

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901984300A1

Publication Date

20130404

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Title

NANOCAPSULA COMPRENDENTE UNA MEMBRANA DI CICLODESTRINE E
SUO USO.

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"MEMBRANA PER NANOCAPSULA, NANOCAPSULA COMPRENDENTE LA
STESSA E SUO USO"

di UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

di nazionalità italiana

con sede: VIA VERDI, 8

TORINO (TO)

Inventori: CAVALLI Roberta, LEMBO David, CIVRA Andrea,
DONALISIO Manuela, TROTTA Michele

* * *

La presente invenzione è relativa ad una membrana per nanocapsula e ad una nanocapsula comprendente la stessa per la veicolazione di farmaci lipofili.

Il successo di una terapia è legato alla correttezza della diagnosi e della scelta del farmaco. L'entità delle risposte ad un farmaco è funzione della sua concentrazione sul sito d'azione: un dosaggio troppo basso produrrà risposte inadeguate, mentre con uno troppo alto l'entità degli effetti indesiderati potrà essere tale da vanificare l'effetto della terapia. Solo tra questi due limiti (che definiscono la finestra terapeutica) l'intervento farmacologico è corretto. Il rapporto tra la concentrazione che dà luogo ad effetti tossici e la concentrazione efficace è definito indice terapeutico: più alto è l'indice

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

terapeutico, più maneggevole è il farmaco.

A tal fine negli anni sono state studiate numerose soluzioni che permettano la veicolazione del farmaco al sito bersaglio mantenendo la sua concentrazione entro i limiti dell'efficacia e allo stesso tempo cercando di ridurre al minimo gli effetti collaterali eventualmente associati all'utilizzo del farmaco stesso.

Un esempio di farmaco che trova numerose applicazioni terapeutiche ma presenta anche elevati effetti collaterali è l'Amfotericina B.

L'Amfotericina B ha un'azione fungicida molto rapida contro la *Candida albicans* e per molti anni è stato il farmaco di prima scelta per il trattamento di gravi infezioni sistemiche provocate da *Candida albicans* e da altri funghi. L'Amfotericina B è anche utilizzata come farmaco alternativo per il trattamento sintomatico della cistite, della pielonefrite, dell'osteomielite, dell'artrite settica e dell'endocardite provocate dalla *Candida*.

L'uso clinico di Amfotericina B è ostacolato dalla nefrotossicità dose-limitante e da altri effetti collaterali correlati all'infusione come febbre, brividi, cefalea, nausea e vomito. Si pensa inoltre che l'Amfotericina B possa legare il colesterolo, un importante componente delle membrane cellulari dei mammiferi, portando

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

ad un aumento di permeabilità della membrana e a conseguenti danni cellulari.

La sua formulazione clinica convenzionale è costituita da una sospensione micellare di Amfotericina B con un sale biliare, il sodio desossicolato, il cui nome commerciale è Fungizone. A causa del suo scarso assorbimento orale, l'Amfotericina B è somministrata principalmente per via endovenosa o via inalatoria. Il farmaco è scarsamente solubile in acqua e presenta un'alta percentuale di legame con le proteine plasmatiche con un'emivita di circa 10 - 24 ore. Il farmaco raggiunge concentrazioni elevate negli organi solidi (fegato, milza, reni e polmoni) mentre nell'occhio raggiunge concentrazioni più elevate nell'umor acqueo piuttosto che in quello vitreo. L'Amfotericina B non attraversa efficacemente la barriera ematoencefalica anche in presenza di infiammazione e la sua concentrazione nel tessuto cerebrale e nel liquido cerebrospinale è bassa.

Ad oggi sono state sviluppate diverse formulazioni lipidiche di Amfotericina nel tentativo di ridurre gli effetti tossici sistemici del farmaco soprattutto a carico dei reni. Questi includono una dispersione colloidale di Amfotericina B (ABCD, Amfotericina B Colloidal Dispersion), un complesso lipidico di AmB (ABLC Amfotericin B Lipid Complex) e Amfotericina B liposomale (L-AmB o AmBisome).

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Tuttavia, le formulazioni lipidiche attualmente in uso in ambito clinico, come l'AmBisome, l'Amphocil o l'Abelcet pur essendo meno tossiche richiedono somministrazioni ad alte dosi di Amfotericina B, un processo di sintesi altamente complesso, e conseguentemente, costi di preparazione elevati. In particolare, l'AmBisome porta ad una minore tossicità renale ma può dare epatotossicità ad alte dosi.

Pertanto, è sentita nell'arte la necessità di sviluppare formulazioni alternative per la veicolazione di farmaci come l'Amfotericina B volte a migliorarne la tossicità, l'efficacia terapeutica ed il profilo farmacocinetico.

Scopo della presente invenzione è pertanto quello di fornire una formulazione farmaceutica per la veicolazione di farmaci che ne aumenti l'efficacia terapeutica riducendone gli effetti collaterali.

Tale scopo è raggiunto dalla presente invenzione, in quanto relativa ad una membrana per nanocapsula secondo la rivendicazione 1 ad una nanocapsula secondo la rivendicazione 8 al suo uso secondo la rivendicazione 16 ed ad una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 18.

Definizioni

A meno che non sia specificato esplicitamente il

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

contrario, i seguenti termini presentano il significato indicato qui sotto.

Nel presente testo per "nanocapsula" si intende una particella formata da aggregati atomici o molecolari con un diametro compreso indicativamente fra i 2 e i 500 nm, di forma sostanzialmente sferica composta da una membrana o involucro e da una cavità, all'interno della quale si possono collocare le sostanze desiderate, come ad esempio farmaci in forma liquida, solida o come dispersione molecolare.

Nel presente testo per "alchile" si intende una catena alifatica satura (vale a dire un gruppo alifatico privo di doppi o tripli legami carbonio-carbonio) lineare o ramificata. Esempi non limitativi di alchili sono: n-propil, t-butil, esil e octile

Nel presente testo, per "alchile sostituito" si intende un gruppo alchilico legato ad almeno un sostituyente, il quale è vantaggiosamente scelto nel gruppo consistente di: alogeno, idrossi, alcossi C_1-C_4 , aromatico, nitro, ciano, alchilcarbossi C_1-C_4 , alcanoil C_1-C_4 .

Nel presente testo per "concentrazione molare", "concentrazione M", "molarità", "M" si intende il rapporto tra il numero di moli di un composto ed il volume, in particolare i litri, di un solvente, in particolare acqua, senza che ciò implichi che il composto sia disciolto nel

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

solvente.

Nel presente testo per "concentrazione normale", "concentrazione N", "normalità", "N" si intende il rapporto tra il numero di equivalenti di un soluto ed il volume, in particolare i litri, di un solvente, in particolare acqua, senza che ciò implichi che il composto sia disciolto nel solvente.

Breve descrizione delle Figure

Per una migliore comprensione della presente innovazione, essa verrà nel seguito descritta anche con riferimento alle figure allegate, che illustrano quanto segue:

- la Figura 1 illustra la retta di taratura di amfotericina in metanolo utilizzata per determinare la quantità di farmaco presente nelle nanocapsule;

- la Figura 2 illustra la retta di taratura in acqua acida a pH = 5,5 per lo studio della cinetica di rilascio in vitro a questo pH;

- la Figura 3 illustra la retta di taratura in acqua acida a pH = 7,4 per lo studio della cinetica di rilascio in vitro a questo pH;

- la Figura 4 illustra la retta di rilascio dell'Amfotericina B dalle nanocapsule dell'invenzione a pH 5,5;

- la Figura 5 illustra la retta di rilascio

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

dell'Amfotericina B dalle nanocapsule dell'invenzione a pH 7,4;

- la Figura 6 illustra il confronto del rilascio dell'Amfotericina B dalle nanocapsule dell'invenzione a pH 5,5 e 7,4.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Secondo un primo aspetto dell'invenzione viene fornita una membrana per nanocapsula per incapsulare un agente terapeutico. Tale membrana comprende molecole anfifiliche costituite da una testa idrofila ed una coda lipofila.

In particolare, la testa idrofila è selezionata nel gruppo costituito da ciclodestrine naturali e loro derivati, più in particolare beta-ciclodestrina, gamma-ciclodestrina e 6-desossi-6-mercapto-beta-ciclodestrina.

La coda lipofila è selezionata nel gruppo costituito un residuo alchilcarbonilico lineare o ramificato comprendente almeno 8 atomi di carbonio, da una catena polimerica poliestere, da una catena polimerica polianidride e da una catena polimerica dell'acriloilmorfolina.

