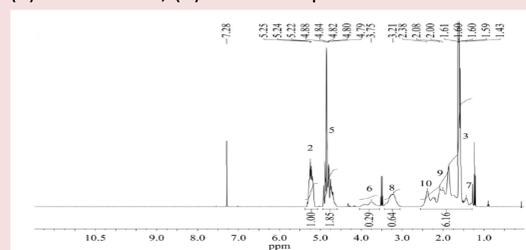


Figura 2. Spettro ¹H NMR del PLGA-g-PVP₀₃ in CDCl₃.

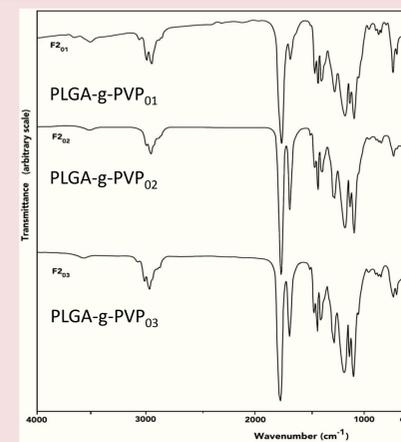


Figura 3. Spettri FTIR dei prodotti.

Formulazione	Potenziale ζ	Dimensioni (nm)	PDI
Epikuron ^a DOSS ^b	+20,04±3,93	133,1±16,1	0,30±0,04
Mygliol ^c			
Epikuron Pluronic ^d	+20,18±1,50	123,3±1,2	0,29±0,01
Mygliol			
Epikuron Tween 80	+24,75±1,85	118,2±2,2	0,34±0,01
Mygliol			
Epikuron Tween 80 i-pr-miristato ^e	+23,57±1,19	94,7±4,0	0,21±0,02

Tabella 3: Potenziale ζ e dimensioni dei core delle nanocapsule, variando il tensioattivo e l'olio.

a) Epikuron 200; b) DOSS= diottilsolfosuccinato; c) Mygliol 810; d) Pluronic F68; e) isopropil-miristato.

PLGA-g-PVP _{10:1}	Dimensione (nm)	PDI
Bianche	57,1 ± 0,8	0,27 ± 0,01
Curcumina	67,6 ± 0,6	0,17 ± 0,03
Artemisinina	74,7 ± 0,7	0,20 ± 0,02

PLGA-g-PVP _{10:2}	Dimensione (nm)	PDI
Bianche	69,5 ± 1,0	0,30 ± 0,01
Curcumina	54,7 ± 0,1	0,20 ± 0,01
Artemisinina	94,6 ± 0,7	0,26 ± 0,01

Tabella 6: Dimensioni delle nanocapsule bianche e caricate con artemisinina e curcumina aventi come corona i copolimeri PLGA-g-PVP_{10:1} e PLGA-g-PVP_{10:2}

Studio della formulazione

Alcool	Dimensione (nm)	PDI
Butanolo	39,9 ± 3,0	0,308 ± 0,017
Esanolo	43,2 ± 3,3	0,211 ± 0,024
Eptanolo	53,8 ± 2,2	0,237 ± 0,014
Decanolo	28,9 ± 0,5	0,231 ± 0,012
Benzilalcol	84,7 ± 3,9	0,344 ± 0,005

Tabella 4: Dimensioni dei core delle nanocapsule variando l'alcool.

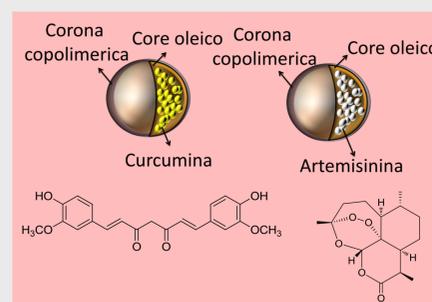


Figura 4. Struttura delle nanocapsule e dei farmaci.

Farmaco	Concentrazione farmaco (mM)	% Efficacia di incapsulamento (E.E.)
Curcumina	1,42	74
Artemisinina	2,46	99

Tabella 7: Concentrazione dei farmaci caricati nella nanocapsule e efficacia di incapsulamento percentuale ottenuta tramite l'equazione $E.E. = \frac{m_{finali}}{m_{iniziali}} \times 100\%$

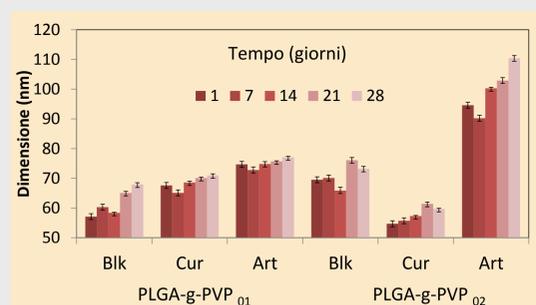


Figura 5. Stabilità dimensionale delle nanocapsule bianche o cariche di farmaco.

Curcumina (mg/mL)	Dimensione (nm)	PDI
0,4	54,8 ± 0,7	0,21 ± 0,01
0,7	34,1 ± 0,2	0,13 ± 0,03
1,0	42,5 ± 0,5	0,2 ± 0,00

Artemisinina (mg/mL)	Dimensione (nm)	PDI
0,4	59,6 ± 0,3	0,19 ± 0,01
0,7	33,2 ± 0,5	0,19 ± 0,01
1,0	31,7 ± 0,5	0,22 ± 0,01

Tabella 5: Dimensioni dei core delle nanocapsule variando il quantitativo di farmaco introdotto. La concentrazione del farmaco indicata è quella di carico e non quella effettiva.

PLGA-g-PVP _{10:1}	Potenziale (mV)	Osmolarità (mOsmol)
Bianche	-11,54 ± 4,05	145
Curcumina	-12,37 ± 4,66	241
Artemisinina	-14,07 ± 2,94	200

PLGA-g-PVP _{10:2}	Potenziale (mV)	Osmolarità (mOsmol)
Bianche	-7,56 ± 1,82	130
Curcumina	-10,78 ± 4,93	204
Artemisinina	-13,03 ± 2,39	160

Tabella 8. Potenziale ζ ed osmolarità delle nanocapsule bianche e cariche di farmaco.

Test *in vitro*

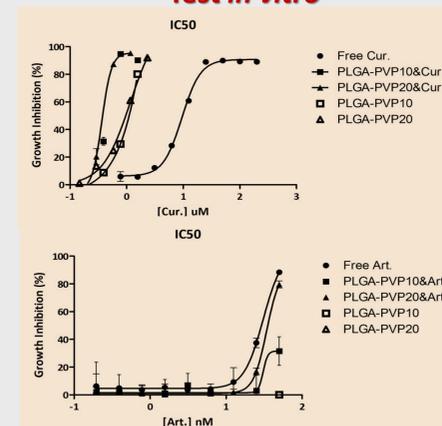


Figura 6. IC₅₀ dei farmaci liberi (free Cur e free Art), delle nanocapsule bianche (PLGA-PVP 10 e PLGA-PVP 20) e delle nanocapsule cariche di farmaco verso *Plasmodium falciparum* (3D7).

Rilascio...

Ringraziamenti

Il progetto è stato finanziato dalla Fondazione Cariplo (Milano), concessione N° 2013-0583.