

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE FARMACIE**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

***ALINA SILVIA PORFIRE***

**SISTEME FARMACEUTICE NANOMETRICE  
PENTRU ADMINISTRAREA SISTEMICĂ A UNOR  
PROTEINE**

**Rezumatul tezei pentru obținerea titlului de  
Doctor în științe medicale, domeniul Farmacie**

**Conducător științific: *Prof. Dr. SORIN E. LEUCUȚA***

**2009**

## Cuprins

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>8</b>
<b>PARTEA GENERALĂ .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPITOLUL 1.....</b>	<b>12</b>
<b>SISTEME NANOMETRICE UTILIZATE PENTRU TRANSPORTUL LA ȚINTĂ AL PROTEINELOR.....</b>	<b>12</b>
1.1 Generalități despre transportul la țintă.....	13
1.2 Clasificarea sistemelor de transport la tinta.....	15
1.3 Sisteme coloidale utilizate în terapia la țintă .....	17
1.3.1 NANOPARTICULE.....	17
1.3.2 LIPOZOMI .....	31
1.4 Concluzii.....	40
<b>CAPITOLUL 2.....</b>	<b>41</b>
<b>UTILIZAREA PROTEINELOR CA AGENȚI TERAPEUTICI.....</b>	<b>41</b>
2.1 Clasificarea și structura proteinelor .....	42
2.2 Stabilitatea proteinelor.....	45
2.3 Factori care afectează stabilitatea proteinelor în timpul preparării sistemelor nanometrice .....	47
2.3.1 Factori tehnologici.....	47
2.3.2 Factori de formulare.....	48
2.4 Proteinele în terapia medicamentoasă.....	52
2.4.1 Biodisponibilitatea proteinelor medicamentoase .....	53
2.4.2 Proteine de interes terapeutic obținute prin biotehnologie.....	57
2.5 Concluzii.....	60
<b>PARTEA EXPERIMENTALĂ.....</b>	<b>61</b>
<b>PARTEA I-a: NANOPARTICULE POLIMERICE .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPITOLUL 1.....</b>	<b>62</b>
<b>INFLUENȚA FACTORILOR DE FORMULARE ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ALE NANOPARTICULELOR DINTR-UN COPOLIMER AL ETERULUI METILVINILIC CU ANHIDRIDA MALEICĂ (GANTREZ® AN) ASOCIATE CU DEXTRAN.....</b>	<b>62</b>
1.1 Introducere.....	63
1.2 Materiale și metode .....	65
1.3 Rezultate și discuții.....	72
1.3.1 Prepararea și caracterizarea nanoparticulelor.....	72
1.3.2 Fitarea datelor .....	74
1.3.3 Influența factorilor de formulare asupra caracteristicilor nanoparticulelor.....	80
1.3.3.1 Analiza influenței factorilor studiați asupra mărimii nanoparticulelor (Y1) .....	80
1.3.3.2 Analiza influenței factorilor studiați asupra potențialului zeta al nanoparticulelor (Y2) .....	82
1.3.3.3 Analiza influenței factorilor studiați asupra randamentului de preparare a nanoparticulelor (Y3).....	85
1.3.3.5 Analiza influenței factorilor studiați asupra cantității de dextran asociată nanoparticulelor (Y4) și asupra eficienței asocierii dextranului (Y5) .....	86
1.3.4 Determinarea formulei optime.....	90
1.4 Concluzii.....	90
<b>CAPITOLUL 2.....</b>	<b>92</b>
<b>CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR BIOADEZIVE <i>IN VIVO</i> ALE NANOPARTICULELOR DIN GANTREZ ASOCIATE CU DEXTRAN .....</b>	<b>92</b>
2.1 Introducere.....	93
2.2 Materiale și metode .....	95
2.3 Rezultate și discuții.....	101
2.3.1 Prepararea nanoparticulelor și selectarea formulărilor luate în studiu .....	101
2.3.2 Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor.....	103
2.3.3 Analiza dextranului asociat nanoparticulelor.....	105

2.3.4 Analiza aminodextranului.....	111
2.3.5 Analiza RBITC .....	112
2.3.6 Determinarea proprietăților bioadezive <i>in vivo</i> .....	114
2.4 Concluzii.....	123
<b>CAPITOLUL 3.....</b>	<b>125</b>
<b>DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR IMUNOADJUVANTE <i>IN VIVO</i> ALE NANOPARTICULELOR DIN GANTREZ ASOCIATE CU DEXTRAN.....</b>	<b>125</b>
3.1 Introducere.....	126
3.2 Materiale și metode .....	128
3.3 Rezultate și discuții.....	134
3.3.1 Prepararea și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor cu OVA.....	134
3.3.2 Cedarea OVA <i>in vitro</i> .....	135
3.3.3 Răspunsul imun seric și pe mucoasă.....	137
3.4 Concluzii.....	143
<b>PARTEA a II-a: LIPOZOMI .....</b>	<b>144</b>
<b>CAPITOLUL 4.....</b>	<b>145</b>
<b>PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA <i>IN VITRO</i> A LIPOZOMILOR CU SUPEROXIDDISMUTAZĂ (SOD).....</b>	<b>145</b>
4.1 Introducere.....	146
4.2 Materiale și metode .....	148
4.3 Rezultate și discuții.....	152
4.3.1 Determinarea cantitativă a SOD .....	152
4.3.2 Caracterizarea lipozomilor.....	153
4.4 Concluzii.....	155
<b>CAPITOLUL 5.....</b>	<b>156</b>
<b>EVALUAREA EFECTULUI ANTIINFLAMATOR AL LIPOZOMILOR CU SOD ÎN PERITONITA EXPERIMENTALĂ LA ȘOBOLANI .....</b>	<b>156</b>
5.1 Introducere.....	157
5.2 Materiale și metode .....	158
5.3 Rezultate și discuții.....	167
5.3.1 Răspunsul medular de fază acută.....	167
5.3.2 Testul de fagocitoză <i>in vitro</i> .....	169
5.3.3 Testele globale de stres oxidativ .....	172
5.3.3.1 Capacitatea antioxidantă totală.....	172
5.3.3.2 Statusul oxidativ total.....	173
5.3.3.3 Indicele de stres oxidativ .....	174
5.3.4 Teste specifice de evaluare a stresului oxidativ .....	176
5.3.4.1 Nitriți/nitrați .....	176
5.3.4.2 Malondialdehida.....	178
5.3.4.3 Glutacionul redus.....	179
5.3.5 Lipozomi cu SOD vs. Soluție de SOD în peritonita experimentală la șobolani.....	181
5.4 Concluzii.....	183
<b>CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>185</b>
<b>REFERINȚE .....</b>	<b>189</b>

**CUVINTE CHEIE:** transport la țintă, proteine, nanoparticule, Gantrez, dextran, bioadeziune, imunizare, ovalbumină, lipozomi, superoxiddismutază, stres oxidativ, inflamație.

## INTRODUCERE

Cerectările actuale în domeniul tehnologiei farmaceutice urmăresc realizarea unor strategii de cedare a agenților terapeutici la locul specific al acțiunii farmacologice astfel încât să se obțină o biodisponibilitate crescută a agentului terapeutic în vecinătatea receptorilor biologici, deci la locul care constituie ținta medicației. Transportul la țintă prezintă o importanță deosebită în cazul administrării agenților terapeutici din clasa peptidelor și proteinelor și se poate realiza cu ajutorul unor sisteme nanometrice de tipul nanoparticulelor și lipozomilor. Aceste sisteme sunt capabile să protejeze proteina încorporată de degradarea proteolitică și de captarea de către sistemele de apărare ale organismului și să asigure cedarea sa în formă activă la locul acțiunii biologice.

**Obiectivul general al lucrării** a constat în prepararea și caracterizarea nanoparticulelor și lipozomilor, încorporarea în aceste sisteme a unor proteine model și evidențierea îmbunătățirii efectului biologic al acestor proteine de către sistemele de transport alese, comparativ cu efectul obținut după administrarea proteinei sub formă de soluție, la animale de experiență.

