

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE  
DIPARTIMENTO DI FARMACIA  
LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

---

FORME FARMACEUTICHE INNOVATIVE CONTENENTI  
INSULINA PER IL TRATTAMENTO DEL DIABETE

*Candidato*

Alberto Giraldi

*Relatrice:* Prof.ssa Eleonora Russo

---

Anno Accademico 2020-2021

# Indice

<b>1. Introduzione</b>	
<b>2. Trattamento del diabete</b>	<b>pag 5</b>
2.1. Metformina	pag 6
2.2. Sulfoniluree	pag 6
2.3. Glinidi	pag 7
2.4. Tiazolidindioni	pag 7
2.5. Agonisti, simili al glucagone, del recettore del peptide-1 (GLP-1 RA) e inibitori della dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4)	pag 8
2.6. Inibitori SGLT2 (cotrasportatore sodio-glucosio)	pag 9
2.7. Insulina	pag 9
<b>3. Vie di somministrazione</b>	<b>pag 10</b>
3.1 Somministrazione orale di insulina	pag 11
3.1.1 Carrier sensibili al pH	pag 12
3.1.2 Carrier magneticamente sensibili	pag 15
3.1.3 Carrier sensibili al glucosio	pag 15
3.2 Somministrazione intranasale di insulina	pag 16
3.2.1. Sistemi sensibili alla temperatura	pag 16
3.2.2Sistemi sensibili al pH	pag 17
3.3 Somministrazione polmonare di insulina	pag 17
3.4 Somministrazione sottocutanea	pag 18
3.4.1. Terapia con pompa insulinica	pag 18
3.4.2. Pancreas artificiale	pag 20
3.4.3Trapianto di cellule insulari	pag 21
<b>4.Somministrazione transdermica di insulina</b>	<b>pag 24</b>
4.1 Somministrazione transdermica promossa da stimolatori chimici	pag 25
4.2 Somministrazione transdermica facilitata elettricamente	pag 27
4.2.1 Ionoforesi	pag 28
4.2.2 Elettroporazione	pag 30
4.3 Somministrazione di insulina transdermica attivata da forza meccanica	pag 32
4.3.1 Ultrasuoni	pag 33
4.3.2 Iniezione a getto	pag 36

4.4 Somministrazione transdermica di insulina mediante microaghi (MD)	pag 37
4.4.1 Microaghi solidi	pag 38
4.4.2 Microaghi cavi	pag 39
4.4.3 Microaghi che si dissolvono	pag 40
4.4.4 Microaghi degradabili	pag 43
4.4.5 Microaghi bioreattivi	pag 46
<b>5. Conclusioni e prospettive</b>	<b>pag 51</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag 52</b>

## **Introduzione**

Il diabete mellito è una malattia endocrina caratterizzata da livelli elevati di glucosio nel sangue (iperglicemia), che alla fine portano a numerose complicazioni gravi e persino fatali. È causato dalla produzione di insulina insufficiente o assente a causa della distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas (diabete di tipo 1) o dalla ridotta sensibilità all'insulina, seguita da una secrezione insufficiente di insulina a causa del progressivo esaurimento delle cellule  $\beta$  (tipo 2 diabete) [1]. Gli attuali standard di cura per i pazienti con diabete di tipo 1 o 2 prevedono la somministrazione di insulina, un peptide di 51 aminoacidi [2]. In risposta all'iperglicemia, l'insulina regola i livelli di glucosio nel sangue stimolando le cellule del corpo, in particolare le cellule del fegato e dei muscoli scheletrici, ad assorbire il glucosio dal sangue [3].

Attualmente, il diabete è una delle più grandi minacce per la salute globale ed è inclusa tra le prime 3 malattie non trasmissibili che rappresentano oltre l'80% di tutti i decessi prematuri correlati a tali malattie; inoltre, esso è tra le prime 10 cause di morte nel mondo. La sua incidenza globale è cresciuta rapidamente negli ultimi decenni.

