

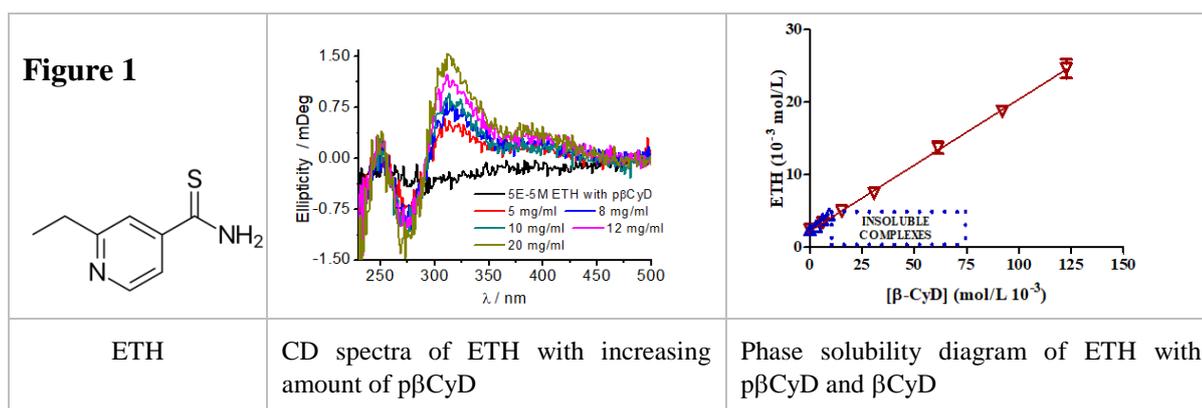
## Abstract

La mia attività di ricerca per ottenere il titolo di dottore di ricerca fa parte del progetto 7FP-ITN CyclonHit intitolato "NANOCARRIERS FOR THE DELIVERY OF ANTIMICROBIAL AGENTS TO FIGHT RESISTANCE MECHANISMS ". Lo scopo del mio progetto di ricerca è stato quello di identificare nuovi materiali nanometrici come sistemi di trasporto per antibiotici noti al fine di migliorare le loro prospettive di somministrazione e la loro biodisponibilità ed efficacia. In particolare, abbiamo studiato l'interazione di Ethionamide (ETH) e Clofazimina (CLZ), due noti antibiotici, con nanomateriali a base di ciclodestrina e silice come vettori.

### Ethionamide (ETH)

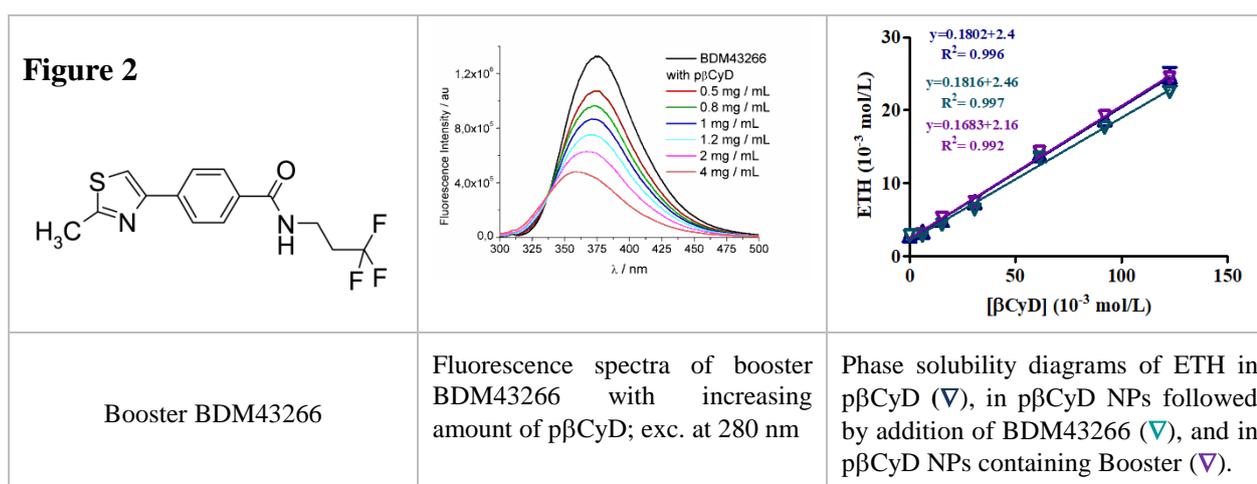
ETH è un noto farmaco antitubercolare di seconda linea. Questo farmaco richiede dosi terapeutiche elevate che causano gravi effetti collaterali e soffre di problemi di somministrazione a causa della sua scarsa solubilità in acqua e la sua tendenza a cristallizzare. Per risolvere il problema di solubilità del farmaco e migliorare la sua biodisponibilità, abbiamo scelto una strategia di complessazione molecolare con nanocarrier a base di ciclodestrina. Sono state utilizzate tecniche spettroscopiche ottiche per comprendere l'interazione di ETH con la  $\beta$ -ciclodestrina naturale ( $\beta$ CyD) come modello, un polimero  $\beta$ CyD *crosslinked* con epicheloidrina ( $p\beta$ CyD), un polimero  $\beta$ CyD marcato con FITC (FITC- $p\beta$ CyD) ed un oligomero di  $\gamma$ -ciclodestrina ( $\gamma$ CyD) marcato con nitrobenzofurazan.