## PARTEA GENERALĂ

### 1. SISTEME NANOMETRICE UTILIZATE PENTRU TRANSPORTUL LA ȚINTĂ AL PROTEINELOR

Nanoparticulele sunt particule coloidale cu dimensiuni cuprinse între 10 și 1000 nm. Substanța medicamentoasă este dizolvată, încorporată în rețeaua polimerică, încapsulată sau adsorbită la suprafața matriței polimerice, fiind protejată astfel de degradare hidrolitică sau enzimatică.

Lipozomii sunt vezicule artificiale alcătuite din unul sau mai multe straturi lipidice concentrice care includ un număr egal de spații apoase.

Nanoparticulele și lipozomii au fost propuse ca o soluție pentru administrarea proteinelor și peptidelor, atât pe cale parenterală cât și pe calea mucoaselor, datorită proprietăților de cedare prelungită, mărimii lor foarte reduse și compatibilității lor cu celulele și țesuturile organismului.

### 2. UTILIZAREA PROTEINELOR CA AGENȚI TERAPEUTICI

Numeroase proteine și peptide sunt utilizate la ora actuală în terapia unor boli pentru care încă se mai caută o farmacoterapie eficientă, datorită obținerii proteinelor pe scară largă prin biotehnologie. Proteinele au un spectru impresionant de indicații terapeutice, incluzând agenți terapeutici adresați bolilor sistemului cardiovascular, agenți antivirali, antialergici, analgezici și antiinflamatori, agenți antineoplazici. Administrate pe căile convenționale, proteinele și peptidele se caracterizează printr-o biodisponibilitate redusă datorită mai multor factori: permeabilitatea redusă prin membrane, instabilitatea fizico-chimică a moleculei și timpul redus de rezidență la locul absorbției. Administrarea proteinelor pe căi convenabile și noninvazive ar fi posibilă însă cu ajutorul sistemelor de transport la țintă.

## PARTEA EXPERIMENTALĂ

### PARTEA I-a: NANOPARTICULE POLIMERICE

#### 1. INFLUENȚA FACTORILOR DE FORMULARE ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ALE NANOPARTICULELOR DINTR-UN COPOLIMER AL ETERULUI METILVINILIC CU ANHIDRIDA MALEICĂ (GANTREZ<sup>®</sup> AN) ASOCIATE CU DEXTRAN

Prima parte a cercetărilor a fost dedicată preprării unor nanoparticule dintr-un copolimer al metilvinilerului cu anhidrida maleică (Gantrez<sup>®</sup> AN) prin metoda deplasării solventului. Aceste nanoparticule au fost asociate cu dextran cu diferite mase moleculare (Dex40, GM 40000 și Dex70, GM 70000), prin două metode: incubarea copolimerului cu dextran înaintea formării nanoparticulelor (Metoda A) sau asocierea dextranului la nanoparticulele preformate din copolimer (Metoda B). S-a studiat influența unor factori de formulare asupra proprietăților nanoparticulelor, prin analiză multivariată. Factorii de formulare studiați au fost masa moleculară a dextranului utilizat, metoda de asociere a dextranului la nanoparticule, cantitatea de dextran luată în lucru și timpul de incubare a polimerului cu dextranul. Nanoparticulele preparate au fost caracterizate prin mărime, potențial zeta, randament de preparare, cantitate de dextran asociată și eficiența asocierii. Cu ajutorul analizei multivariate, s-au stabilit condițiile optime pentru asocierea dextranului la nanoparticule, pentru fiecare tip de dextran utilizat.

Cel mai important factor, care a influențat toate proprietățile nanoparticulelor a fost masa moleculară a dextranului. În cazul utilizării Dex70, nanoparticulele rezultate au fost mai mari, au avut potențialul zeta mai mare și randamentul de preparare a fost mai mare decât la utilizarea Dex40. Cantitatea de dextran asociată și eficiența asocierii au fost mai mari pentru Dex40. Metoda de preparare a influențat mărimea nanoparticulelor și randamentul de preparare. Astfel, atunci când asocierea dextranului s-a făcut prin Metoda B s-au obținut nanoparticule mai mari și cu randamente mai mari decât în metoda A. Timpul de incubare a influențat mărimea nanoparticulelor, nanoparticulele rezultate fiind mai mari la timp de incubare mai mare. De asemenea, s-a constatat o creștere a cantității de dextran asociate la creșterea timpului de incubare a polimerului cu dextranul în Metoda A, dar numai la folosirea unor cantități inițiale mici de dextran. Cantitatea de dextran utilizată în procesul de obținere a nanoparticulelor a influențat cantitatea de dextran asociată acestora și eficiența asocierii. Astfel, cantitatea asociată a crescut cu creșterea cantității inițiale de dextran dar eficiența asocierii a variat invers proporțional cu aceasta.

Formula optimă s-a obținut în cazul Dex40 prin metoda B și a avut un conținut de dextran de 28 μg/mg iar pentru Dex70 prin metoda A și a avut un conținut de dextran de 26 μg/mg.

#### 2. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR BIOADEZIVE *IN VIVO* ALE NANOPARTICULELOR DIN GANTREZ ASOCIATE CU DEXTRAN

Pe baza rezultatelor analizei multivariate din capitolul precedent s-au selectat câteva formulări pentru o caracterizare mai aprofundată *in vitro* și studierea proprietăților bioadezive *in vivo*, după administrare orală la șobolani. S-au selectat pentru studiu nanoparticule asociate cu dextran convențional (Dex40 și Dex70) preparate prin cele două metode prezentate anterior, precum și nanoparticule asociate

cu dextran cu grupări amino (AmDex70, GM 70000). Deoarece analiza multivariată a arătat că, în general, eficiența de asociere a dextranului este mai mare la un raport mic (0.1-0.2) între cantitatea de dextran și cea de copolimer, s-a fixat ca raport de lucru dextran/copolimer valoarea 0.2, indiferent de metoda de preparare, iar timpul de incubare a fost 30 de minute. În cazul AmDex, prezența grupărilor amino a determinat o reactivitate foarte mare cu grupările anhidridă ale polimerului. Drept urmare, nanoparticulele cu AmDex au fost preparate doar prin Metoda B și, în acest caz, raportul AmDex/copolimer utilizat a fost 0.003. Pentru studiul de bioadeziune, toate formulările selectate au fost încărcate cu un marker fluorescent, rodamina B izotiocianat (RBITC).

Cel mai important obiectiv al studiilor *in vitro* din acest capitol l-a constituit evidențierea asocierii dextranului la nanoparticule. În acest sens, pentru dextranii convenționali s-au aplicat metode spectrale (IR și  $^1\text{H}$  RMN) iar pentru AmDex s-a utilizat testul de aglutinare *in vitro* cu concanavalină A. Spectrele IR au evidențiat asocierea dextranului la nanoparticule prin prezența unor benzi de absorbție caracteristice dextranului în spectrul nanoparticulelor, însă nu s-a evidențiat formarea de legături covalente între cele două componente ci doar formarea unor legături de hidrogen între polimer și grupările hidroxil ale dextranului. Prin spectroscopie  $^1\text{H}$  RMN s-a evidențiat asocierea dextranului la nanoparticule, datorită prezenței celor două picuri caracteristice grupării metilen și protonilor grupărilor hidroxil ale dextranului. În cazul AmDex, prezența acestuia la suprafața nanoparticulelor a cauzat un fenomen de aglutinare a nanoparticulelor cauzat de interacțiunea resturilor de AmDex cu concanavalina A.