Secondo l'edizione più recente della International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas [4], 425 milioni di persone tra i 20 e i 79 anni hanno il diabete (incidenza 8,8%) e questo valore sale a 451 milioni con l'età, se il range viene ampliato alle persone dai 18 ai 99 anni. Questo forte aumento del diabete è il risultato della crescita della popolazione, dell'invecchiamento e della transizione economica dai livelli di reddito bassi a livelli medio-alti. Nelle diverse nazioni il diabete varia a seconda dei livelli di urbanizzazione, di obesità e di denutrizione. I 3 paesi con il maggior numero di persone con diabete nel 2017 erano Cina, India e Stati Uniti. Inoltre, si stima che circa il 50% (212,4 milioni) degli adulti con diabete non siano diagnosticati. Pertanto, è molto importante la prevenzione in questo tipo di malattia e successivamente indicare la giusta terapia.

La classificazione del diabete è complessa, ma ora è ampiamente riconosciuto che ci siano tre tipi principali di diabete: il diabete mellito di tipo 1 (T1DM), il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e il diabete gestazionale mellito (GDM). Inoltre, ci sono anche alcuni tipi meno comuni che includono il diabete monogenico e il diabete secondario. Il tipo più comune di diabete è il T2DM e rappresenta circa il 90% di tutti i casi di diabete. I pazienti con T2DM hanno un aumento dei tassi di complicanze micro e macro-vascolari che contribuiscono ad aumentare la prematura mortalità e la minore qualità della vita. Inoltre, si è evidenziato come il controllo del diabete rimanga insoddisfacente: secondo il National Health and Nutrition Examination le indagini condotte negli Stati Uniti dal 2003 al 2006, hanno dimostrato che solo il 58,2% delle persone ha raggiunto valori discreti di glicemia dopo trattamento farmacologico [5].

Per quanto riguarda il controllo dei fattori di rischio cardiovascolare tra i pazienti con T2DM [6] si è visto che un controllo glicemico insoddisfacente sia correlato a invalidità prematura e morte, oltretutto a maggiori rischi per cancro, disabilità cognitiva e depressione [7]. Per esempio, le persone con diabete hanno una probabilità 10 volte maggiore di sviluppare malattie renali allo stadio terminale e da 2 a 3 volte più probabilità di avere malattie cardiovascolari [8]. Inoltre, circa il 35% delle persone con diabete ha la retinopatia diabetica, che è la principale causa di cecità [9].