ETH è una molecola non fluorescente ed il dicroismo circolare (CD) si è rivelato essere la tecnica più interessante per studiare il legame ETH. Anche se ETH non è chirale, la complessazione nell'ambiente chirale offerto dalla CyD dà luogo ad un segnale CD indotto come mostrato nella Figura 1 per  $p\beta$ CyD dove la concentrazione ETH è costante e la concentrazione di  $p\beta$ CyD aumenta. Eseguendo un'analisi globale dei dati spettrali della titolazione è stato possibile calcolare le costanti di binding: i valori  $\log(K_{1:1}/M^{-1})$  di 1.7 per  $\beta$ CyD e FITC- $p\beta$ CyD e 2.0 per  $p\beta$ CyD sono stati trovati, assumendo un modello di complessazione 1 : 1 ed esprimendo la concentrazione in unità di  $\beta$ CyD. Da notare che 4,2 mg / ml di ETH possono essere sciolti con 200 mg / ml di  $p\beta$ CyD senza l'uso di solventi organici, corrispondenti ad un carico di farmaco di circa il 2,1%. Il diametro idrodinamico di ca. 30 nm di particelle di  $p\beta$ CyD non cambia a seguito dell'incorporamento del farmaco. È interessante notare che l'intensità della fluorescenza del FITC label migliora in presenza del farmaco, una caratteristica interessante per l'ulteriore sviluppo di questo sistema di trasporto del farmaco.