Pentru studierea proprietăților bioadezive *in vivo*, nanoparticulele încărcate fluorescent au fost administrate prin gavaj la șobolani Wistar, în doză de 10 mg nanoparticule/animal. Fiecare tip de nanoparticule a fost administrat unui lot de 12 animale, din care câte 3 animale au fost sacrificate la 0.5, 1, 3 și 8 ore după administrare. S-a determinat cantitatea de nanoparticule aderate la fiecare interval de timp post-administrare, pe regiuni ale tractului gastro-intestinal. Toate nanoparticulele testate au dezvoltat interacțiuni de bioadeziune cu mucoasa tractului gastro-intestinal, nanoparticulele asociate cu dextran având o capacitate de adeziune mai mare decât nanoparticulele control, preparate doar din Gantrez. Rezultatele au arătat, pentru toate formulările administrate, o tendință mai mare de asociere cu mucoasa în prima oră după administrare, decât după o perioadă mai lungă de timp post-administrare. De asemenea, s-a observat o distribuție omogenă a nanoparticulelor în tractul gastro-intestinal, fără să se remarce o anumită specificitate pentru o regiune particulară a acestuia. În toate cazurile, indiferent de prezența dextranului și de tipul acestuia, nanoparticulele au avut o tendință de concentrare la nivelul mucoasei gastrice și, într-o măsură mai mare decât în stomac, în porțiunile superioare ale intestinului subțire, în duoden și jejun.

Formulările testate s-au încadrat în două profiluri de bioadeziune: un prim profil caracterizat printr-un maxim al adeziunii imediat după administrare, urmat de scăderea în timp a proporției aderate, și al doilea profil caracterizat printr-o prelungire a fenomenului bioadeziv, cu maxim aproximativ constant între 1 și 3 ore după administrare. Intensitatea adeziunii a fost semnificativ mai mare pentru toate nanoparticulele cu dextran decât pentru nanoparticulele control, iar timpul de rezidență în contact cu mucoasa a fost similar pentru toate formulările testate.

### 3. DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR IMUNOADJUVANTE *IN VIVO* ALE NANOPARTICULELOR DIN GANTREZ ASOCIATE CU DEXTRAN

Rezultatele pozitive ale studiului de bioadeziune au orientat în continuare cercetările spre folosirea acestor nanoparticule ca vector pentru un antigen model, ovalbumina (OVA), în vederea testării efectului lor imunoadjuvant, în special la administrare orală, dar și pe cale parenterală. Încorporarea ovalbuminei în nanoparticulele din Gantrez, asociate sau nu cu dextran, s-a făcut în matrița acestora.

Nanoparticulele cu OVA au avut dimensiuni de aproximativ 160 nm iar conținutul de OVA a fost influențat de prezența dextranului, fiind cuprins între 30 și 60  $\mu\text{g}/\text{mg}$  nanoparticule. Eliberarea *in vitro* a OVA a fost caracterizată de o etapă de cedare cu viteză mare în primele 8 ore urmată de cedarea cu viteză controlată, lentă, după 7 zile procentul de OVA cedat din toate formulările fiind de aproximativ 40%.

Studiul de imunizare s-a realizat pe șoricei BALB/c care au primit antigenul pe cale orală sau subcutanat, într-o singură doză de 100 și respectiv 20  $\mu\text{g}$  ovalbumină, sub formă liberă sau încorporat în nanoparticule. Efectul imunizant a fost evaluat prin determinarea titrului anticorpilor serici (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>) și a anticorpilor secretorii (IgA).

După administrarea orală a preparatelor cu OVA, răspunsul imun a apărut doar la loturile care au primit antigenul încorporat în nanoparticule asociate cu dextran convențional și s-a caracterizat printr-o predominanță a anticorpilor de tip IgG<sub>1</sub>. Răspunsul imun a apărut după o perioadă de latență de aproximativ 2 săptămâni, maximul s-a atins la 28-35 zile post-imunizare și s-a menținut la nivel maxim până la sfârșitul experimentului (ziua 49). La animalele care au primit antigenul sub formă liberă sau în nanoparticule din Gantrez sau Gantrez asociat cu AmDex nu s-a evidențiat nici un tip de răspuns imun semnificativ, ceea ce denotă lipsa de protecție a antigenului încorporat în aceste caz.

Imunizarea s.c. a fost caracterizată prin apariția anticorpilor IgG<sub>1</sub> și IgG<sub>2a</sub> la toate loturile imunizate. În acest caz, nanoparticulele cu OVA asociate cu Dex40 au dezvoltat un răspuns imun echilibrat în ceea ce privește nivelele celor două tipuri de anticorpi serici și comparabil cu răspunsul imun după administrarea OVA în adjuvantul lui Freund.

Efectul imunizant pe mucoasă, evaluat prin determinarea titrului de IgA secretorii, a fost de intensitate redusă. S-au obținut nivele de IgA doar în cazul administrării OVA sub formă de nanoparticule și în cazul imunizării pe cale orală, dar nu s-a menținut un nivel constant de IgA secretorii.

Studiul de imunizare realizat de noi arată în general o eficacitate imunoadjuvantă superioară a nanoparticulelor transportoare de antigen comparativ cu soluția antigenului la administrare orală și chiar o eficacitate comparabilă cu cea a unui adjuvant cunoscut, adjuvantul lui Freund, la administrare parenterală. În ceea ce privește influența dextranului asupra efectului imunizant obținut, la administrare orală prezența dextranului convențional la suprafața nanoparticulelor cu OVA a influențat decisiv apariția răspunsului imun.

## PARTEA a II-a: LIPOZOMI

### 4. PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA *IN VITRO* A LIPOZOMILOR CU SUPEROXIDDISMUTAZĂ (SOD)

Lipozomii au fost al doilea tip de sistem nanometric propus în această lucrare pentru administrarea unei proteine. Proteina model aleasă în acest caz a fost superoxiddismutaza (SOD), o enzimă cu proprietăți antioxidante. Lipozomii cu SOD s-au preparat prin metoda hidratării filmului lipidic. Lipidele utilizate pentru formarea peretelui lipozomal au fost lecitina și colesterolul. Eficiența asocierii enzimei a fost dependentă de concentrația enzimei în lichidul de hidratare și de compoziția filmului lipidic, fiind de aproximativ 7% în condițiile de lucru selectate.

### 5. EVALUAREA EFECTULUI ANTIINFLAMATOR AL LIPOZOMILOR CU SOD ÎN PERITONITA EXPERIMENTALĂ LA ȘOBOLANI

Pentru a evidenția beneficiile terapeutice ale includerii SOD în lipozomi, s-a utilizat un model experimental *in vivo*, peritonita acută indusă cu carrageenan, la șobolani. Efectul lipozomilor cu SOD a fost comparat cu cel al soluției de SOD și cu efectul administrării unui tratament antiinflamator (diclofenac, N-nitro-L-arginine methyl ester (NAME)) sau antioxidant (vitamina E). S-au realizat două seturi separate de experimente. Primul experiment a constatat în urmărirea efectului preventiv al tratamentului administrat (administrarea s-a făcut cu 30 de minute înaintea inducerii peritonitei), în timp ce al doilea experiment a urmărit efectul curativ (administrarea tratamentului la 30 de minute după inducerea peritonitei). Tratamentul a fost administrat sub forma unei injecții intraperitoneale, într-un volum de 0.5 mL/animal. La șase ore după inducerea peritonitei s-a făcut evaluarea efectului antiinflamator prin răspunsul medular de fază acută, testul de fagocitoză *in vitro* și prin teste serice globale (capacitatea antioxidantă totală (TAC), statusul oxidativ total (TOS), indicele de stres oxidativ (OSI)) și specifice (nitriți/nitrați, malondialdehida (MDA) și glutationul redus (GSH)) de stres oxidativ.

Inducerea peritonitei a fost evidențiată prin activarea răspunsului medular de fază acută, stimularea procesului de fagocitoză, creșterea indicatorilor serici de stres oxidativ (TOS, OSI, nitriți/nitrați, MDA), reducerea nivelului antioxidanților serici globali (TAR) și stimularea unor mecanisme specifice de apărare antioxidantă (GSH).

Lipozomii cu SOD, administrați înainte sau după inducerea peritonitei, au determinat scăderea semnificativă a numărului total de leucocite și reducerea fagocitozei față de lotul cu peritonită. Lipozomii cu SOD au redus semnificativ valoarea TOS în ambele studii și OSI în studiul preventiv, dar nu s-a înregistrat o creștere semnificativă a TAC față de lotul peritonită. De asemenea, lipozomii au produs o scădere semnificativă a concentrației metaboliților oxidului nitric și au influențat semnificativ concentrația glutationului redus seric, fără a reduce semnificativ peroxidarea lipidică.