In particolare, la coda lipofila può essere un residuo alchilcarbonilico lineare o ramificato comprendente da 10 a 22 atomi di carbonio, più in particolare un residuo dodecilcarbonilico.

Alternativamente la coda lipofila può essere una

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

catena polimerica lipofila selezionata nel gruppo costituito da poli(4-acriloilmorfolina), polilattati o poliglicolattati.

Le teste ciclodestriniche sono legate alle code lipofile attraverso i residui ossidrilici o eventuali loro derivati delle ciclodestrine, come ad esempio un derivato tiolico, mediante un legame covalente.

In una prima forma di realizzazione dell'invenzione la membrana comprende molecole anfifiliche in cui la testa idrofila è 6-desossi-6 mercapto-beta-ciclodestrina (β -CD-SH) e la coda lipofila è poli(4-acriloilmorfolina) (PACM).

In una seconda forma di realizzazione dell'invenzione la membrana comprende molecole anfifiliche in cui la testa idrofila è gamma-ciclodestrina e la coda lipofila è un residuo dodecilcarbonilico.

Secondo un secondo aspetto dell'invenzione viene fornita una nanocapsula comprendente una membrana come sopra descritta. In particolare, la membrana delimita al suo interno una cavità nella quale può essere incapsulato un agente terapeutico, preferibilmente un farmaco lipofilo.

Tale agente terapeutico in particolare è Amfotericina B.

L'agente terapeutico può essere disciolto in un solvente opportuno, preferibilmente selezionato nel gruppo costituito da trigliceridi, mono-digliceridi, esteri,

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

siliconi, perfluorocarburi o loro miscele più preferibilmente trigliceridi o loro miscele.

Secondo una forma di realizzazione dell'invenzione la nanocapsula comprende una membrana in cui la testa idrofila è una gamma ciclodestrina, la coda lipofila è un residuo dodecilcarbonilico e l'agente terapeutico è Amfotericina B disciolta in una miscela di trigliceridi dell'acido caprilico e dell'acido caprico.

Secondo una ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione la nanocapsula comprende una membrana in cui la testa idrofila è 6-desossi-6-mercapto-beta-ciclodestrina, la coda lipofila è poli(4-acriloilmorfolina) e l'agente terapeutico è Amfotericina B disciolta in una miscela di trigliceridi dell'acido caprilico e dell'acido caprico.

Le nanocapsule dell'invenzione contenenti amfotericina B possono essere utilizzate nel trattamento di una patologia associata ad infezioni fungine sistemiche in particolare selezionata nel gruppo costituito da infezioni fungine in pazienti neutropenici, meningite da *Criptococco* in pazienti infettati da HIV, infezioni da *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. refrattarie al trattamento con Amfotericina B deossicolato, leishmaniosi viscerale.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione viene fornita una composizione farmaceutica comprendente nano capsule come sopra descritte ed un eccipiente farmacologicamente accettabile.

Ulteriori caratteristiche della presente invenzione risulteranno dalla descrizione che segue di alcuni esempi meramente illustrativi e non limitativi. Le seguenti abbreviazioni sono usate nel seguito negli esempi sotto riportati: h (ora), g (grammi), mg (milligrammi), mmol (millimole), mL (millilitro), MHz (megahertz), Hz (hertz), p.fus. (punto di fusione), Rf (Ratio frontis), UV (ultravioletto), NMR (Risonanza Magnetica Nucleare), MS (Spettroscopia di Massa), Me (metile), MeI (ioduro di metile), KOH (idrossido di potassio), HCl (acido cloridico), DMSO (dimetilsolfossido), CH₂Cl₂ (cloruro di metilene), Na₂SO₄ (solfato di sodio), CDCl₃ (cloroformio deuteriato), Et₃N (triethylammina), THF (tetraidrofurano), DME (dimetiletere), Et₂O (dietiletere), NH₄Cl (cloruro di ammonio), NaCl (cloruro di sodio), K₂CO₃ (carbonato di potassio), CH₃CN (Acetonitrile), NBS (N-bromosuccinimide), H₂O (acqua), EtOAc (acetato di etile).

Esempi

Esempio 1

Preparazione di molecole anfifiliche in cui la testa

idrofila è 6-desossi-6-mercapto-beta-ciclodestrina (β -CD-SH) e la coda lipofila è poli(4-acriloilmorfolina) (PACM) (LED132)

La 6-desossi-6-mercapto- β -ciclodestrina (β -CD-SH) è preparata ed utilizzata come agente di trasferimento di catena nella polimerizzazione radicale della 4-acriloilmorfolina (Sigma, Aldrich, distillata prima dell'uso, bp 158°C at 50 mmHg). Il rapporto peso/peso β -CD/PACM è 32,7 ed il numero molecolare medio ed il peso molecolare medio sono rispettivamente 7860 e 13500.

Esempio 2

Attività emolitica e citotossicità della molecola anfifilica dell'esempio 1

La determinazione dell'attività emolitica del polimero è stata eseguita tramite metodo spettrofotometrico.

2 ml di sangue sono stati diluiti con 8 ml di tampone fosfato a pH 7,4.

In una serie di provette sono state introdotte quantità crescenti di LED132, da 1 a 15 mg, solubilizzate in 500 μ l di tampone fosfato con l'aggiunta di 1 ml di sangue precedentemente diluito.

Le provette vengono lasciate per 90 minuti a 37 °C sotto incubazione. Al termine dei 90 minuti si centrifuga a 2000 rpm per 5 minuti.

Vengono prelevati 500 μ l di surnatante e diluiti con

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

2,5 ml di tampone fosfato a pH 7,4.

Questi vengono sottoposti ad analisi UV-vis a 543 nm e viene calcolata la percentuale di emolisi.

La percentuale di emolisi è calcolata dall'assorbanza dovuta alla presenza di emoglobina nel surnatante.

Come bianco viene utilizzato sangue diluito in tampone fosfato mentre come riferimento del 100 % di emolisi viene utilizzato sangue con tampone fosfato e un eccesso di cloruro d'ammonio.

La molecola non ha mostrato attività emolitica. Si è riscontrata un'assenza di emolisi e nessuna modificazione morfologica dei globuli rossi. Da questi risultati si evidenzia che la molecola è biocompatibile.

Esempio 3

Preparazione della nanocapsula incapsulante
Amfotericina B ottenuta con la molecola anfifilica
dell'esempio 1

Si prepara una fase organica solubilizzando in etanolo assoluto 2 ml l'Amfotericina (principio attivo circa 2 mg) a cui si addiziona il Miglyol 220 microlitri (olio) (Myritol 318) e LED132 (30-35 mg). La fase acquosa è una soluzione acquosa di 1 % Tween 80.

La solubilizzazione dei vari componenti viene facilitata dall'agitazione continua per 30 minuti.

Una volta solubilizzate le due fasi si fa gocciolare,

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

sotto agitazione, la fase organica nella fase acquosa.

Si nota subito un rapido intorbidimento dovuto alla formazione delle nanocapsule.

La preparazione viene lasciata sotto continua agitazione per 24 ore lontano da fonti luminose (per via della fotosensibilità dell'Amfotericina) per l'evaporazione dell'etanolo.

Per proteggerla in modo adeguato, il beker utilizzato è stato completamente rivestito con carta stagnola per proteggere la preparazione dalle radiazioni luminose.

Nelle nanocapsule l'Amfotericina si troverà disciolta in miglyol che costituisce un nucleo interno delimitato da una membrana di LED132.

Al termine delle 24 ore si sospende l'agitazione. La formulazione è centrifugata a 1000 rpm per 2 minuti per separare l'Amfotericina rimasta libera da quella incapsulata.

Dopo la centrifugazione si preleva il surnatante (la sospensione di nanocapsule) e si procede alla caratterizzazione.

Esempio 4

Preparazione di molecole anfifiliche in cui la testa idrofila è gamma-ciclodestrina (γ -CD) e la coda lipofila è dodecilsolfato (NC12C)

In un pallone vengono miscelati l'alcool (ES, C12) e

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

il diimidazoilchetone in rapporto molare 1:1.5 usando come solvente diclorometano privo di alcool. La miscela è lasciata sotto agitazione per due ore.

Si trasferisce in un imbuto separatore. Si eseguono tre lavaggi con acqua distillata. La fase organica è trasferita in una beuta, anidrificata con solfato di sodio anidro. Quindi si filtra e si concentra la fase organica mediante Rotavapor ottenendo l'imidazoil derivato dell'alcool (Prodotto 1). Contemporaneamente la gamma ciclodestrina viene essiccata in stufa fino a peso costante, si prepara il bagno di silicone a 80 C. In un pallone si pesa la gamma ciclodestrina, essiccata, il Prodotto 1 in rapporto molare 1:3, e piridina anidrificata in quantità da anidrificare la gamma ciclodestrina. Si riscalda a ricadere per 3 ore, quindi si filtra e si concentra al Rotavapor. Si aggiunge etere di etilico e si lascia riposare per una notte. Quindi si filtra e si recupera l'alchilcarbonato sul filtro stesso che viene lavato con etanolo.