## Loading contemporaneo di ETH e booster in pβCyD

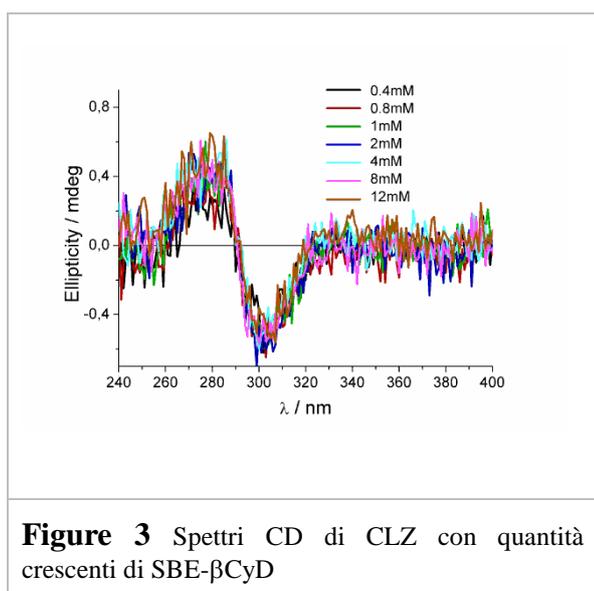
È noto che l'efficacia di ETH è dieci volte maggiore quando somministrato assieme ad una molecola *booster*. I booster sono molecole organiche sintetiche spesso insolubili in acqua che rappresenta un ostacolo per la loro applicazione. In questo contesto abbiamo studiato il caricamento contemporaneo di ETH e booster nel polimero pβCyD. In primo luogo, è stato studiato il binding di cinque diversi booster con il polimero pβCyD. Abbiamo monitorato il binding mediante diverse tecniche spettroscopiche come assorbimento, fluorescenza e dicroismo circolare. L'analisi globale dei dati spettrali della titolazione ha fornito costanti di binding con valori  $\log(K_{1:1}/M^{-1})$  compresi tra 2,28 e 3,37. In seguito, abbiamo studiato spettroscopicamente il loading contemporaneo di ETH e booster BDM43266 (Figura 2) in pβCyD in modo più dettagliato includendo anche la modellistica molecolare e test di competizione tra le due molecole per le cavità singole di βCyD nel polimero mediante prove di solubilità.



È interessante notare che il loading contemporaneo di ETH e booster nel polimero è fattibile e che ETH e BDM43266, con solubilità in acqua di 0,48 mg / ml e 0,01 mg / ml rispettivamente, sono stati incorporati con successo in pβCyD. I diagrammi di solubilità hanno indicato che la soluzione acquosa di polimero è in grado di sciogliere sia il farmaco solido che il booster ottenendo una

quantità di farmaco disciolto di 4,2 mg / ml e di booster di 1,2 mg / ml con 200 mg / ml di p $\beta$ CyD (figura 2). Anche i risultati spettroscopici mostrano che il polimero è in grado di complessare entrambe le molecole quando si applica un rapporto di concentrazione molare [ETH] / [BDM43266] di 10:1. Dicroismo circolare ha fornito la prova del binding di ETH mentre l'interazione del booster BDM-43266 con lo stesso polimero è stata confermata dalla fluorescenza (vedere l'immagine in Figura 2). Il booster non acquisisce un segnale CD indotto indicativo della flessibilità conformazionale del complesso. In linea con questo risultato, la modellistica molecolare ha permesso di ottenere strutture dei complessi di ETH /  $\beta$ CyD e Booster /  $\beta$ CyD con caratteristiche che supportano rispettivamente la presenza e l'assenza di segnali CD indotti. La dimensione delle particelle aumenta leggermente con il loading contemporaneo di ETH e Booster. La formulazione acquosa del polimero che carica sia il farmaco che il booster è risultata adatta per l'applicazione di microsprayer.

### Interazione di Clofazimina con carrier basati su SBE- $\beta$ CyD



**Figure 3** Spettri CD di CLZ con quantità crescenti di SBE- $\beta$ CyD

Abbiamo studiato l'inclusione del farmaco CLZ contro la lebbra, totalmente insolubile in acqua, con il monomero sulfobutylether (SBE)- $\beta$ CyD e il polimero *crosslinked* con epicloridrina, SBE-p $\beta$ CyD e i loro analoghi marcati con la rodamina (Rho). I monomeri e i polimeri solubilizzano in modo eccellente un film di CLZ e l'interazione è stata provata anche dai dati di dicroismo circolare (vedi Figura 3).

CLZ non è chirale, ma in seguito alla complessazione con i carrier SBE- $\beta$ CyD, acquisisce un segnale CD indotto che conferma l'interazione di CLZ con SBE- $\beta$ CyD e SBE-p $\beta$ CyD. Siamo riusciti a caricare fino a 0,5 mg / ml di farmaco in p $\beta$ CyD senza l'uso di solvente organico. Con i carrier polimerici abbiamo ottenuto nanoparticelle con un diametro nell'intervallo da 20 a 70 nm. La microfiltrazione non ha causato alcuna perdita di materiale. Abbiamo studiato la massa molare del polimero, la dimensione delle particelle e l'inclusione di CLZ anche utilizzando la tecnica di frazionamento AF4-MALS in collaborazione con il partner privato ByFlow. Il diametro delle nanoparticelle cambia con il caricamento del farmaco: 30,5 nm senza CLZ e 22,3 nm con CLZ. Ciò può essere dovuto alla presenza di CLZ all'interno della nanoparticella polimerica rendendo il campione più compatto in quanto più di un'unità CyD può partecipare alla