Administrarea soluției de SOD a redus semnificativ răspunsul medular de fază acută și fagocitoza, în ambele scheme de administrare. Efectul soluției de SOD asupra parametrilor de stres oxidativ a fost în general nesemnificativ. Totuși, soluția de SOD a determinat o scădere semnificativă a TOS față de peritonită în studiul preventiv precum și o influență semnificativă favorabilă asupra nivelelor glutationului redus seric, în ambele studii.

Administrarea diclofenacului înainte sau după inducerea peritonitei a determinat reducerea semnificativă a numărului de leucocite și a fagocitozei



comparativ cu grupul peritonită. Diclofenacul nu a influențat semnificativ valorile testelor globale de stres oxidativ, cu excepția valorii TOS în studiul preventiv. Administrarea diclofenacului nu a influențat semnificativ sinteza de oxid nitric și peroxidarea lipidică, dar a avut influență semnificativă asupra nivelelor glutatationului seric.

Vitamina E, antioxidantul de referință folosit, a redus semnificativ numărul de leucocite și parametri ce caracterizează fagocitoza. De asemenea, a influențat semnificativ parametri nespecifici de stres oxidativ, în special în studiul preventiv și mai puțin în tratamentul peritonitei. Administrarea vitaminei E nu a produs o modificare semnificativă a sintezei de oxid nitric și a peroxidării lipidice, dar a influențat nivelele serice ale glutatationului, în ambele studii.

Administrarea NAME înainte și după inducerea peritonitei a redus semnificativ răspunsul medular de fază acută și fagocitoza. În ceea ce privește markerii de stres oxidativ, cei nespecifici (TAC, TOS, OSI) au fost influențați semnificativ doar în studiul preventiv iar dintre cei specifici a avut o influență semnificativă numai asupra concentrației de MDA, în studiul preventiv.

Comparând eficiența celor două forme de administrare a SOD, liberă și încorporată în lipozomi, s-a observat o influență favorabilă a ambelor forme asupra parametrilor hematologici și biochimici asociați inducerii peritonitei, activitatea lipozomilor fiind superioară soluției, în special în studiul preventiv. Ca urmare putem afirma că încorporarea SOD în lipozomi crește beneficiile terapeutice ale acestei enzime.

## CONCLUZII GENERALE

Cercetările realizate în această lucrare demonstrează beneficiile utilizării unor sisteme nanometrice de tipul nanoparticulelor polimerice și lipozomilor pentru administrarea sistemică a proteinelor. Cu ajutorul nanoparticulelor polimerice cu proprietăți bioadezive s-a îmbunătățit efectul imunizant al unui antigen model după administrare orală și s.c. comparativ cu administrarea antigenului sub formă de soluție. Lipozomii au crescut beneficiile terapeutice ale unei enzime antioxidante într-un proces inflamator acut la administrare parenterală.

# CURRICULUM VITAE

## DATE PERSONALE

*Nume, prenume:* **PORFIRE (n. TUNS) ALINA-SILVIA**  
*Data și locul nașterii:* 16.09.1981, Zalău, Jud. Sălaj  
*Naționalitatea:* Română  
*Stare civilă:* Căsătorită  
*Domiciliu stabil:* Cluj-Napoca, str. Rapsodiei nr. 11, ap. 49, Jud. Cluj, 400359–  
România, Tel: 0745-889030  
*E-mail:* aporfire@umfcluj.ro; alinatuns@yahoo.com

## PREGĂTIRE PROFESIONALĂ

- *din noiembrie 2005* – doctorand cu frecvență, domeniul fundamental – științe medicale, domeniul – farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca (îndrumător Prof. Dr. S.E. Leucuța);
- *2004-2005* – Masterat în specialitatea „Tehnologie Farmaceutică Industrială”, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca;
- *1999-2004* – Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”; șef de promoție, licențiat în Farmacie;
- *1995-1999* – Liceul Teoretic Zalău, profil Matematică-Fizică.

## EXPERIENȚĂ PROFESIONALĂ

- *octombrie 2008 - prezent* – asistent universitar, Catedra de Tehnologie Farmaceutică și Biofarmacie, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”;
- *ianuarie-mai 2008* – bursier în Departamentul Farmacie și Tehnologie Farmaceutică, Facultatea de Farmacie, Universitatea din Navarra, bursă oferită de Ministerul Educației, Cercetării și Tineretului din România, prin Centrul Național pentru Burse de Studii în Străinătate;
- *septembrie 2006-martie 2007* – bursier în Departamentul Farmacie și Tehnologie Farmaceutică, Facultatea de Farmacie, Universitatea din Navarra, bursă prin programul Socrates-Erasmus;
- *octombrie 2005 - septembrie 2008* – preparator la Catedra de Tehnologie farmaceutică și Biofarmacie, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”;
- *octombrie 2004 - septembrie 2005* – farmacist la Farmacia Rodafarm Cluj-Napoca.

## DOMENII DE INTERES

- formularea de sisteme nano- și microparticulate pentru vehicularea proteinelor și peptidelor medicamentoase și caracterizarea lor fizico-chimică;
- asigurarea stabilității proteinei medicamentoase și a sistemului de transport;
- evidențierea efectelor biologice ale sistemelor nanometrice cu proteine, la animale de experiență;
- studii *in vitro* pe culturi de celule.

## **PARTICIPAREA LA CURSURI ȘI SIMPOZIOANE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE**

1. Simpozionul „*Rolul farmacistului în asistența bolnavului cu afecțiuni oncologice*”, 30 mai 2009, Cluj-Napoca, România.
2. 14<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium: “*Overcoming Biological Barriers in Innovative Delivery Systems*”, 6 – 11 Septembrie 2008, Antalya, Turcia.
3. *I Jornada de Investigacion en Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad de Navarra*, 30 mai 2008, Pamplona, Spania.
4. Simpozionul „*Rolul farmacistului în asistența de sănătate a copilului*”, 24 mai 2008, Cluj-Napoca, România.
5. European IP – Galenos Course: SKIN BARRIER FUNCTION “*Cutaneous absorption and Environmental Factors*”, 16 septembrie – 2 Octombrie 2007, Lyon, Franța.
6. *Curso basico animales experimentacion*, 12-14 Decembrie 2006, Universitatea din Navarra, Pamplona, Spania.
7. Al XIII-lea Congres Național de Farmacie “*O farmacie puternică Intr-o Românie Europeană*”, 28-30 septembrie 2006, Cluj-Napoca, România.
8. VII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, 22-24 Octombrie 2006, Pamplona, Spania.
9. International GALENOS Intensive Course and Workshop on *Advanced approaches to dosage forms design*, 16 – 27 Ianuarie 2006, Universitatea Charles, Hradec Kralove, Cehia.
10. Simpozionul „*Rolul farmacistului în asistența bolnavului diabetic*”, 14 mai 2005, Cluj-Napoca, România.

## **PUBLICAȚII**

### **Articole publicate in extenso**

1. **A.S. Porfire**, A.E. Pârvu, D. Daicoviciu, S.E. Leucuța. *Evaluation of antiinflammatory activity of liposome encapsulated superoxide dismutase in rats peritonitis*. Farmacia, 2009; 57(4): 412-423.
2. **A.S. Porfire**, I. Tomuță, J.M. Irache, S.E. Leucuța. *The influence of the formulation factors on physico-chemical properties of dextran associated Gantrez® AN nanoparticles*. Farmacia, 2009; 57(4): 463-472.
3. **A.S. Porfire**, V. Zabaleta, C. Gamazo, S.E. Leucuța, J.M. Irache. *Influence of dextran on the bioadhesive properties of poly(anhydride) nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2009; [doi:10.1016/j.ijpharm.2009.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.017).

### **Lucrări comunicate și/sau publicate ca rezumat**

1. **Alina S. Porfire**, Virginia Zabaleta, Carlos Gamazo, Juan M. Irache, Sorin E. Leucuța. *Polymeric nanoparticles for oral drug delivery*. 13<sup>th</sup> IUPAC International Conference on Polymers and Organic Chemistry, 5-9 iulie 2009, Montreal, Canada.
2. **A.S. Porfire**, V. Zabaleta, C. Gamazo, S.E. Leucuța, J.M. Irache. *Poly(anhydride)-Dextran 40-based nanoparticles for oral antigen delivery*. Young pharmaceutical scientists meet in Nice, 7-8 iunie, Nisa, Franța.