Esempio 5

Saggio emolitico della molecola anfifilica
dell'esempio 4

La determinazione dell'attività emolitica è stata eseguita tramite metodo spettrofotometrico.

Ad una serie di provette contenenti 1 ml di sangue

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

sono state addizionate quantità crescenti di NC12C, da 2,5 a 20 mg.

Le provette vengono lasciate ad incubare a 37 °C per 90 minuti. Al termine dei 90 minuti si centrifuga a 3000 rpm per 10 minuti.

Si prelevano 250 µl di surnatante e si diluiscono con 2,5 ml di tampone fosfato a pH 7,4.

Si analizzano i campioni allo spettrofotometro a 543 nm e viene calcolata la percentuale di emolisi.

Come bianco viene utilizzato sangue diluito in tampone fosfato mentre come riferimento del 100 % di emolisi viene utilizzato sangue con tampone fosfato e un eccesso di cloruro d'ammonio.

La molecola non ha mostrato attività emolitica. Si è riscontrata un'assenza di emolisi e nessuna modificazione morfologica dei globuli rossi. Da questi risultati si evidenzia che la molecola è biocompatibile.

Esempio 6

Preparazione delle nanocapsule incapsulanti Amfotericina B ottenuta con la molecola anfifilica dell'esempio 4

Le nanocapsule di NC12C sono preparate seguendo la procedura illustrata nell'esempio 3.

Esempio 7

Saggio emolitico sulle nanocapsule degli esempi 3 e 6

La determinazione dell'attività emolitica è stata eseguita tramite metodo spettrofotometrico.

2 ml di sangue umano sono stati diluiti con 8 ml di tampone fosfato a pH 7,4.

In una serie di provette sono state introdotte quantità crescenti di nanocapsule ottenute mediante le procedure degli esempi 3 e 6, da 1 a 15 mg, solubilizzate in 500 µl di tampone fosfato con l'aggiunta di 1 ml di sangue precedentemente diluito.

Le provette vengono lasciate per 90 minuti a 37 °C sotto incubazione. Al termine dei 90 minuti si centrifuga a 2000 rpm per 5 minuti.

Vengono prelevati 500 µl di surnatante e diluiti con 2,5 ml di tampone fosfato a pH 7,4.

Questi vengono sottoposti ad analisi UV-vis a 543 nm e viene calcolata la percentuale di emolisi.

La percentuale di emolisi è calcolata dall'assorbanza dovuta alla presenza di emoglobina nel surnatante.

Come bianco viene utilizzato sangue diluito in tampone fosfato mentre come riferimento del 100 % di emolisi viene utilizzato sangue con tampone fosfato e un eccesso di cloruro d'ammonio.

Entrambe le formulazioni non hanno mostrato attività emolitica.

In tutte e due i casi si è riscontrata un'assenza di

emolisi e nessuna modificazione morfologica dei globuli rossi. Da questi risultati si evidenzia che le formulazioni sono biocompatibili.

Esempio 8

Determinazione quantitativa del efficienza di incapsulazione di Amfotericina B mediante analisi spettrofotometrica sulle nanocapsule degli esempi 3 e 6

Sono state eseguite diverse curve di calibrazione per poter determinare la cinetica di rilascio del principio attivo dalle nanocapsule ottenute come illustrato negli esempi 3 e 6 a diversi valori di pH.

- Retta di taratura dell'Amfotericina

Sono state preparate tre diverse rette di taratura :

- Amfotericina in metanolo
- Amfotericina in acqua filtrata a pH 5,5
- Amfotericina in tampone fosfato a pH 7,4

La retta di taratura è stata costruita tramite analisi UV-Vis utilizzando uno spettrofotometro Beckman Coulter DU[®] 730.

Lo spettro è dovuto alla presenza di una porzione cromofora all'interno della struttura dell'Amfotericina (i 7 doppi legami coniugati).

In tutti e tre i casi è stata preparata una soluzione madre a concentrazione nota di Amfotericina esattamente pesata e solubilizzata in DMSO.

Da queste vengono preparate 6 soluzioni standard con opportune diluizioni di Amfotericina B rispettivamente in metanolo, acqua filtrata pH 5,5 e tampone fosfato a pH 7,4.

Una volta preparati gli standard questi vengono analizzati allo spettrofotometro tramite analisi con scansione (per visionare l'intero spettro).

É stata costruita la retta di taratura Assorbanza (A) in funzione della concentrazione (ppm).

- *Retta di taratura in metanolo*

É stata preparata una soluzione madre in DMSO con una concentrazione di 50 ppm.

Da questa sono stati preparati gli standard effettuando le seguenti diluizioni:

- 500 µl di madre sono stati portati a 5 ml con metanolo: 5 ppm
- 375 µl di madre sono stati portati a 5 ml con metanolo: 3,75 ppm
- 250 µl di madre sono stati portati a 5 ml con metanolo: 2,5 ppm
- 250 µl di madre sono stati portati a 10 ml con metanolo: 1,25 ppm
- 100 µl di madre sono stati portati a 10 ml con metanolo: 0,50 ppm
- 50 µl di madre sono stati portati a 10 ml con metanolo: 0,25 ppm

I sei standard sono stati analizzati allo spettrofotometro e ne è stata misurata l'Assorbanza a 406 nm .

È stata costruita la retta di taratura Assorbanza in funzione della concentrazione espressa in ppm.

Nella tabella di seguito riportata sono indicati i valori di Assorbanza e le rispettive concentrazioni espresse in ppm utilizzate per il calcolo della retta di taratura in metanolo (riportata in Figura 1).

ppm	Assorbanza
0,00	0,000
0,25	0,048
0,50	0,087
1,25	0,191
2,50	0,377
3,75	0,552
5,00	0,734

L'analisi è stata condotta allo spettrofotometro tenendo come riferimento il picco a 406 nm.

Gli standard sono stati preparati ad una concentrazione tale da avere valori di assorbanza inferiori a 1 (prima di effettuare le diluizioni è stata misurata l'assorbanza della madre). Dal grafico illustrato in Figura 1 si può osservare una buona linearità con un coefficiente di determinazione (R^2) pari a 1.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

- Retta di taratura in acqua acida pH 5,5

L'acqua acida è stata preparata portando a pH 5,5 100 ml di Acqua filtrata MilliQ con acido cloridrico 0,1 M.

È stata preparata una soluzione madre in DMSO con una concentrazione di 76 ppm.

Da questa sono stati preparati gli standard effettuando le seguenti diluizioni:

- 7,9 ml di soluzione madre sono stati portati a 10 ml con acqua acida: 60 ppm

- 2,5 ml di soluzione madre sono stati portati a 5 ml con acqua acida: 38 ppm

- 1 ml di soluzione madre sono stati portati a 5 ml con acqua acida: 15,2 ppm

- 1 ml di soluzione madre sono stati portati a 10 ml con acqua acida: 7,6 ppm

I quattro standard sono stati analizzati allo spettrofotometro e ne è stata misurata l'Assorbanza a 395 nm.

È stata costruita la retta di taratura Assorbanza in funzione della concentrazione espressa in ppm.

Nella tabella di seguito riportata sono indicati i valori di Assorbanza e le rispettive concentrazioni espresse in ppm utilizzate per il calcolo della retta di taratura in acqua acida pH 5,5.

ppm	Assorbanza
-----	------------

0,00	0,000
7,60	0,128
15,20	0,234
38,00	0,582
60,00	0,905

La retta è stata preparata tramite analisi allo spettrofotometro prendendo come riferimento il picco a 395 nm. La retta di taratura ottenuta è riportata in Figura 2.

- *Retta di taratura in tampone fosfato pH 7,4*

Il tampone fosfato è stato preparato secondo Farmacopea.

250 ml di potassio fosfato monobasico 0,2 M vengono aggiunti a 393,4 ml di NaOH 0,1 M. Nel nostro caso sono stati preparati 100 ml apportando le necessarie diluizioni.

È stata preparata una soluzione madre in DMSO con una concentrazione di 300 ppm.