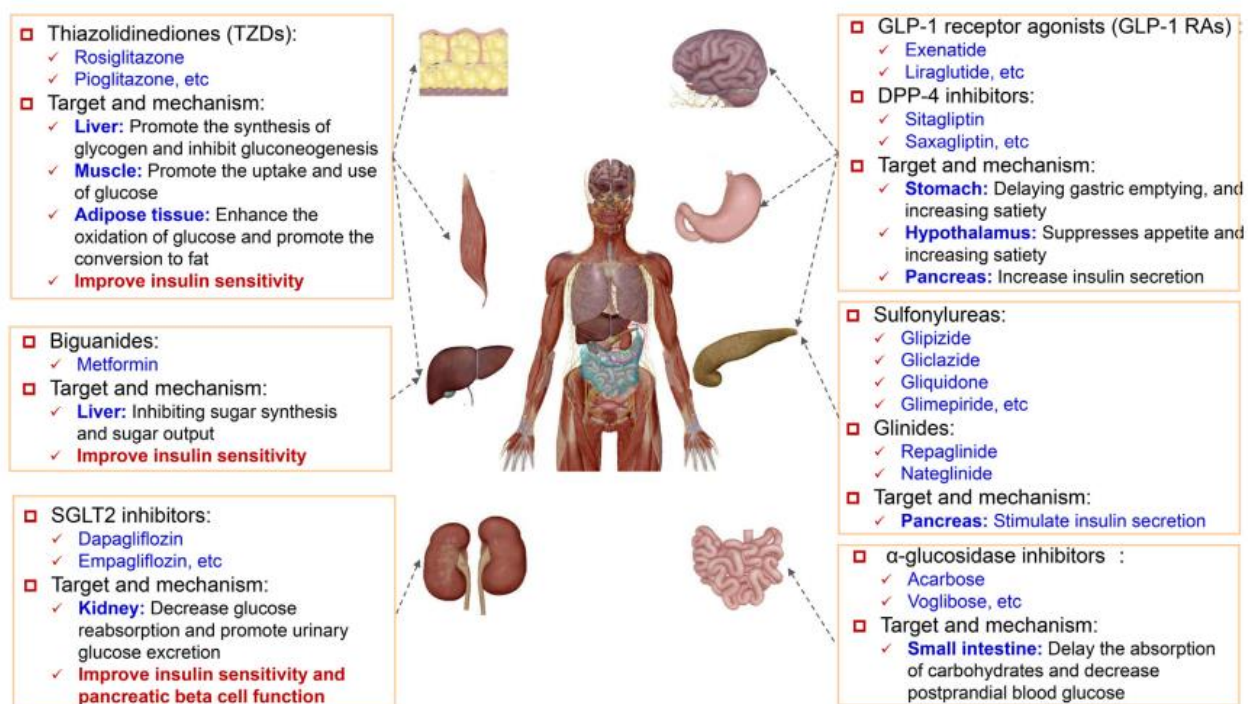
È importante sottolineare che il diabete rappresenta circa il 10,7% della mortalità globale per tutte le cause e che è superiore al tasso di mortalità associato alle malattie infettive. Nel 2017 circa 4 milioni di morti tra le età di 20 e 79 anni sono state attribuite al diabete [10]. Oltre al fatto che tale malattia grava notevolmente sullo stile di vita delle persone, presenta anche elevati livelli economici che devono essere sostenuti dai sistemi sanitari dei diversi Paesi.

Un'analisi economica globale, che ha utilizzato dati epidemiologici e dati demografici di 180 paesi nel 2015, indicava che i costi del diabete sono enormi e continueranno ad aumentare [11].

## 2. Trattamento del diabete

I farmaci antidiabetici sono fondamentali per la gestione del T2DM.

Gli attuali farmaci antidiabetici comunemente usati includono le seguenti categorie: metformina, sulfoniluree, glinidi, tiazolidinedioni, inibitori dell' $\alpha$ -glucosidasi, agenti a base di incretina, inibitori della dipetidil-peptidasi 4, inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT-2) e insulina (figura 1).



**Figura 1:** organi bersaglio e meccanismo dei diversi tipi di farmaci antidiabetici. [12]

## 2.1. Metformina

Essendo l'unico tipo di biguanide approvato per il trattamento clinico del diabete [13], la metformina rimane il trattamento di prima linea per i pazienti obesi [14]. La metformina non viene utilizzata solo per il controllo del livello glicemico dei pazienti con T2DM ma anche per ritardare o prevenire la progressione di alterata glicemia a digiuno e ridotta tolleranza al glucosio in T2DM [15]. Il meccanismo ipoglicemico della metformina non lo si è ancora pienamente compreso [16]. Tradizionalmente si pensa che la metformina aumenti la sensibilità all'insulina riducendo la produzione di glucosio epatico. La metformina inibisce il complesso mitocondriale I, prevenendo la produzione di ATP, aumentando così i rapporti AMP/ATP e ADP/ATP, attivando così la AMP activated protein chinasi (AMPK), che influiscono sul metabolismo energetico. Inibisce anche la fruttosio-1,6-bisfosfatasi, con conseguente inibizione acuta della gluconeogenesi. Inoltre, ci sono prove crescenti su come la metformina possa influire sul metabolismo del glucosio attraverso azioni sull'intestino. La metformina aumenterebbe l'utilizzo di glucosio nell'intestino, la secrezione di GLP-1 e altererebbe il microbioma intestinale.

Secondo il Prospective Diabetes inglese (UKPDS), la metformina può ridurre l'emoglobina glicata dell'1%, in particolare negli individui obesi [17]. La metformina non solo aiuta ad abbassare il peso dei pazienti ma anche (e soprattutto) riduce notevolmente la mortalità correlata al T2DM. Secondo la Associazione Europea per lo Studio del Diabete e l'American Diabetes Association, la metformina è raccomandata come trattamento di base per T2DM in combinazione con dieta ed esercizio [18].