4. **A.S. Porfire**, S.E. Leucuta, C. Gamazo, J.M. Irache. Nanoparticule din Gantrez<sup>®</sup> AN asociate cu dextran pentru imunizare pe cale orală. Zilele Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, decembrie 2008.
5. **A.S. Porfire**, S.E. Leucuța, C. Gamazo, J.M. Irache. *Dextran associated Gantrez<sup>®</sup> AN nanoparticles for oral antigen delivery*. 14<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 6 – 11 Septembrie 2008, Antalya, Turcia.
6. **A.S. Tuns**, S.E. Leucuta, J.M. Irache. *Dextran associated Gantrez<sup>®</sup> AN nanoparticles for oral antigen delivery*. I Jornada de Investigacion en Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad de Navarra, 30 mai 2008, Pamplona, Spania.
7. **Alina Silvia Porfire**, Marcela Achim, S.E. Leucuta. *Superoxide Dismutase-Loaded Poly(Lactide-Co-Glicolide) Microspheres*. European IP – Galenos Course, 16 septembrie – 2 Octombrie 2007, Lyon, Franța.
8. **Porfire Alina-Silvia**, Irache J.M., Leucuta S.E. *Prepararea și caracterizarea unor nanoparticule din Gantrez<sup>®</sup> AN asociate cu dextran*. Zilele Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, decembrie 2007.
9. **Alina Tuns**, Marcela Achim, Cristina Crăciun, S.E. Leucuța. *Preparation of superoxide dismutase - loaded poly(lactide-co-glicolide) microspheres by the double emulsion solvent evaporation method*. Al XIII-lea Congres Național de Farmacie, 28-30 septembrie 2006, Cluj-Napoca, România.

#### **PARTICIPARE ÎN GRANTURI DE CERCETARE**

1. Director al proiectului CNCSIS (cod TD\_278 din 2007) cu titlul: “*Sisteme polimerice nano- si microparticulate utilizate pentru transportul si cedarea controlata a peptidelor medicamentoase*”.
2. Membru al echipei de cercetare a proiectului CNCSIS (Programul IDEI, cod ID\_457 din 2007): “*Screeningul variabilelor de formulare si tehnologice pentru modificarea farmacocineticii si actiunii biologice a unor substante medicamentoase in scopul realizarii unor forme farmaceutice moderne*”. Director de proiect Prof. Dr. Sorin Leucuta.
3. Membru al colectivului de cercetare al proiectului CNMP (Programul PN II, cod 41\_072 din 2007) cu titlul: *Dezvoltarea prin cercetare interdisciplinara a unei noi terapii medicamentoase destinata asigurarii neuroprotectiei in ischemia cerebrala*. Director de proiect: Conf. Dr. Marcela Achim.
4. Membru al echipei de cercetare a proiectului CNCSIS (AT 94/2007) cu titlul: *Dezvoltarea si optimizarea formularii si prepararii unui sistem farmaceutic de uz oral pentru transportul si cedarea substantei medicamentoase cu specificitate la nivelul colonului*. Director de proiect: Sef lucr. Dr. Tomuta Ioan.

#### **MEMBRU ÎN ASOCIAȚII PROFESIONALE**

- Colegiul Farmaciștilor din România
- Societatea de Științe Farmaceutice din România

#### **LIMBI STRĂINE**

- engleza: certificat de competență lingvistică eliberat de Catedra de Limbi Moderne a UMF Iuliu-Hatieganu;
- spaniola și franceza: nivel mediu.

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
FACULTY OF PHARMACY**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA

***ALINA SILVIA PORFIRE***

**NANOMETRIC PHARMACEUTICAL SYSTEMS  
FOR SYSTEMIC ADMINISTRATION OF  
PROTEINS**

**Summary of PhD Thesis**

In order to acquire the scientific title of **Doctor of Medical Science**  
**Field of Pharmacy**

**Scientific Coordinator: *Prof. Dr. SORIN E. EUCUȚA***

**2009**

# Contents

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>GENERAL PART .....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPTER 1 .....</b>	<b>12</b>
<b>NANOMETRIC SYSTEMS FOR PROTEIN TARGETED DELIVERY .....</b>	<b>12</b>
1.1 General aspects of drug targeting .....	13
1.2 Classification of drug targeting systems .....	15
1.3 Coloidal systems for drug targeting .....	17
1.3.1 NANOPARTICLES .....	17
1.3.2 LIPOSOMES .....	31
1.4 Conclusions .....	40
<b>CHAPTER 2 .....</b>	<b>41</b>
<b>PROTEINS AS THERAPEUTIC DRUGS .....</b>	<b>41</b>
2.1 Protein classification and structure .....	42
2.2 Protein stability .....	45
2.3 Factors affecting protein stability during preparation of nanometric systems .....	47
2.3.1 Technological factors .....	47
2.3.2 Formulation factors .....	48
2.4 Proteins in therapy .....	52
2.4.1 Protein bioavailability .....	53
2.4.2 Biotechnological therapeutic proteins .....	57
2.5 Conclusions .....	60
<b>EXPERIMENTAL PART</b>	
<b>PART I: POLYMERIC NANOPARTICLES .....</b>	<b>61</b>
<b>CHAPTER 1 .....</b>	<b>62</b>
<b>THE INFLUENCE OF THE FORMULATION FACTORS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF DEXTRAN ASSOCIATED POLY(METHYL VINYL ETHER-CO-MALEIC ANHYDRIDE) (GANTREZ® AN) NANOPARTICLES .....</b>	<b>62</b>
1.1 Introduction .....	63
1.2 Materials and methods .....	65
1.3 Results and discussions .....	72
1.3.1 Nanoparticles' preparation and characterization .....	72
1.3.2 Data fitting .....	74
1.3.3 The influence of formulation factors on nanoparticle properties .....	80
1.3.3.1 Analysis of the influence of formulation factors on nanoparticles' size (Y1) .....	80
1.3.3.2 Analysis of the influence of formulation factors on nanoparticles' zeta potential (Y2) .....	82
1.3.3.3 Analysis of the influence of formulation factors on nanoparticles' preparation yield (Y3) .....	85
1.3.3.5 Analysis of the influence of formulation factors on the amount of associated dextran (Y4) and on dextran association efficiency (Y5) to nanoparticles .....	86
1.3.4 Optimum formula determination .....	90
1.4 Conclusions .....	90
<b>CHAPTER 2 .....</b>	<b>92</b>
<b>PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND <i>IN VIVO</i> BIOADHESIVE PROPERTIES DETERMINATION OF DEXTRAN ASSOCIATED GANTREZ® AN NANOPARTICLES .....</b>	<b>92</b>
2.1 Introduction .....	93
2.2 Materials and methods .....	95
2.3 Results and discussions .....	101