complessazione di una singola molecola CLZ. Una simile riduzione della dimensione delle particelle è stata osservata nell'analisi DLS. Abbiamo misurato un valore di massa molare di circa 53 kDa per il polimero. Abbiamo eseguito un esperimento simile per SBE-p $\beta$ CyD marcato con Rho in presenza e assenza di CLZ. Il polimero ha un valore di massa molare simile di 53 kDa. Diversamente, il valore del diametro per le particelle di Rho-SBE-p $\beta$ CyD con CLZ è di 60 nm, maggiore di quello senza CLZ di 50 nm. Quest'ultimo può essere spiegato assumendo che la presenza di Rho, residenti sulla superficie, induce fenomeni di aggregazione tra le particelle. Quando sono presenti sia Rho che CLZ, è probabile che altri fattori svolgano un ruolo come la repulsione elettrostatica tra Rho e CLZ entrambi presenti con carica positiva. I carriers in presenza e assenza di CLZ sono stati testati sulla loro citotossicità e attività battericida. Di grande importanza, il farmaco incluso non è citotossico sulla linea cellulare VERO, usato come modello, fino a 5  $\mu$ M, mentre il farmaco da solo è altamente citotossico. Anche i carrier da soli non sono citotossici nell'intervallo esplorato. Tra i batteri testati i migliori risultati sono stati ottenuti con *S. epidermidis*. Il farmaco ha valori di MIC50 inferiori a 100 nM, simili a quelli del solo CLZ. Lo stesso vale anche per isolati clinici di *S. epidermidis*, alcuni dei quali mostrano MDR. Abbiamo anche eseguito un test *in vitro* di rilascio del farmaco da parte dei carrier CLZ/SBE- $\beta$ CyD attraverso la membrana cellulosa di dialisi (MW tagliato 1600 Da) utilizzando una cella di diffusione di Franz. I risultati ottenuti non sono promettenti in quanto la membrana blocca il farmaco.

### **Loading di Clofazimine in particelle di silice fluorescenti**

Abbiamo studiato particelle di silice mesoporosa fluorescente (MSP) come carrier per CLZ per applicazioni teranostiche. Abbiamo ottenuto MSP con luminescenza intrinseca che non richiedono la marcatura con un fluoroforo. Dimensione delle particelle, porosità, loading di farmaco e caratteristiche fotofisiche di MSP sono state accuratamente studiate. L'aminofunzionalizzazione seguita dalla calcinazione fino a 400 ° C ha portato alla formazione di MSP fluorescenti probabilmente dovute a particelle di carbonio formati nei pori. Sospensioni di MSP fluorescenti, caricate e non con CLZ, sono state eccitate a diverse lunghezze d'onda. Gli spettri di fluorescenza si spostano verso il rosso con l'aumentare della lunghezza d'onda di eccitazione supportando l'ipotesi di particelle di carbonio all'interno delle MSP. È interessante notare che gli spettri di assorbimento e fluorescenza delle MSP cadono nel range della luce visibile, aspetto interessante per applicazioni teranostiche.

Durante un soggiorno presso due partner svedesi del progetto, la Nanologica e l'Università di Göteborg, sono state ulteriormente esplorate le MSP fluorescenti con e senza CLZ. Presso la Nanologica, il lavoro si è concentrato sul loading di CLZ in MSP di dimensioni diverse e sulla loro

caratterizzazione. Queste particelle con CLZ sono state ulteriormente caricate in film e microcapsule di chitosan per studi di rilascio di farmaci utilizzando una membrana di dialisi di cellulosa (MW tagliata 1600 Da) montata in una cella di diffusione di Franz che non ha dato risultati soddisfacenti.