Numerosi studi clinici hanno utilizzato la metformina come farmaco di base [19] e le reazioni avverse più comuni erano gastrointestinali e più della metà dei pazienti era in grado di tollerare la dose massima; tuttavia, si è verificato che il 5% dei pazienti non era in grado di tollerare alcuna dose di metformina [20].

## 2.2. Sulfoniluree

Le sulfoniluree sono un tipo di farmaci secretagoghi dell'insulina e la loro azione avviene a livello delle cellule insulari del pancreas, che vengono stimolate a produrre maggiori quantità di insulina.

La loro azione è mediata dai canali del potassio dipendenti dall'adenosina trifosfato (K-ATP) [21].

Le sulfoniluree possono inibire i canali K-ATP, quindi portare all'apertura di canali  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti, con conseguente afflusso intracellulare di  $Ca^{2+}$  che stimola la secrezione di insulina nelle cellule  $\beta$ .

I farmaci sulfonilureici comprendono principalmente due generazioni. Gli agenti di prima generazione includono tolbutamide, tolacarburea, clorpropamide ed esaidrourea acetato, e gli agenti di seconda generazione includono glibenazide, glipizide, glizide, e glimetazide. Rispetto ai farmaci di prima generazione, quelli di seconda generazione hanno effetti più marcati, durata d'azione più lunga e meno reazioni avverse. La reazione avversa più comune alle sulfoniluree è l'ipoglicemia, seguita da aumento di peso [22]. Ipoglicemia si osserva comunemente nei pazienti che assumono sulfoniluree a lunga durata d'azione (ad es. glibenclamide).

### **2.3. Glinidi**

Le Glinidi, tra cui repaglinide, nateglinide e mitiglinide, hanno attività secretagoga dell'insulina a digiuno e possono imitare l'insulina nella fase iniziale di rilascio, fornendo così un migliore controllo del glucosio postprandiale [23].

Rispetto alle sulfoniluree, le glinidi hanno mostrato una velocità maggiore e più breve attività insulintropica tramite il legame dei siti distinti sulla membrana  $\beta$ -cellulare del pancreas [24]. Gli studi clinici hanno dimostrato attività sia come monoterapia che in terapia combinata [25]. Rispetto a gliclazide (30 mg, una volta al giorno), repaglinide (1 mg, tre volte al giorno) può aumentare in modo più significativo i livelli di insulina nei pazienti 30 minuti dopo un pasto standard [26]. Gli studi clinici hanno dimostrato che con terapia di repaglinide l'incidenza dell'ipoglicemia è rara [27]. Per la sua rapida e breve azione insulintropica, glinide può ridurre la glicemia postprandiale; associare dieta ed esercizio fisico adeguati risulta estremamente importante per mantenere il controllo glicemico a lungo termine.

### **2.4. Tiazolidindioni**

I tiazolidindioni (TZD) sono agenti insulino-sensibilizzanti che agiscono come agonisti al recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR- $\gamma$ ), portando così a miglioramenti nella sensibilità all'insulina, soprattutto nei tessuti periferici. I TZD possono promuovere la sintesi di glicogeno e inibiscono la gluconeogenesi nel fegato. Inoltre, possono migliorare l'ossidazione del glucosio e promuovere la conversione in grasso nel tessuto adiposo [28]. I TZD possono anche promuovere l'assorbimento e l'utilizzazione del glucosio nel muscolo scheletrico. Il loro effetto insulino-sensibilizzante non si esplica solo nelle condizioni diabetiche ma anche in alcune condizioni non diabetiche come obesità [29]. I TZD includono rosiglitazone, pioglitazone e troglitazone. Il troglitazone è stato vietato per uso clinico a causa della sua epatotossicità.