2.3.1 Nanoparticles' preparation and selection of the studied formulations.....	101
2.3.2 Nanoparticles' physico-chemical characterization .....	103
2.3.3 Associated dextran analysis.....	105
2.3.4 Aminodextran analysis .....	111
2.3.5 RBITC analysis.....	112
2.3.6 <i>In vivo</i> bioadhesive properties determination .....	114
2.4 Conclusions .....	123
<b>CHAPTER 3 .....</b>	<b>125</b>
<b>DETERMINATION OF <i>IN VIVO</i> IMMUNOADJUVANT PROPERTIES OF DEXTRAN ASSOCIATED GANTREZ NANOPARTICLES.....</b>	<b>125</b>
3.1 Introduction .....	126
3.2 Materials and methods.....	128
3.3 Results and discussions .....	134
3.3.1 OVA-loaded nanoparticles preparation and physico-chemical characterization .....	134
3.3.2 <i>In vitro</i> OVA release.....	135
3.3.3 Serum and mucosal immune response.....	137
3.4 Conclusions .....	143
<b>PART II: LIPOSOMES .....</b>	<b>144</b>
<b>CHAPTER 4 .....</b>	<b>145</b>
<b>PREPARATION AND <i>IN VITRO</i> CHARACTERIZATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD)-LOADED LIPOSOMES .....</b>	<b>145</b>
4.1 Introduction .....	146
4.2 Materials and methods.....	148
4.3 Results and discussions .....	152
4.3.1 SOD quantification.....	152
4.3.2 Liposomes' characterization.....	153
4.4 Conclusions .....	155
<b>CHAPTER 5 .....</b>	<b>156</b>
<b>EVALUATION OF ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF LIPOSOME ENCAPSULATED SUPEROXIDE DISMUTASE IN RATS PERITONITIS .</b>	<b>156</b>
5.1 Introduction .....	157
5.2 Materials and methods.....	158
5.3 Results and discussions .....	167
5.3.1 Bone marrow acute phase response .....	167
5.3.2 <i>In vitro</i> phagocytosis test.....	169
5.3.3 Oxidative stress global tests.....	172
5.3.3.1 Total antioxidant capacity.....	172
5.3.3.2 Total oxidant status.....	173
5.3.3.3 Oxidative stress index.....	174
5.3.4 Oxidative stress specific tests .....	176
5.3.4.1 Nitrite/nitrate.....	176
5.3.4.2 Malonaldehyde.....	178
5.3.4.3 Reduced glutathione.....	179
5.3.5 SOD liposomes vs. SOD solution in rats peritonitis.....	181
5.4 Conclusions .....	183
<b>FINAL CONCLUSIONS.....</b>	<b>185</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>189</b>

**KEYWORDS:** drug targeting, proteins, nanoparticles, Gantrez, dextran, bioadhesion, immunization, ovalbumin, liposomes, superoxide dismutase, oxidative stress, inflammation.

## INTRODUCTION

The current aim of the researches in the Pharmaceutical Technology field is the developing of strategies for targeting the therapeutic agents to the specific site of pharmacologic action in order to obtain a high bioavailability of the active ingredient close to the biological receptor, at its specific site of action. Targeted delivery is of major importance in the case of administering peptides or proteins as therapeutic agents and can be achieved using nanometric systems such as nanoparticles and liposomes. These systems have the ability to protect the encapsulated protein against proteolytic degradation and against the intake by the immune system and ensure the release of protein in its active form at the site of action.

**The overall objective of this thesis** was to prepare and characterize nanoparticles and liposomes, to encapsulate model proteins in these delivery systems and to highlight the improvement of protein's therapeutic activity by the selected delivery systems, compared with the administration of protein solution to laboratory animals.

## GENERAL PART

### 1. NANOMETRIC SYSTEMS FOR PROTEIN TARGETED DELIVERY

Nanoparticles are colloidal particles with size ranging from 10 to 1000 nm. The active ingredient is either dissolved, incorporated into the polymeric network, encapsulated or adsorbed on the surface of polymeric matrix, thus being protected by hydrolytic and enzymatic degradation.

Liposomes are artificial vesicles composed of one or more concentric lipid layers that include an equal number of aqueous spaces.

Nanoparticles and liposomes have been proposed as a solution for the administration of proteins and peptides, both for parenteral and mucosal route, due to their prolonged release properties, their very small size and their compatibility with cells and body tissues.

### 2. PROTEINS AS THERAPEUTIC DRUGS

Many proteins and peptides are currently used in therapy for diseases that still need an effective pharmacotherapy, because proteins are extensively obtained by biotechnology. Proteins have a wide range of therapeutic indications, including therapeutic agents for the cardiovascular system diseases, antiviral agents, antiallergic, analgesic, anti-inflammatory and antineoplastic agents. Administered by conventional routes, proteins and peptides are characterized by a reduced bioavailability due to several factors: reduced membrane permeability, physico-chemical instability of the molecule and reduced residence time at the site of absorption. The administration of proteins through convenient and non-invasive routes would be possible using targeted delivery systems.



## EXPERIMENTAL PART

### PART I: POLYMERIC NANOPARTICLES

#### 1. THE INFLUENCE OF THE FORMULATION FACTORS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF DEXTRAN ASSOCIATED POLY(METHYL VINYL ETHER-CO-MALEIC ANHYDRIDE) (GANTREZ<sup>®</sup> AN) NANOPARTICLES

The first part of the research was devoted to preparation of poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) (Gantrez<sup>®</sup> AN) nanoparticles by the solvent displacement method. These nanoparticles were associated with different molecular weights dextran (Dex40, MW 40000 and Dex70, MW 70000), using two different methods: incubation of the copolymer with dextran before the formation of the nanoparticles (Method A) or association of dextran to preformed polymeric particles (Method B). The influence of some formulation factors on nanoparticle properties was studied using multivariate analysis. The studied formulation factors were dextran molecular weight, the method used for dextran association, the amount of dextran used in the preparation process and the incubation time of dextran with the copolymer. The resulted nanoparticles were characterized in terms of size, zeta potential, yield of the preparation process, the amount of associated dextran and the association efficiency. Using multivariate analysis the optimal conditions for dextran association were established, for each type of dextran used.

The major factor which influenced all nanoparticles' properties was the molecular weight of dextran. When Dex70 was used, the resulted nanoparticles had larger size, bigger zeta potential values and the yield of the preparation process was higher than in the case of using Dex40. The amount of associated dextran and the association efficiency were greater for Dex40. The preparation method influenced nanoparticle size and the yield of the preparation process. Thus, when the association of dextran was made by Method B, the obtained nanoparticles had larger size and the yields were better than in the case of Method A. The incubation time influenced nanoparticle size, the resulted nanoparticles being larger when the incubation time was longer. Also, there was an increase in the amount of dextran associated with increased incubation time of dextran with the copolymer in Method A, but only using small initial amount of dextran. The quantity of dextran used in nanoparticles preparation process influenced the amount of dextran associated to the nanoparticles and the association efficiency. Thus, the associated amount increased when the initial dextran quantity increased but the association efficiency was higher when lower dextran quantities were used in the preparation process.

The optimum formulation for Dex 40 was obtained by Method B and had a dextran content of 28 $\mu$ g/mg, while for Dex 70 the optimum formula was obtained by Method A, and had a dextran content of 26 $\mu$ g/mg.

## 2. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND *IN VIVO* BIOADHESIVE PROPERTIES DETERMINATION OF DEXTRAN ASSOCIATED GANTREZ<sup>®</sup> AN NANOPARTICLES

Based on the results of multivariate analysis in the previous chapter, several formulations were selected for further *in vitro* characterization and for studying their *in vivo* bioadhesive properties after oral administration in rats. The selected formulations were nanoparticles associated with conventional dextran (Dex40 and Dex70), prepared by the two methods described above, and nanoparticles associated with aminated dextran (AmDex70, MW 70000). Since the multivariate analysis shown that dextran association efficiency was higher for smaller ratio (0.1-0.2) between the amounts of dextran and copolymer, the ratio between the two components was set at 0.2 by weight, irrespective of preparation method, and the incubation time was 30 minutes. In the case of AmDex, the presence of amino functional groups resulted in a high reactivity with the acid anhydride residues of the copolymer. Therefore, nanoparticles with AmDex were prepared only by Method B and in this case the ratio AmDex/copolymer was set at 0.003. For the bioadhesion study, all the selected formulations were fluorescently labeled with rhodamine B isothiocyanate (RBITC).

The most important goal of the *in vitro* studies in this chapter was to evidence the association of dextran to the nanoparticles. For this purpose, spectral methods were applied in the case of conventional dextrans (IR and <sup>1</sup>H NMR) while for AmDex the concanavalin A agglutination test was performed. The IR spectra demonstrated the association of dextran to the nanoparticles as indicated by the presence of typical absorption bands of dextran in the spectrum of nanoparticles. However, no apparent chemical covalent bonds between the two compounds, only the formation of hydrogen bonds between the copolymer and hydroxyl groups of dextran were detected in the spectra. <sup>1</sup>H NMR analysis also evidenced the association of dextran by the presence of the two peaks characteristics for protons of methylene units and hydroxylic protons of dextran. In the case of AmDex, its presence at nanoparticle surface caused an agglutination phenomenon explained by the interaction of AmDex residues with concanavalin A.