Da questa sono stati preparati gli standard effettuando le seguenti diluizioni:

- 1 ml di madre sono stati portati a 10 ml con tampone fosfato pH 7,4: 30 ppm
- 500 µl di madre sono stati portati a 10 ml con tampone fosfato pH 7,4: 15 ppm
- 250 µl di madre sono stati portati a 10 ml con tampone fosfato pH 7,4: 7,5 ppm
- 100 µl di madre sono stati portati a 10 ml con

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

tampone fosfato pH 7,4: 3 ppm

I quattro standard sono stati analizzati allo spettrofotometro e ne è stata misurata l'Assorbanza a 409 nm.

È stata costruita la retta di taratura Assorbanza in funzione della concentrazione espressa in ppm.

Nella tabella di seguito riportata sono indicati i valori di Assorbanza e le rispettive concentrazioni espresse in ppm utilizzate per il calcolo della retta di taratura in tampone fosfato pH 7,4.

ppm	Assorbanza
0	0
30	0.769
15	0.379
7.5	0.185
3	0.08

La retta è stata preparata tramite analisi allo spettrofotometro prendendo come riferimento il picco a 409 nm. La retta di taratura ottenuta è riportata in Figura 3.

- Determinazione dell'efficienza di incapsulazione

La determinazione della quantità di Amfotericina incapsulata è stata effettuata tramite analisi UV-visibile.

1 ml delle nanocapsule preparate secondo quanto illustrato negli esempi 3 e 6 viene diluito 1:10 V/V con metanolo (per aprire le nanocapsule).

La soluzione preparata viene agitata al vortex per 5 minuti al riparo da fonti luminose vista la fotosensibilità dell'Amfotericina. Dopo la diluizione la preparazione appare limpida.

Viene infine eseguita analisi spettrofotometrica UV-visibile con metanolo come bianco e si va a determinare la percentuale di incorporazione del farmaco.

Qualora il valore di assorbanza risulti maggiore di 1 verrà effettuata un'ulteriore diluizione.

L'efficienza di incapsulazione dell'Amfotericina nelle nanocapsule è stata calcolata con la formula seguente:

$$\text{Efficienza di incapsulazione} = \frac{\text{Quantità di farmaco nelle nanocapsule}}{\text{Quantità totale di farmaco usata per la preparazione}} \times 100$$

L'analisi viene eseguita in metanolo sfruttando la retta di taratura precedentemente preparata.

Con la retta osservando il valore di assorbanza del campione è facile ricavare la concentrazione di Amfotericina presente tenendo conto delle diluizioni effettuate.

Efficienza di incapsulazione

	Efficienza di incapsulazione
Nanocapsule	49,00%

Esempio 9

Determinazione dimensionale delle nanocapsule ottenute

secondo gli esempi 3 e 6

La misura delle dimensioni delle nanocapsule è stata eseguita con lo strumento 90 Plus Instrument (Brookhaven).

Questo strumento utilizza la tecnica del Dynamic Light Scattering (DSL).

Il DSL è una tecnica non invasiva chiamata anche PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o QELS (Quasi-Elastic Light Scattering) e viene impiegata per la misura della dimensione delle molecole. Consente di misurare, ad esempio, il diametro di proteine, polimeri, liposomi.

Inoltre consente di ottenere una distribuzione dimensionale (nel caso fossero presenti più popolazioni di molecole) e la determinazione di possibili aggregati presenti nella preparazione.

Il campione viene illuminato da un raggio laser e viene misurato la variazione di intensità della luce diffusa dalle particelle in funzione del tempo.

Le variazioni di intensità sono dovute al movimento Browniano delle particelle.

A parità di viscosità e temperatura, le particelle piccole si muoveranno velocemente (creando variazioni rapide dell'intensità di scattering) mentre le particelle più grandi saranno più lente.

Grazie ad un autocorrelatore la velocità delle variazioni di intensità viene misurata e il coefficiente di

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

diffusione è calcolato dalla funzione di correlazione.

Infine l'equazione di Stokes-Einstein converte il coefficiente di diffusione in diametro.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Equazione di Stokes Einstein correla il coefficiente di diffusione (D) con il raggio idrodinamico (R). Gli altri parametri sono K (costante di Boltzmann), T (temperatura), e η (viscosità).

Raddoppiando il raggio idrodinamico si ottiene il valore del diametro.

Caratterizzazione nanocapsule non contenenti farmaco

	Diametro (nm)	Errore standard	Indice di Polidispersione
Nanocapsule	348	6,8	0,07

Il basso valore dell'indice di polidispersione indica una distribuzione omogenea della popolazione di nanoparticelle

Caratterizzazione nanocapsule con Amfotericina

Dimensioni

	Diametro (nm)	Errore standard	Indice di Polidispersione
Nanocapsule	392	6,9	0,07

La presenza di Amfotericina all'interno delle

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

nanocapsule produce un aumento delle dimensioni medie delle nanocapsule indicando la presenza del farmaco all'interno del sistema, mentre non varia l'indice di polidispersione.

Esempio 10

Determinazione della carica superficiale (misura del Potenziale Zeta)

Il Potenziale Zeta è stato misurato utilizzando lo strumento Potenziale Z Plus Instrument (Brookhaven).

Una molecola superficialmente carica produce un movimento di ioni intorno a se stessa provocando un aumento della concentrazione di controioni (ioni di carica opposta alla molecola in esame) intorno alla superficie.

Lo strato liquido intorno alla molecola è diviso in due zone: una zona più interna detta strato di Stern dove gli ioni sono fortemente legati e una seconda zona più esterna detta strato diffuso dove le interazioni sono molto più deboli.

Lo strato Stern più lo strato diffuso vanno a formare un doppio strato elettrico intorno alla molecola.

All'interno dello strato diffuso è presente un limite teorico nel quale il movimento delle molecole è accompagnato dal movimento degli ioni (questo confine è detto slipping plane). Fuori da questo confine gli ioni non seguono il movimento della molecola.

Il potenziale in questa zona corrisponde al Potenziale

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

zeta.

Un valore elevato del Potenziale Zeta è indice di elevata stabilità e ci dice che prevalgono le forze repulsive; viceversa valori molto bassi sono indice di poca stabilità e indicano una tendenza da parte delle molecole ad aggregarsi.

Valori medi di Potenziale Z

	Conduttanza (μS)	Potenziale Z (mV)	Errore standard
Nanocapsule bianche	231	-15,5	1,7

Nanocapsule con Amfotericina

	Conduttanza (μS)	Potenziale Z (mV)	Errore standard
Nanocapsule	210	-14,16	1,7

La carica negativa indica la presenza dei residui ciclodestrinici all'esterno della nanocapsula.

Esempio 11

Determinazione della stabilità nel tempo

Una volta preparate, le nanocapsule sono state controllate nel tempo monitorando determinati parametri come il pH, le dimensioni, la % di incapsulazione, il Potenziale Zeta, e durante ogni controllo sono state visualizzate al microscopio.

Inoltre sono state effettuate prove di stabilità in plasma e in tampone fosfato.

1 ml di nanocapsule viene diluito, in matraccio da 10 ml, con tampone fosfato a pH 7,4 viene lasciato incubare per 3 e per 6 ore.

Al termine dei due intervalli le nanocapsule vengono visionate al microscopio ottico e vengono caratterizzate misurando le dimensioni e la carica superficiale.

Per la prova in plasma, invece, è stato precedentemente diluito il plasma in tampone fosfato a pH 7,4 (diluizione 1 : 5 V/V).

La variazione delle dimensioni delle nanocapsule nel tempo a temperatura ambiente è di seguito riportata. I risultati ottenuti sono la media di più valori corrispondenti a diverse analisi.

La stabilità è stata valutata nei 60 giorni successivi alla preparazione.

	Dopo 1 giorno	Dopo 7 giorni	Dopo 14 giorni	Dopo 21 giorni	Dopo 60 giorni
Nanocapsule	392	395	401	405	420

Esempio 12

Studio della cinetica di rilascio in vitro

Per determinare la cinetica di rilascio delle nanocapsule è stato utilizzato il metodo delle celle rotanti.

Questo sistema è costituito da un sistema multicompartimentale formato da due dischi di plexiglass ciascuno formato da pozzetti circolari.

Tra i pozzetti viene inserita una membrana da dialisi; la membrana utilizzata è stata una membrana da dialisi in cellulosa modificata con un cut-off di 12000-14000 Dalton.

I due dischi vengono fatti combaciare e aderire attraverso una chiusura a vite.

Nei pozzetti dei due dischi vengono introdotti la fase donatrice e la fase ricevente e le 2 due fasi sono appunto separate dalla membrana.

La membrana prima di essere utilizzata viene lasciata per 5 minuti in acqua bollente; questo viene fatto per eliminare il conservante così da attivarla.