Rosiglitazone e pioglitazone sono i più comunemente usati. Negli studi clinici, i TZD ed in particolare rosiglitazone ha mostrato una più spiccata capacità di controllare la glicemia nei pazienti di nuova diagnosi con T2DM rispetto a gliburide e metformina [30]. Inoltre, i TZD possono anche

inibire l'apoptosi delle cellule  $\beta$  e proteggere la funzione stessa di queste cellule, in tal modo ritardando efficacemente il decorso del diabete, tutto ciò è stato verificato in modelli animali [31]. Sebbene i TZD abbiano eccellenti effetti ipoglicemizzanti e buona regolazione dei lipidi, esistono dubbi sulla loro applicazione a causa dei loro effetti collaterali a livello cardiovascolari [32], anche se studi recenti hanno confermato che non vi è nessuna evidenza scientifica che un aumento di rosigitazione determini un rischio di eventi cardiovascolari; piuttosto, i dati hanno evidenziato i suoi benefici ipoglicemizzanti [33].

## **2.5. Agonisti, simili al glucagone, del recettore del peptide-1 (GLP-1 RA) e inibitori della dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4)**

Le incretine sono ormoni (*GLP-1 Glucagon-like peptide 1* e *GIP Gastric inhibitory peptide*) che giocano un ruolo importante nell'omeostasi del glucosio. Il GLP-1 è secreto dalle cellule L dell'intestino in risposta all'ingestione di cibo. Entrambi gli ormoni mediano gli effetti della diminuzione del glucosio aumentando la secrezione di insulina glucosio-dipendente, diminuendo la secrezione di glucagone, ritardando lo svuotamento gastrico e aumentando la sensazione di sazietà [34]. Gli agonisti (GLP-1 RA) del recettore del GLP-1 sono analoghi sintetici del GLP-1 avendo proprietà farmacocinetiche diverse rispetto ai peptidi naturali [35].

Attualmente, ci sono 6 RA GLP-1 approvati per il trattamento del T2DM, tra cui exenatide due volte al giorno, liraglutide una volta al giorno, lixisenatide una volta alla settimana, exenatide a rilascio prolungato, dulaglutide, albiglutide e semaglutide [36].

Il GLP-1 endogeno può essere rapidamente degradato dall'enzima DPP-4.

Gli inibitori della DPP-4 aumentano il GLP-1 endogeno prevenendo la sua degradazione, svolgendo così il ruolo di ipoglicemizzante [37].

Inibitori della DPP-4 includono sitagliptin, saxagliptin e linagliptin. Test clinici hanno dimostrato che gli inibitori del GLP-1 RA e DPP-4 si riducono significativamente a digiuno e in seguito a iperglicemia postprandiale. GLP-1 RA può ridurre l'HbA1c (emoglobina glicata) dallo 0,3% all'1,9% [38], mentre gli inibitori della DPP-4 hanno ridotto HbA1c dallo 0,6% all'1,1% [39]. Sia GLP-1 RA che inibitori DPP-4 mostrano sicurezza soddisfacente, tollerabilità e basso rischio di ipoglicemia a causa del loro meccanismo d'azione dipendente dal glucosio [40]. Gli effetti avversi più frequentemente riportati da GLP-1 RA sono disturbi gastrointestinali, che tendono ad essere alleviati con il procedere del trattamento [41]. La rinofaringite è l'evento avverso associato più frequentemente al trattamento con inibitori DPP-4. Per quanto riguarda gli effetti di questi due tipi di farmaci sugli esiti cardiovascolari, una recente meta-analisi ha dimostrato che gli agonisti del GLP-1 sono associati a un tasso di mortalità inferiore rispetto agli inibitori del DPP-4. Tuttavia,



l'uso di inibitori della DPP-4 non era associato a un tasso di mortalità inferiore rispetto al placebo o a nessun trattamento [42].