In order to study their *in vivo* bioadhesive properties, fluorescently labeled nanoparticles were orally administered to Wistar rats, 10 mg nanoparticles/animal. Each type of nanoparticle was administered to a group of 12 animals and from each group 3 animals were sacrificed at 0.5, 1, 3 and 8 h post-administration. The amount of nanoparticles adhered at each time after administration and for each region of the gastrointestinal tract was determined. All types of nanoparticles tested in our experiment were able to develop bioadhesive interactions with the gastrointestinal tract of animals and dextran associated nanoparticles had a higher adhesion capacity than control, Gantrez nanoparticles. For all the administered formulations, the results showed a higher degree of association with the gut mucosa during the first one hour than after a long time post-administration. In addition, it was observed a homogeneous distribution in the whole gut for all the formulations tested, without any marked specificity for a particular region of the gut. In any case, all the nanoparticle formulations, irrespective of the presence and type of dextran, displayed a tendency to concentrate in the stomach mucosa and, in a high degree, in the upper regions of the small intestine (duodenum and jejunum).

The tested formulations could be ascribed to one of the two different profiles of bioadhesion observed: the first profile was characterized by an initial maximum of bioadhesion followed by a decline of the amount of the adhered particles to the whole gut mucosa and the second profile was characterized by a prolonged bioadhesive

interaction, which reach the maximum in the period ranged from 1 and 3 h post-administration. The adhesion intensity was significantly higher for all dextran associated nanoparticles than for control nanoparticles while the residence time in contact with the gut mucosa was similar for all the formulations tested.

### **3. DETERMINATION OF *IN VIVO* IMMUNOADJUVANT PROPERTIES OF DEXTRAN ASSOCIATED GANTREZ<sup>®</sup> AN NANOPARTICLES**

The encouraging results of the bioadhesion study have guided the following researches to the use of these nanoparticles as a targeting system for a model antigen, ovalbumin (OVA), in order to test their immunoadjuvant effect, after oral and parenteral administration. The incorporation of ovalbumin in Gantrez nanoparticles, with or without dextran, was made in their matrix.

OVA loaded nanoparticles had size around 160 nm and OVA content was influenced by the presence of dextran, ranging from 30 to 60 µg/mg nanoparticles. OVA release was characterized by a bulk release in the first 8 hours followed by a controlled, slow release period, the percent of OVA released after 7 days being approximately 40% for all formulations.

The immunization study has been performed on BALB/c mice that have received the antigen orally or by s.c. route, as a single dose of 100 or 20 µg OVA, free or encapsulated in nanoparticles. The immune response has been evaluated through serum antibody titers (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>) and mucosal antibody titer (IgA).

When OVA was orally administered, the immune response occurred only in the groups that received the antigen encapsulated in nanoparticles associated with conventional dextran, and was characterized by a predominant IgG<sub>1</sub> response. The immune response appeared after a lag-time of about 2 weeks, the maximum was reached between the 28<sup>th</sup> and the 35<sup>th</sup> day post-immunization and was maintained until the end of the experiment (day 49<sup>th</sup>). The animals that received the antigen in the free form, encapsulated in Gantrez nanoparticles or in AmDex associated nanoparticles did not develop any type of significant immune response, which shows lack of antigen protection in this case.

The s.c. immunization was followed by IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> antibody secretion in all groups. In this case, Dex40 associated nanoparticles showed a balanced immune response in terms of levels of the two types of serum antibodies, the immune response being similar to that obtained after administration of OVA in complete Freund's adjuvant.

The mucosal immune response, assessed by mucosal IgA titer, was very low. Detectable IgA levels were obtained only after administration of OVA in nanoparticles by oral route, but the antibody level was not constant.

The immunization study performed by us shows a higher immunoadjuvant capacity for antigen loaded nanoparticles compared with antigen solution after oral administration and even a performance comparable to that of a known adjuvant, Freund's adjuvant, after s.c. administration. Regarding the influence of dextran on the observed immune response, after oral administration the presence of dextran at the surface of OVA-loaded nanoparticles decisively influenced the development of the immune response.

## **PART II: LIPOSOMES**

### **4. PREPARATION AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD)-LOADED LIPOSOMES**

Liposomes were the second nanometric system proposed as protein delivery system in this thesis. The model protein chosen in this case was superoxide dismutase (SOD), an antioxidant enzyme. SOD-loaded liposomes were prepared by the film hydration method. The lipids used for the formation of lipid layers were lecithin and cholesterol. SOD encapsulation efficiency was dependent on its concentration in the hydration liquid and on the composition of the lipid layer, being approximately 7% in the selected preparation conditions.

### **5. EVALUATION OF ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF LIPOSOME ENCAPSULATED SUPEROXIDE DISMUTASE IN RATS PERITONITIS**

In order to highlight the therapeutic benefits of including SOD in liposomes, we used an *in vivo* experimental model carrageenan induced acute peritonitis in rats. The effect of SOD liposomes was compared with that of SOD solution and with the effect of administering an anti-inflammatory (diclofenac, N-nitro-L-arginine methyl ester (NAME)) or antioxidant (vitamin E) treatment. For this purpose, two separate experiments were done. The aim of the first experiment was to determine the preventive effect of the treatment (the administration was done 30 minutes before peritonitis induction) while in the second experiment the curative effect was intended (the administration was done 30 minutes after peritonitis induction). The treatment consisted in a single intra peritoneal injection of 0.5 mL/animal. Six hours after the induction of peritonitis we assessed the anti-inflammatory activity through the evaluation of bone marrow acute phase response, *in vitro* phagocytosis test and through global oxidative stress tests (total antioxidant capacity (TAC), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI)) and specific oxidative stress tests (nitrite and nitrate, malonaldehyde (MDA), plasma reduced glutathione (GSH)).

The induction of peritonitis was associated with the activation of bone marrow acute phase response, stimulation of phagocytosis, increasing levels of serum indicators of oxidative stress (TOS, OSI, nitrite and nitrate, MDA), reduced serum levels of global antioxidants (TAR) and stimulation of specific mechanisms of antioxidant defense (GSH).

The administration of SOD liposomes, either before or after peritonitis induction, lead to a significantly decrease of total leukocyte count and a reduction of phagocytosis compared with peritonitis group. SOD liposomes significantly reduced TOS level in both studies and OSI value in the preventive study, but the TAC level did not significantly increased compared with peritonitis group. Also, liposomes caused a significant decrease in the concentration of nitric oxide metabolites and significantly influenced the serum concentration of reduced glutathione without a significant decrease of lipid peroxidation.

SOD solution significantly reduced the bone marrow acute phase response and the phagocytosis, in both experiments. The effect of SOD solution on oxidative stress parameters was generally insignificant. However, SOD solution caused a significant

reduction of TOS compared with peritonitis group in the preventive study and a significant favorable effect on serum reduced glutathione levels in both studies.

Diclofenac administration before or after the induction of peritonitis resulted in significant reduction of total leukocytes and reduction of phagocytosis versus peritonitis group. Diclofenac did not significantly affect the levels of oxidative stress tests, except the TOS value in the preventive study. Administration of diclofenac did not significantly affect the synthesis of nitric oxide and lipid peroxidation, but had significant influence on serum glutathione levels.

Vitamin E, the reference antioxidant used, significantly reduced total leukocyte count and the parameters characterizing the phagocytosis. Also vitamin E significantly influenced the non-specific parameters of oxidative stress, particularly in the preventive study and less in the treatment of peritonitis. Vitamin E did not produce a significant change of nitric oxide synthesis and lipid peroxidation but influenced glutathione serum levels, in both studies.

The administration of NAME before and after induction of peritonitis significantly reduced bone marrow acute phase response and phagocytosis. Regarding the oxidative stress markers, the non-specific ones (TAC, TOS, OSI) were influenced significantly only in the preventive study while among the specific parameters NAME significantly reduced only the concentration of MDA in the preventive study.