Successivamente la membrana viene tagliata e posta tra i due pozzetti in modo che la parte interna della membrana sia a contatto con la fase donatrice.

Infine vengono riempiti i pozzetti con le due fasi.

Ad ogni prelievo si raccoglie la fase ricevente e si sostituisce con 1 ml di fase ricevente frasca.

L'esperimento è stato eseguito per 48 ore.

Tutti i prelievi vengono tenuti al riparo dalla luce per via della fotosensibilità dell'Amfotericina. I vari prelievi vengono analizzati, insieme alla fase donatrice (per determinare l'Amfotericina non rilasciata), allo

spettrometro UV-visibile e viene costruita la curva di rilascio.

- Determinazione rilascio Amfotericina a pH 5,5

La fase donatrice utilizzata è costituita da 1 ml di nanocapsule di amfotericina mentre la fase ricevente è costituita da 1 ml di acqua filtrata portata a pH 5,5.

Questa è stata preparata portando a pH 5,5 100 ml di acqua filtrata con acido cloridrico 0,1 M. Ad ogni intervallo di prelievo viene prelevata la fase ricevente e viene sostituita con 1 ml di acqua acida.

Tutti i prelievi e la fase donatrice vengono analizzati allo spettrofotometro e i loro valori di assorbanza vengono convertiti in concentrazione grazie alla retta di taratura dell'Amfotericina in acqua acida precedentemente preparata.

In questo modo si va a costruire la curva percentuale di rilascio in funzione del tempo dei singoli prelievi.

La percentuale di rilascio è data dal rapporto tra l'Amfotericina rilasciata nei vari intervalli e l'Amfotericina totale moltiplicato per 100.

- Determinazione rilascio Amfotericina a pH 7,4

La fase donatrice utilizzata è costituita da 1 ml di nanocapsule di Amfotericina mentre la fase ricevente è costituita da 1 ml di tampone fosfato a pH 7,4. Questo è stato preparato secondo Farmacopea.

250 ml di potassio fosfato monobasico 0,2 M vengono aggiunti a 393,4 ml di NaOH 0,1 M.

Sono stati preparati 50 ml effettuando le opportune diluizioni.

Ad ogni intervallo di prelievo viene prelevata la fase ricevente e viene sostituita con 1 ml di tampone fosfato.

Tutti i prelievi e la fase donatrice vengono analizzati allo spettrofotometro e i loro valori di assorbanza vengono convertiti in concentrazione grazie alla retta di taratura dell' Amfotericina in tampone fosfato precedentemente preparata.

In questo modo si costruisce la curva percentuale di rilascio in funzione del tempo.

Come si può notare dalle Figure 4-6, la cinetica di rilascio in vivo dell'Amfotericina B risulta prolungata nel tempo senza nessun tipo di rilascio immediato confermando l'incorporazione dell'Amfotericina nel compartimento centrale delle nanocapsule.

Esempio 13

Efficacia in vitro dell'Amfotericina formulata in nanocapsule secondo gli esempi 3 e 6

- Ceppi di Candida

Il ceppo ATCC 10231 di Candida albicans (acquistato presso l'American Type Culture Collection) è stato utilizzato come ceppo di riferimento nell'ambito dei saggi

di suscettibilità all'amfotericina B. Inoltre, un totale di sette ceppi isolati clinici di *Candida* spp. sono stati utilizzati: tre ceppi di *Candida albicans* (due da emocoltura ed uno da tampone vaginale, denominati rispettivamente 424084, 402766 e 403553, gentilmente forniti dalla Professoressa Dianella Savoia, del Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche dell'Ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano), uno di *Candida glabrata*, uno di *Candida krusei*, uno di *Candida parapsilosis* ed uno di *Candida tropicalis* (rispettivamente identificati dalle sigle UCSC3, UCSC16, UCSC8 e UCSC9, forniti dal Professor Sanguinetti, dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma). Tutte le specie ed i ceppi sopra elencati sono stati coltivati su terreno semisolido Saboureaud dextrose agar (OXOID, Solaar House, 19 Merces Row, Cambridge, CB5 8BZ, UK) ad una temperatura di 37°C e sono stati conservati ad una temperatura di -80°C mediante l'utilizzo di una soluzione crio-preservante con glicerolo (ad una concentrazione finale del 50%), in grado di prevenire il danno cellulare dovuto al congelamento.

- *Saggio di suscettibilità delle Candide all'amfotericina*

Il saggio è stato effettuato eseguendo il protocollo validato dal National Committee for Clinical and Laboratory Standards. In breve, sono state preparate diluizioni di

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Amfotericina B veicolata con nanocapsule di LED132 e NC12C ed Amfotericina B libera, in RPMI 1640 con L-glutamina tamponato a pH 7,4 (PAA, 4061 Pasching, Austria) ad una concentrazione di $2,5\mu\text{M}$ di Amfotericina B; da questa concentrazione, in piastra da 96 pozzetti con fondo a "U", sono state effettuate diluizioni scalari 1:2, in un volume finale di $100\mu\text{l}$, fino a giungere ad una concentrazione finale di $0,0012\mu\text{M}$.

L'inoculo è stato preparato in RPMI, al fine di dispensare in ogni pozzetto 5×10^4 CFU/ml; un ugual volume di inoculo ($100\mu\text{l}$) è stato aggiunto ad ogni pozzetto contenente l'Amfotericina libera o veicolata.

Al fine di discriminare l'effettiva efficacia dell'Amfotericina libera e veicolata, sono stati effettuati esperimenti di controllo trattando le Candide con diluizioni seriali di nanocapsule LED132 e NC12C vuote (ovvero, prive del contenuto di amfotericina).

Le piastre sono state dunque incubate a 35°C per 24, 48 e 72 ore.

A questi tempi è stata valutata la Minima Concentrazione Inibitoria (MIC), definita come la minima concentrazione di farmaco alla quale non è visualizzabile la crescita fungina, e la Minima Concentrazione Fungicida 50 (MFC50), ovvero la concentrazione di farmaco in grado di uccidere il 50% delle Candide. Al fine di rilevare questo

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

ultimo parametro, campioni di *Candida* dai pozzetti trattati con differenti concentrazioni sono stati prelevati, opportunamente diluiti e piastrati su Saboureaud Dextrose Agar, al fine di quantificare le CFU/ml contenute nei pozzetti trattati, e costruire delle curve dose-risposta. Tale operazione è stata effettuata 24, 48 e 72 ore post-trattamento.

In un secondo gruppo di esperimenti, l'efficacia in vitro dell'Amfotericina B formulata in nanocapsule è stata confrontata con quella dell'AmBisome (Gilead), una formulazione liposomale di Amfotericina B comunemente utilizzata in ambito clinico; in questo caso le due formulazioni sono state ricostituite nello stesso momento, ed i saggi di suscettibilità sono stati effettuati subito dopo.

L'efficacia in vitro dell'Amfotericina B incapsulata e dell'AmBisome (conservati entrambi a 4°C) è stata inoltre valutata dopo tre mesi dalla ricostituzione di entrambi, al fine di saggiare la stabilità delle formulazioni.

- *Saggio di suscettibilità del biofilm di C. albicans*

Il saggio di suscettibilità su biofilm è stato effettuato seguendo il protocollo descritto da Ramage e colleghi (Ramage et al., 2001); in breve, una provetta contenente 20ml di YPD brodo (1% p/v di estratto di lievito, 2% p/v di peptone, 2% p/v di destrosio) è stata

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

inoculata con un'ansata di cellule da piastra di Saboureaud Dextrose Agar, ed incubata per tutta la notte a 30°C in agitazione (180 rpm).

Il giorno successivo, le cellule sono state lavate mediante centrifugazione in PBS sterile, e risospese in RPMI 1640 supplementato con L-glutamina e tamponato a pH 7,4.

I biofilm di *C. albicans* (ceppo ATCC 10231) sono stati preparati su piastre da 96 pozzetti con fondo piatto (Orange Scientific) inoculando 100µl di una sospensione di 10⁶ cellule/ml in ogni pozzetto. I pozzetti della dodicesima colonna devono rimanere vuoti, andando a costituire un valore di background durante la seguente quantificazione del biofilm.

La piastra è stata dunque chiusa con l'apposito coperchio, sigillata con parafilm ed incubata a 37°C per 48 ore.

Dopo la formazione del biofilm, il terreno è stato aspirato e le cellule planctoniche o non aderenti sono state rimosse mediante due lavaggi con PBS 1X (100µl per pozzetto).