## **2.6. Inibitori SGLT2 (cotrasportatore sodio-glucosio)**

Gli inibitori SGLT2 riducono l'iperglicemia favorendo l'escrezione di glucosio dal rene. SGLT è una famiglia di trasportatori di glucosio, tra cui SGLT1 e SGLT2, che sono fondamentali per l'omeostasi del glucosio. SGLT2 svolge la sua azione sui tubuli renali prossimali ed è responsabile del trasporto del D-glucosio [43]. Esso è responsabile del 90% del riassorbimento del glucosio dell'urina originale [44]. Nei pazienti con diabete, il SGLT2 nel tubulo prossimale è molto concentrato e il riassorbimento del glucosio è aumentato, con conseguente aumento della glicemia [45]. Gli inibitori SGLT2 riducono dal 30% al 50% il riassorbimento del glucosio e quindi producono un effetto ipoglicemizzante [46]. Oltre all'effetto ipoglicemizzante, l'inibizione di SGLT2 provoca anche una serie di cambiamenti fisiopatologici. L'inibizione di SGLT2 può migliorare la resistenza all'insulina e la funzione delle cellule  $\beta$  delle isole pancreatiche [47], aumentare i livelli plasmatici di glucagone [48] e migliorare la filtrazione glomerulare durante la fase iniziale della malattia renale diabetica [49]. Secondo precedenti studi clinici, se utilizzati in monoterapia o in combinazione con altri agenti ipoglicemizzanti, gli inibitori SGLT2 possono migliorare significativamente la glicemia [50], la pressione sanguigna [51] e ridurre il peso [52].

Gli inibitori SGLT2 (o gliflozine) includono tre molecole l'empagliflozin, il canagliflozin e il dapagliflozin, approvati in Italia per il trattamento del diabete di tipo 2 in mono-somministrazione giornaliera.

I principali effetti avversi di queste molecole sono risultati essere infezioni delle vie urinarie e infezioni ai genitali. Gli altri rari effetti avversi comprendono capogiri posturali, ipotensione ortostatica, aumento dell'escrezione urinaria di calcio, frattura e chetoacidosi [53]. Tuttavia, gli inibitori SGLT2 sono risultati ben tollerati.

## **2.7. Insulina**

La terapia insulinica è un trattamento salvavita per il controllo dell'iperglicemia nel diabete mellito [54]. I pazienti che soffrono di diabete mellito di tipo 1 sono insulino-dipendenti [55] e i rischi di complicanze macrovascolari e microvascolari potrebbero essere ridotte dall'insulina [56].

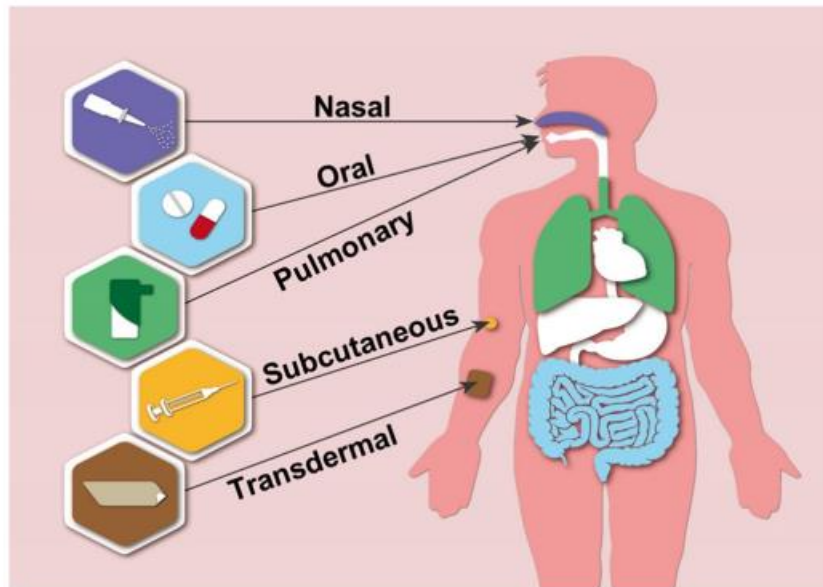
Il trattamento con insulina può essere iniziato anche nei i pazienti con diabete di tipo 2 che hanno controindicazioni al trattamento con antidiabetici orali o che i loro livelli di glucosio nel sangue non soddisfano il controllo target dopo terapia combinata di ipoglicemizzante orale e miglioramento