Comparing the effectiveness of two forms of administration of SOD, free and encapsulated in liposomes, there was a positive influence of both forms on hematological and biochemical parameters associated with induction of peritonitis. Liposomes had higher activity than the solution, particularly in the preventive study. Therefore we can conclude that the encapsulation of SOD in liposomes increases the therapeutic benefits of this enzyme.

## **GENERAL CONCLUSIONS**

The researches done in this thesis demonstrate the benefits of using nanometric systems such as polymeric nanoparticles and liposomes for systemic administration of proteins. Using polymeric nanoparticles with bioadhesive properties the immunized effect of a model antigen after oral and s.c. administration was improved compared with antigen administration as a solution. Liposomes increased the therapeutic benefits of an antioxidant enzyme in an acute inflammatory process after parenteral administration.

# CURRICULUM VITAE

## PERSONAL DATA

*First name, name:* **ALINA-SILVIA PORFIRE (TUNS)**  
*Date and place of birth:* 16<sup>th</sup> of September 1981, Zalău, Sălaj  
*Nationality:* Romanian  
*Civil state:* married  
*Adress:* Cluj-Napoca, 11 Rapsodieii Street, ap. 49, Cluj, 400359–  
Romania; Tel: 0745-889030  
*E-mail:* aporfire@umfcluj.ro; alinatuns@yahoo.com

## BACKGROUND EDUCATION

- November 2005 – present PhD student, Faculty of Pharmacy, University of Medicine & Pharmacy “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, coordinator prof. dr. S.E. Leucuța;
- 2004-2005 – Masters degree in “Industrial Pharmaceutical Technology”, University of Medicine & Pharmacy “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca;
- 1999-2004 - Faculty of Pharmacy, University of Medicine & Pharmacy “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca; head of promotion, license in Pharmacy;
- 1995-1999 – Theoretical High-School Zalău, mathematics-physics class.

## PROFESIONAL EXPERIENCE

- *October 2008 – present* Teaching assistant at the Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Medicine & Pharmacy “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca;
- *January-May 2008* – research stage in the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, scholarship funded by Romanian Ministry of Education and Research, National Center for the Study Abroad Scholarship;
- *September 2006 – March 2007* - research stage in the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, scholarship funded by Socrates-Erasmus program;
- *October 2005 – September 2008* – Junior teaching assistant at the Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Medicine & Pharmacy “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca;
- *October 2004 – September 2005* – pharmacist, Rodafarm Pharmacy, Cluj-Napoca.

## AREA OF INTEREST

- formulation of nano- and microparticulate systems for protein and peptide delivery and physico-chemical characterisation of these systems;
- stability ensurance of protein and delivery system;
- evidence of the biological effects of protein loaded nanometric systems, in laboratory animals;
- in vitro studies in cell cultures.

## NATIONAL AND INTERNATIONAL COURSES AND SYMPOSIUMS

1. Symposium “*Role of pharmacist in oncological diseases patient care*”, May 2009, Cluj-Napoca, Romania.
2. 14<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium: “*Overcoming Biological Barriers in Innovative Delivery Systems*”, September 2008, Antalya, Turkey.
3. *I Jornada de Investigacion en Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad de Navarra*, May 2008, Pamplona, Spain.
4. Symposium “*Role of pharmacist in child health care*”, May 2008, Cluj-Napoca, Romania.
5. European IP – Galenos Course: SKIN BARRIER FUNCTION “*Cutaneous absorption and Environmental Factors*”, September – October 2007, Lyon, France.
6. *Curso basico animales experimentacion*, December 2006, University of Navarra, Pamplona, Spain.
7. 13<sup>th</sup> National Pharmacy Congress “*A strong pharmacy in a European Romania*”, September 2006, Cluj-Napoca, Romania.
8. VII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, October 2006, Pamplona, Spain.
9. International GALENOS Intensive Course and Workshop on *Advanced approaches to dosage forms design*, January 2006, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic.
10. Symposium “*Role of pharmacist in diabetic patient health care*”, May 2005, Cluj-Napoca, Romania.

## PUBLICATIONS

### Articles in extenso

10. **A.S. Porfire**, A.E. Pârvu, D. Daicoviciu, S.E. Leucuța. *Evaluation of antiinflammatory activity of liposome encapsulated superoxide dismutase in rats peritonitis*. *Farmacia*, 2009; 57(4): 412-423.
11. **A.S. Porfire**, I. Tomuță, J.M. Irache, S.E. Leucuța. *The influence of the formulation factors on physico-chemical properties of dextran associated Gantrez® AN nanoparticles*. *Farmacia*, 2009; 57(4): 463-472.
12. **A.S. Porfire**, V. Zabaleta, C. Gamazo, S.E. Leucuța, J.M. Irache. *Influence of dextran on the bioadhesive properties of poly(anhydride) nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009; [doi:10.1016/j.ijpharm.2009.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.017).

### Papers presented and/or published in abstracts

1. **Alina S. Porfire**, Virginia Zabaleta, Carlos Gamazo, Juan M. Irache, Sorin E. Leucuta. *Polymeric nanoparticles for oral drug delivery*. 13<sup>th</sup> IUPAC International Conference on Polymers and Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> -9<sup>th</sup> July 2009, Montreal, Canada.
2. **A.S. Porfire**, V. Zabaleta, C. Gamazo, S.E. Leucuța, J.M. Irache. *Poly(anhydride)-Dextran 40-based nanoparticles for oral antigen delivery*. Young pharmaceutical scientists meet in Nice, 7<sup>th</sup> -8<sup>th</sup> June, Nice, France.
13. **A.S. Porfire**, S.E. Leucuta, C. Gamazo, J.M. Irache. *Nanoparticule din Gantrez® AN asociate cu dextran pentru imunizare pe cale orală*. Zilele Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, December 2008.

14. **A.S. Porfire**, S.E. Leucuța, C. Gamazo, J.M. Irache. *Dextran associated Gantrez<sup>®</sup> AN nanoparticles for oral antigen delivery*. 14<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 6<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup> September 2008, Antalya, Turkey.
15. **A.S. Tuns**, S.E. Leucuta, J.M. Irache. *Dextran associated Gantrez<sup>®</sup> AN nanoparticles for oral antigen delivery*. I Jornada de Investigacion en Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad de Navarra, 30<sup>th</sup> May 2008, Pamplona, Spain.
16. **Alina Silvia Porfire**, Marcela Achim, S.E. Leucuta. *Superoxide Dismutase-Loaded Poly(Lactide-Co-Glicolide) Microspheres*. European IP – Galenos Course, 16<sup>th</sup> September – 2<sup>nd</sup> October 2007, Lyon, France.
17. **Porfire Alina-Silvia**, Irache J.M., Leucuta S.E. *Prepararea și caracterizarea unor nanoparticule din Gantrez<sup>®</sup> AN asociate cu dextran*. Zilele Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, December 2007.
18. **Alina Tuns**, Marcela Achim, Cristina Crăciun, S.E. Leucuța. *Preparation of superoxide dismutase - loaded poly(lactide-co-glicolide) microspheres by the double emulsion solvent evaporation method*. The 13<sup>th</sup> National Congress of Pharmacy 2006”, 27-30 September 2006, Cluj-Napoca, Romania.

## RESEARCH PROJECTS

1. **CNCSIS TD\_278/2007**: “*Polymeric nano- and microparticulate systems used for peptide targeting and controlled release*”; director of the project.
2. **CNCSIS IDEAS ID\_457/2007**: “*Screening of technological and formula variables for modification of drugs pharmacokinetics and biological actions for synthesis of modern pharmaceutical forms*”; member of the research team.
3. **CNMP 41\_072/2007**: “*Development of a new therapy for neuroprotection ensurance in cerebral ischaemia by interdisciplinary research*”; member of the research team.
4. **CNCSIS AT 94/2007**: “*Development and optimization of formulation and preparation of a pharmaceutical system for oral use with specific targeting and release of the active ingredient in the colon*”; member of the research team.

## MEMBER OF PROFESSIONAL SOCIETIES

- College of Pharmacists from Romania
- Romanian Society of Pharmaceutical Sciences

## FOREIGN LANGUAGES

- English – good
- Spanish and French - medium