I biofilm sono stati dunque trattati secondo il seguente protocollo: in primo luogo, sono state preparate diluizioni di Amfotericina B veicolata con nanocapsule LED 132 e NC12C, AmBisome ed Amfotericina B tal quale, in RPMI

1640 ad una concentrazione di $8\mu\text{M}$ di Amfotericina B; in piastra da 96 pozzetti con fondo a "U", sono state effettuate diluizioni scalari 1:2, in un volume finale di $100\mu\text{l}$, fino a giungere ad una concentrazione finale di $0,0078\mu\text{M}$.

Il PBS utilizzato per lavare i pozzetti contenenti i biofilm è stato rimosso ed i composti così diluiti sono stati aggiunti.

La piastra è stata nuovamente sigillata con parafilm ed incubata a 37°C per 48 ore.

L'effetto dei composti sul biofilm di *C. albicans* è stato valutato mediante un saggio metabolico basato sull'uso dei sali di tetrazolio (XTT sodium salt bioreagent, X4626, SIGMA-ALDRICH).

- *Attività inibitoria dell'Amfotericina B incapsulata nei confronti di diverse specie di Candida*

I risultati ottenuti durante la fase di sperimentazione in vitro hanno dimostrato che l'Amfotericina B veicolata con nanocapsule di dodecilcarbonato (NC12C-Amf) (Tabella 1 e 2) o LED132 (Tabella 3 e 4) ha un'efficacia in vitro molto maggiore rispetto al principio attivo tal quale (Amf), nei confronti di tutti i ceppi e le specie in esame; inoltre, l'effetto inibitorio esercitato dall'Amfotericina B formulata in nanocapsule, al contrario dell'Amfotericina B tal quale,

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

risulta essere costante nell'arco di 72 ore. Le nanocapsule di dodecilcarbonato prive del contenuto di Amfotericina B (NC12C) non mostrano effetto inibitorio nei confronti della crescita fungina.

I medesimi risultati sono stati ottenuti confrontando l'efficacia in vitro dell'Amfotericina B veicolata con nanocapsule di dodecilcarbonato(NC12C-Amf) con l'AmBisome (Tabella 5 e 6); deve essere sottolineato infine che l'efficacia in vitro dell'Amfotericina B formulata con nanocapsule, anche dopo tre mesi dalla data di preparazione delle medesime, risulta invariata, mantenendo un'efficacia in vitro superiore di circa 10 volte rispetto a quella dell'AmBisome e dell'Amfotericina B tal quale.

Tabella 1: minime concentrazioni Inibitorie (MIC) ottenute saggiando l'efficacia in vitro dell'Amfotericina B tal quale (Amf), formulata con nanocapsule di dodecilcarbonato (NC12C-Amf) o nanocapsula vuota (NC12C).

	24h			48h			72h		
	Amf	NC12C-Amf	NC12C	Amf	NC12C-Amf	NC12C	Amf	NC12C-Amf	NC12C
C. Albicans ATCC ceppo 10231	0,3	0,02	>1	0,6	0,02	>1	1,2	0,02	>1
C. Albicans Ceppo 402766	0,3	0,02	>1	0,6	0,04	>1	1,2	0,04	>1
C. Albicans Ceppo 424084	0,15	0,02	>1	0,3	0,02	>1	0,6	0,02	>1
C. Albicans Ceppo 403553	0,15	0,02	>1	0,6	0,02	>1	0,6	0,02	>1
C. glabrata				0,15	0,02	>1	0,15	0,02	>1
C. tropicalis	0,15	0,08	>1	0,3	0,04	>1	0,3	0,04	>1
C. parapsilosis	0,3	0,15	>1	1,25	0,15	>1	1,25	0,15	>1
C. krusei	0,08	0,02	>1	0,08	0,02	>1	0,3	0,08	>1
C. glabrata (ceppo resistente)	2	1	>2	2	1	>4	2	1	>4

Tabella 2: Minime concentrazioni fungicide 50 (MFC50) ottenute saggiando l'efficacia in vitro dell'Amfotericina B tal quale (Amf), formulata con nanocapsule di dodecilcarbonato (NC12C-Amf) o nanocapsula vuota (NC12C).

	24h			48h			72h		
	Amf	NC12C-Amf	NC12C	Amf	NC12C-Amf	NC12C	Amf	NC12C-Amf	NC12C
C. Albicans ATCC ceppo 10231	0,3026	0,01553	>1	0,2948	0,02298	>1	0,1006	0,0179	>1
C. Albicans Ceppo 402766	0,02543	0,009819	>1	0,1178	0,01754	>1	0,1031	0,01322	>1
C. Albicans Ceppo 424084	0,03003	0,004482	>1	0,0921	0,001016	>1	0,1477	0,01163	>1
C. Albicans Ceppo 403553	0,1166	0,01486	>1	0,1551	0,005157	>1	0,1735	0,009339	>1
C. glabrata			>1	0,0913	0,01544	>1	0,1009	0,02129	>1
C. tropicalis	0,08965	0,01637	>1	0,1114	0,01501	>1	0,1009	0,0179	>1
C. parapsilosis	0,1601	0,1006	>1	0,314	0,06954	>1	0,3272	0,07831	>1
C. krusei	0,00996	0,02011	>1	0,0673	0,008306	>1	0,4046	0,03686	>1
C. glabrata (ceppo resistente)	1,2	0,4357	1,401	1,131	0,4784	0,943	1,765	0,8636	>4

Tabella 3: Minime concentrazioni inibitorie (MIC) ottenute saggiando l'efficacia in vitro dell'Amfotericina B tal quale (Amf), formulata con nanocapsule LED132 o nanocapsule vuote LED132

	24h			48h			72h		
	Amf	LED132-Amf	LED132	Amf	LED132-Amf	LED132	Amf	LED132-Amf	LED132
C. Albicans Ceppo 402766	0,3	0,02	>1	0,6	0,04	>1	1,2	0,04	>1
C. Albicans Ceppo 424084	0,15	0,02	>1	0,3	0,02	>1	0,6	0,02	>1
C. Albicans Ceppo 403553	0,15	0,02	>1	0,3	0,02	>1	0,6	0,02	>1

Tabella 4: Minime concentrazioni fungicide 50 (MFC50) ottenute saggiando l'efficacia in vitro dell'Amfotericina B tal quale (Amf), formulata con nanocapsule LED132 o nanocapsule vuote LED132

	24h			48h			72h		
	Amf	LED132-Amf	LED132	Amf	LED132-Amf	LED132	Amf	LED132-Amf	LED132
C. Albicans Ceppo 402766	0,02543	0,0052	>1	0,1178	0,0089	>1	0,1031	0,0066	>1
C. Albicans Ceppo 424084	0,03003	0,0066	>1	0,09214	0,0049	>1	0,1477	0,0079	>1
C. Albicans Ceppo 403553	0,1166	0,01	>1	0,1551	0,0066	>1	0,1735	0,0069	>1

- *Attività inibitoria dell'Amfotericina B incapsulata nei confronti del biofilm di Candida albicans*

Data la rilevanza clinica dei biofilm di Candida, l'efficacia dell'Amfotericina B veicolata con nanocapsule di dodecilcarbonato è stata valutata anche nei confronti di cellule sessili (notoriamente più resistenti delle planctoniche), in termini di Minima Concentrazione Inibitoria Sessile in grado di limitare del 50% la crescita del biofilm (SMIC50), utilizzando un ceppo commerciale di Candida albicans (ATCC 10231); i valori ottenuti dimostrano, anche in questo caso, che l'efficacia dell'Amfotericina B formulata in nanocapsule è superiore di 10 volte rispetto al farmaco tal quale e paragonabile a quella dell'AmBisome:

SMIC50 Amfotericina:	0,3129 μM
SMIC50 Amfotericina veicolata con nanocapsula di dodecilcarbonato:	0,05338 μM
SMIC50 Nanocapsule "vuote":	>8 μM
SMIC50 AmBisome:	0,02037 μM

RIVENDICAZIONI

1.- Membrana per nanocapsula per incapsulare un agente terapeutico, detta membrana essendo caratterizzata dal fatto di comprendere molecole anfifiliche costituite da una testa idrofila selezionata nel gruppo costituito da ciclodestrine naturali e loro derivati ed una coda lipofila selezionata nel gruppo costituito da un residuo alchilcarbonilico lineare o ramificato comprendente almeno 8 atomi di carbonio, da una catena polimerica poliestere, da una catena polimerica anidridica e da una catena polimerica dell'acriloilmorfolina.

2.- Membrana secondo la rivendicazione precedente caratterizzata dal fatto che dette ciclodestrine naturali sono beta-ciclodestrine o gamma-ciclodestrine.