dello stile di vita [57]. Per gli individui con un lungo decorso di diabete mellito, la terapia insulinica potrebbe diventare parte indispensabile delle misure di omeostasi del glucosio. Negli ultimi 100 anni si è assistito al passaggio dalla scoperta dell'insulina all'applicazione commerciale dei preparati insulinici e dei suoi analoghi [58]. In generale, ci sono tre fonti principali di preparati insulinici basati su diverse tecniche di produzione: insulina animale, insulina umana e analoghi dell'insulina. Secondo i diversi ruoli della sua azione, i preparati a base di insulina sono ulteriormente suddivisi in tre categorie: insuline ad azione rapida, insuline ad azione prolungata e insuline premiscelate [59]. Le insuline ad azione rapida sono utilizzate principalmente per la gestione di glicemia durante i pasti, mentre le insuline ad azione prolungata per l'insulina basale giornaliera [60]. Considerando gli inconvenienti occorsi nel trattamento sottocutaneo, negli ultimi decenni sono stati fatti numerosi tentativi per l'applicazione di pompe ad infusione continua di insulina [61]. Di massima importanza sono i progressi ottenuti per la somministrazione automatizzata di insulina a circuito chiuso [62]. Vale la pena notare che, rispetto ai farmaci orali, la terapia insulinica richiede più collaborazione tra il personale medico e i pazienti, e più capacità di automonitoraggio del glucosio da parte dei pazienti stessi [63]. Ulteriore attenzione è richiesta anche per rafforzare il monitoraggio della glicemia e l'aggiustamento posologico per evitare eventi di ipoglicemia [64].

I trattamenti ideali per la cura del diabete dovrebbero essere sicuri, efficienti, convenienti, economici e con una elevata compliance da parte del paziente. Pertanto, innovazioni nella via di somministrazione dei farmaci sono auspicabili al fine di ottenere un migliore controllo della malattia. Scopo di questa tesi è quello di considerare le diverse e più importanti vie di somministrazione dell'insulina, passare in rassegna le forme farmaceutiche più innovative che sono presenti in letteratura ma che possono rappresentare un concreto utilizzo in clinica per gli ottimi risultati ottenuti nella ricerca scientifica.

### **3. Vie di somministrazione**

In figura 2 vengono mostrate le vie alternative per la somministrazione di insulina (tra cui orale, intranasale, polmonare, sottocutanea e transdermica) in cui si utilizzano vari sistemi di micro e nanocarrier che rispondono agli stimoli regolati dall'ambiente o dall'esterno. L'incapsulamento dell'insulina in questi carrier reattivi può essere utile per eliminare la necessità di frequenti iniezioni sottocutanee, migliorando la sicurezza e la compliance del paziente [65].



**Figura 2:** Vie di somministrazione alternative per l'insulina per il trattamento del diabete, comprese quelle nasali, orali, polmonari, sottocutanee e transdermiche [66].

### 3.1 Somministrazione orale di insulina

La somministrazione orale di agenti terapeutici rimane il percorso più adatto per il paziente, in quanto non invasivo ed economicamente conveniente.

Tuttavia, la somministrazione orale di farmaci peptidici/proteici come l'insulina è molto impegnativa, poiché queste macromolecole idrofile devono superare diverse sfide importanti nel tratto gastrointestinale (GI), come un basso pH e le idrolisi da parte di proteasi [67].

Inoltre, la permeabilità dei farmaci peptidici/proteici attraverso l'epitelio intestinale, caratterizzato da uno strato mucoso, a causa del loro alto peso molecolare e della loro idrofilia, è piuttosto bassa [68]. È quindi necessario un sistema di trasporto che preservi la concentrazione degli agenti terapeutici contro lo sfavorevole ambiente gastrointestinale, che faciliti il passaggio attraverso la barriera epiteliale e il trasporto nella circolazione sistemica.