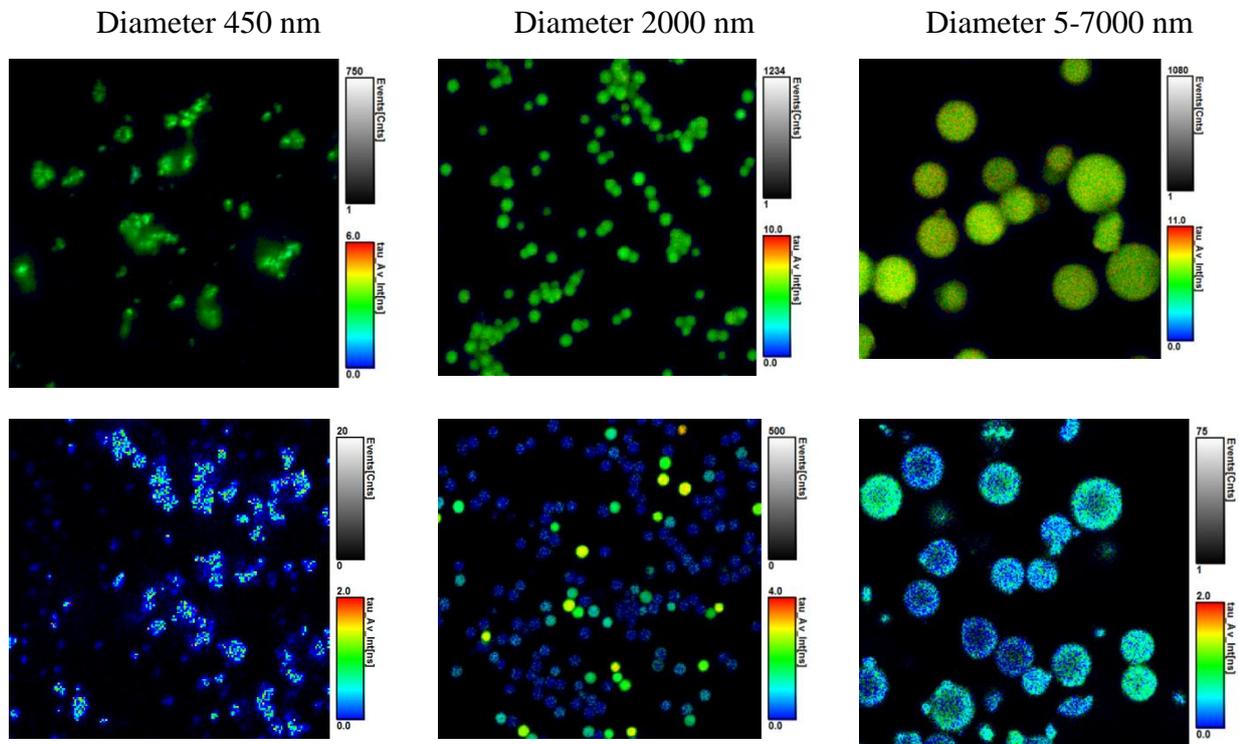


Figure 4: FLIM images: (top) unloaded fluorescent MSPs , decay collected in the 500-550 nm range exciting at 405 nm; (middle) CLZ loaded MSPs, decay collected in the 565-605 nm range exciting at 485 nm; (bottom)

presso l'Università di Göteborg è stato condotto uno studio sulla penetrazione di MSP di dimensioni diverse nella pelle umana monitorata mediante microscopia a fluorescenza a eccitazione bifotonica. Si è visto che tutte le particelle aderiscono ai corneociti dello strato corneo e che le particelle più piccole di 450 nm possono penetrare nei solchi dello strato corneo mentre le particelle più grandi risiedono più superficialmente sulla pelle.

In conclusione, la mia attività di ricerca di dottorato ha avuto successo nel realizzare nuovi sistemi basati su nanomateriali con il potenziale di stimolare l'innovazione nel campo del rilascio di farmaci noti.