3.- Membrana secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti caratterizzata dal fatto che detta coda lipofila è un residuo alchilcarbonilico lineare o ramificato comprendente da 10 a 22 atomi di carbonio.

4.- Membrana secondo la rivendicazione precedente caratterizzata dal fatto che detta coda lipofila è un residuo dodecilcarbonilico.

5.- Membrana secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che detta coda lipofila è una catena polimerica poliestere selezionata nel gruppo costituito da polilattati e poliglicolattati.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

6.- Membrana secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che detta testa idrofila è 6-desossi-6-mercapto-beta-ciclodestrina e detta coda lipofila è poli(4-acriloilmorfolina).

7.- Membrana secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che detta testa idrofila è gamma-ciclodestrina e detta coda lipofila è un residuo dodecilcarbonilico.

8.- Nanocapsula comprendente una membrana secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

9.- Nanocapsula secondo la rivendicazione precedente caratterizzata dal fatto di comprendere inoltre un agente terapeutico.

10.- Nanocapsula secondo la rivendicazione precedente caratterizzata dal fatto che detto agente terapeutico è Amfotericina B.

11.- Nanocapsula secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 10 caratterizzata dal fatto che detto agente terapeutico è disciolto in un solvente opportuno.

12.- Nanocapsula secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata dal fatto che detto solvente è selezionato nel gruppo costituito da trigliceridi, mono-digliceridi, esteri, siliconi, perfluorocarburi o loro miscele.

13.- Nanocapsula secondo la rivendicazione precedente caratterizzata dal fatto che detto solvente è almeno un

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

trigliceride o una miscela di trigliceridi.

14.- Nanocapsula secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 13 caratterizzata dal fatto di comprendere una membrana in cui detta testa idrofila è una gamma-ciclodestrina e detta coda lipofila è un residuo dodecilcarbonilico e l'Amfotericina B è disciolta in una miscela di trigliceridi dell'acido caprilico e dell'acido caprico.

15.- Nanocapsula secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 13 caratterizzata dal fatto di comprendere una membrana in cui detta testa idrofila è una 6-desossi-6-mercapto-beta-ciclodestrina e detta coda lipofila è poli(4-acriloilmorfolina) e l'Amfotericina B è disciolta in una miscela di trigliceridi dell'acido caprilico e dell'acido caprico.

16.- Nanocapsula secondo la rivendicazione 14 o 15 per l'uso nel trattamento di una patologia associata ad infezioni fungine sistemiche.

17.- Nanocapsula secondo la rivendicazione precedente caratterizzata dal fatto che detta patologia associata ad infezioni fungine sistemiche è selezionata nel gruppo costituito da infezioni fungine in pazienti neutropenici, meningite da *Criptococco* in pazienti infettati da HIV, infezioni da *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. refrattarie al trattamento con

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Amfotericina B deossicolato, leishmaniosi viscerale.

18.- Composizione farmaceutica comprendente una nanocapsula secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 15 ed un eccipiente farmacologicamente accettabile.

p.i.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Francesco FIUSSELLO

TITLE: NANOCAPSULE MEMBRANE, NANOCAPSULE COMPRISING THE SAME AND USE THEREOF

CLAIMS

1. A nanocapsule membrane for encapsulating a therapeutic agent, said membrane being characterised by comprising amphiphilic molecules formed by a hydrophilic head selected from the group consisting of natural cyclodextrins and derivatives thereof and a lipophilic tail selected from the group consisting of a linear or branched alkylcarbonyl residue comprising at least 8 carbon atoms, a polymeric polyester chain, an anhydride polymeric chain and an acryloylmorpholine polymeric chain.

2. The membrane according to the preceding claim characterised in that said natural cyclodextrins are beta-cyclodextrins or gamma-cyclodextrins.

3. The membrane according to any of the preceding claims characterised in that said lipophilic tail is a linear or branched alkylcarbonyl residue comprising from 10 to 22 carbon atoms.

4. The membrane according to the preceding claim characterised in that said lipophilic tail is a dodecylcarbonyl residue.

5. The membrane according to claim 1 characterised in that said lipophilic tail is a polyester polymeric chain selected from the group consisting of polylactates and

polyglycolactates.

6. The membrane according to claim 1 characterised in that said hydrophilic head is 6-deoxy-6-mercapto-beta-cyclodextrin and said lipophilic tail is poly(4-acryloylmorpholine).

7. The membrane according to claim 1 characterised in that said hydrophilic head is gamma-cyclodextrin and said lipophilic tail is a dodecylcarbonyl residue.

8. A nanocapsule comprising a membrane according to any of the preceding claims.

9. The nanocapsule according to the preceding claim characterised by also comprising a therapeutic agent.

10. The nanocapsule according to the preceding claim characterised in that said therapeutic agent is Amphotericin B.

11. The nanocapsule according to any of claims 9 to 10 characterised in that said therapeutic agent is dissolved in an appropriate solvent.

12. The nanocapsule according to the preceding claim, characterised in that said solvent is selected from the group consisting of triglycerides, mono-diglycerides, esters, silicones, perfluorocarbons and mixtures thereof.

13. The nanocapsule according to the preceding claim characterised in that said solvent is at least one triglyceride or a mixture of triglycerides.

14. The nanocapsule according to any of claims 8 to 13 characterised by comprising a membrane wherein said hydrophilic head is a gamma-cyclodextrin and said lipophilic tail is a dodecyl carbonyl residue and Amphotericin B is dissolved in a mixture of triglycerides of caprylic acid and of capric acid.

15. The nanocapsule according to any of claims 8 to 13 characterised by comprising a membrane wherein said hydrophilic head is a 6-deoxy-6-mercapto-beta-cyclodextrin and said lipophilic tail is poly(4-acryloylmorpholine) and Amphotericin B is dissolved in a mixture of triglycerides of caprylic acid and of capric acid.

16. The nanocapsule according to claim 14 or 15 for use in the treatment of a disease associated to systemic fungal infection.

17. The nanocapsule according to the preceding claim characterised in that said disease associated to systemic fungal infections is selected from the group consisting of fungal infections in neutropenic patients, *Cryptococcus meningitis* in HIV infected patients, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. infections refractory to treatment with Amphotericin B deoxycolate, visceral leishmaniasis.

18. The pharmaceutical composition comprising a nanocapsule according to any of claims 8 to 15 and an acceptable pharmacological excipient.

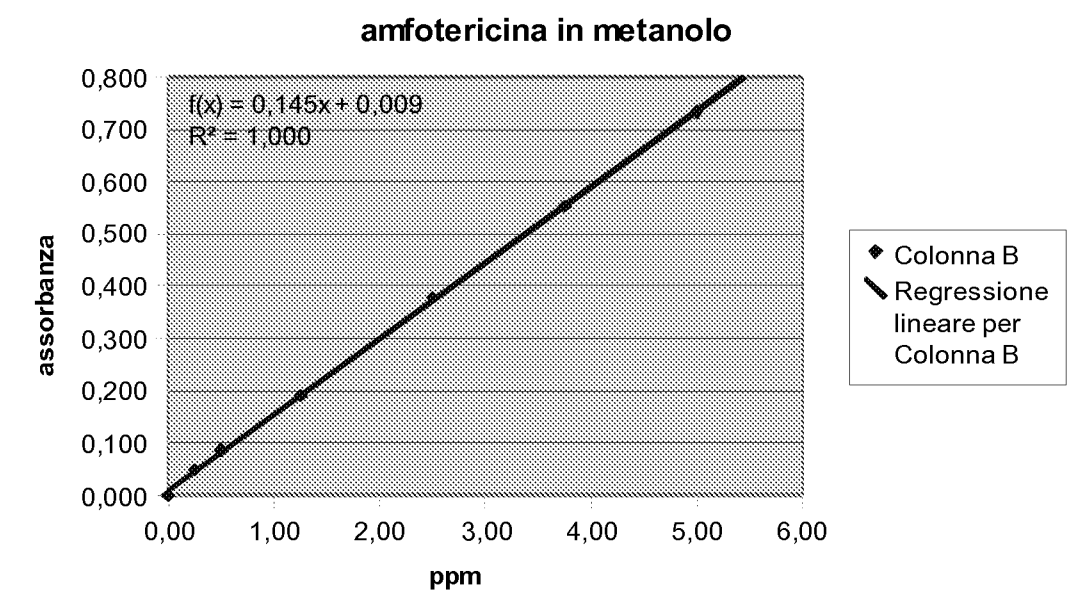


FIGURA 1

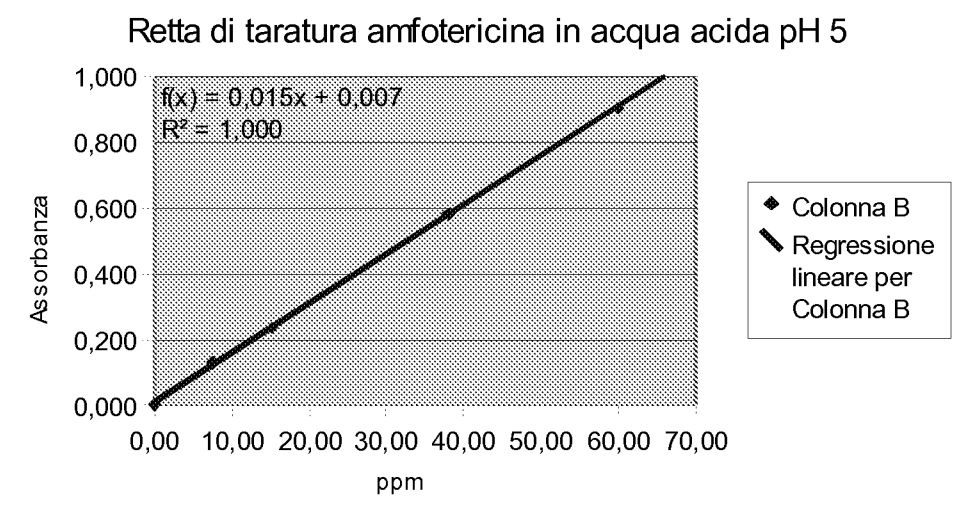


FIGURA 2

p.i.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Retta di taratura Anfotericina in tampone fosfato pH 7,4

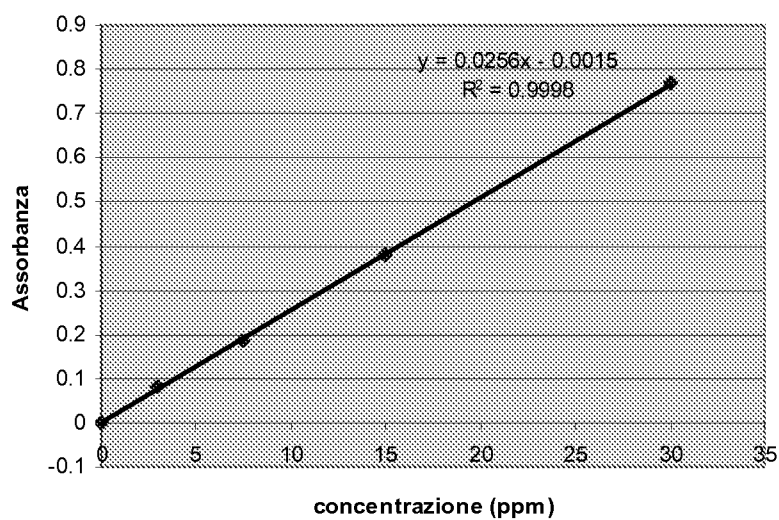


FIGURA 3

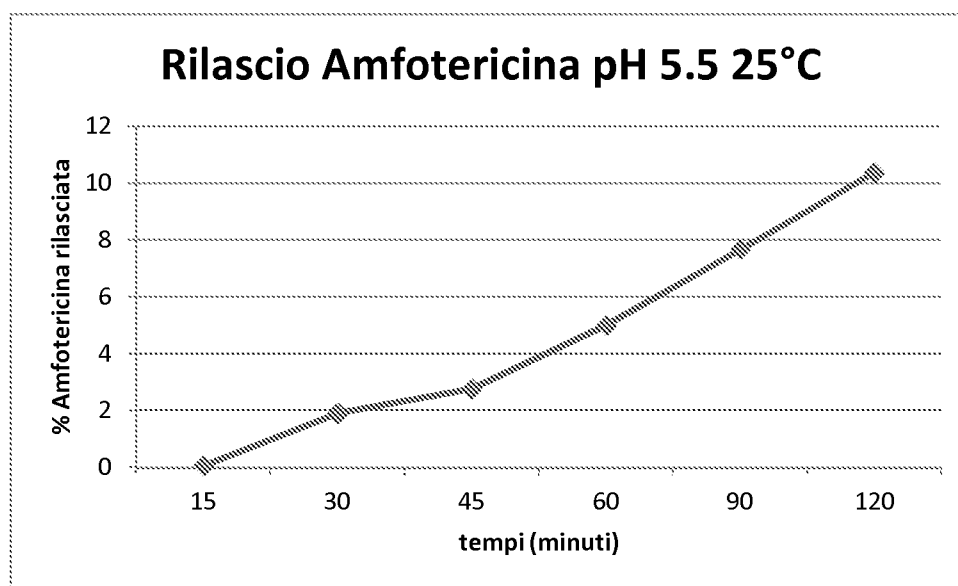


FIGURA 4

p.i.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

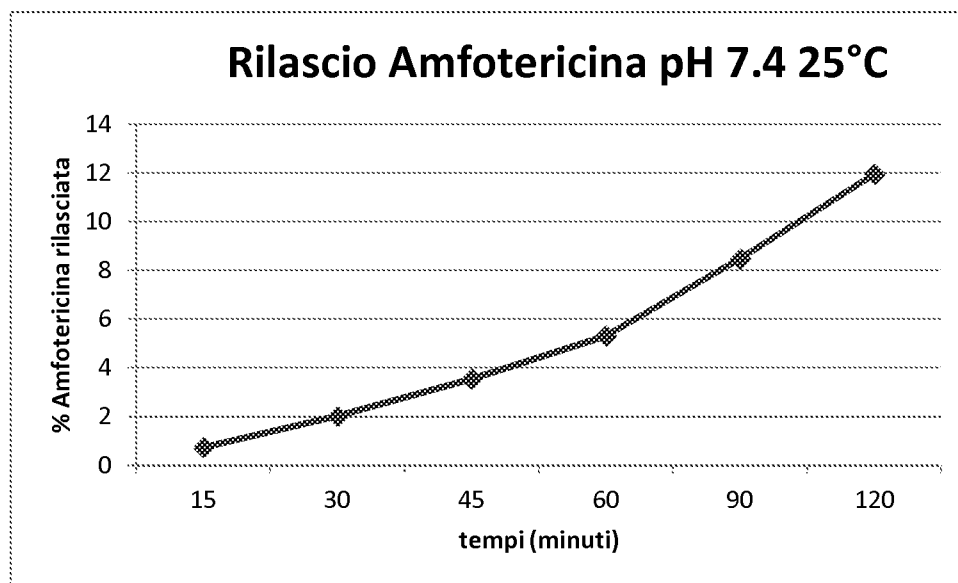


FIGURA 5

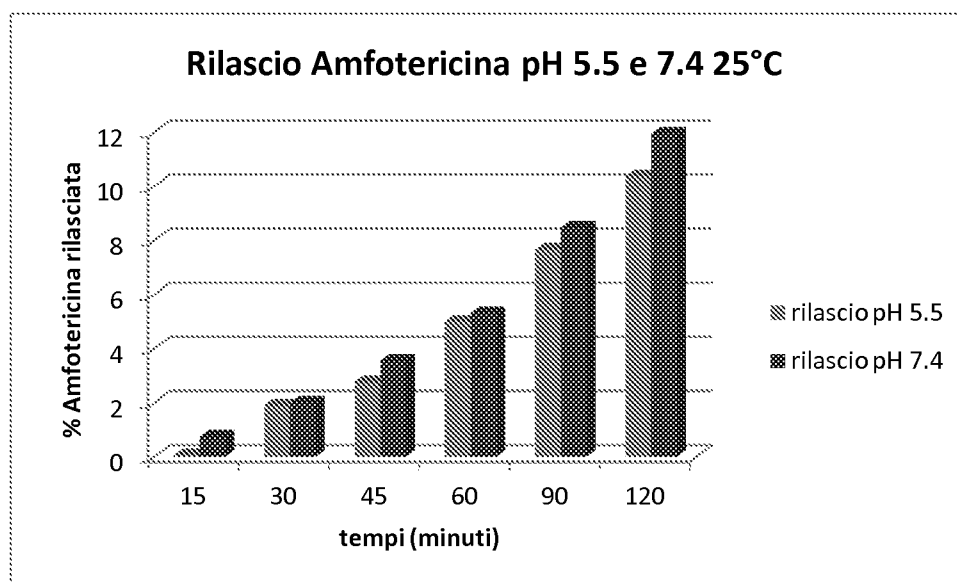


FIGURA 6