L'assorbimento dei farmaci attraverso la barriera epiteliale può verificarsi per via trans-cellulare o per diffusione para-cellulare [69]. Tuttavia, i farmaci peptidici/proteici idrofili non possono diffondere direttamente attraverso il doppio strato lipidico idrofobico delle membrane delle cellule epiteliali, dunque il trasporto di farmaci attraverso la via para-cellulare è fortemente limitato dalla presenza di giunzioni strette presenti sulle cellule epiteliali adiacenti [70].

Sono stati studiati diversi promotori della permeazione intestinale, che facilitassero l'assorbimento del farmaco attraverso le vie trans-cellulari e/o para-cellulari [71].

Tra questi i carrier polimerici sensibili a stimoli specifici, che controllano il rilascio di insulina e migliorano la sua disponibilità ( a seconda del pH, della concentrazione di glucosio o in base a stimoli esterni).

### 3.1.1 Carrier sensibili al pH

I valori di pH nel tratto gastrointestinale salgono rapidamente da valori altamente acidi (pH 1,0–3,0) nello stomaco, fino a pH 6,0–6,5 nel duodeno, per poi aumentare ulteriormente a neutro o leggermente alcalino lungo il digiuno e ileo (pH 7,0–7,5) [72].

Sono state studiate varie microparticelle (MP) e nanoparticelle (NP) come sistemi di trasporto, che funzionano come interruttori on-off intelligenti per il rilascio controllato di insulina in modo correlato al pH nel tratto GI [73].

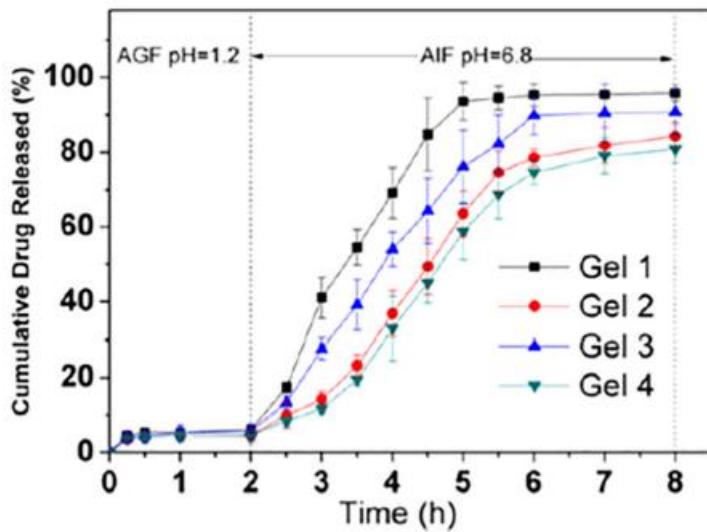
Questi vettori che rispondono al pH sono stabili, e possono proteggere le proteine che sono incapsulate quando si trovano in condizioni acide nell'ambiente gastrico, pur consentendo il rilascio quando incontrano un pH neutro nell' intestino.

La reattività di un sistema di trasporto in risposta al pH è solitamente causata da gruppi funzionali debolmente acidi o basici presenti sulla struttura dei materiali polimerici, come l'acido poliacrilico (PAA) e il chitosano (CS), le cui cariche elettrostatiche sono regolate in risposta ai cambiamenti del pH che si verificano nei diversi ambienti [74].

PAA, è un polimero biocompatibile che contiene gruppi di acido carbossilico che possono legarsi con gli ioni  $Ca^{2+}$  presenti nel fluido intestinale e nello strato di muco [75]. L'insulina è molto sensibile alla tripsina e alla chimotripsina, che sono enzimi  $Ca^{2+}$ -dipendenti presenti a livello del tratto GI [76]. Un metodo per inibire l'attività degli enzimi proteolitici intestinali è quello di rimuovere gli ioni  $Ca^{2+}$  dalle strutture enzimatiche [77]. La rimozione degli ioni  $Ca^{2+}$  extracellulari può andare anche a compromettere le giunzioni strette intercellulari, aumentando la permeabilità para-cellulare [78].

CS è un altro polimero di origine naturale, ampiamente utilizzato come eccipiente nella somministrazione orale di farmaci [79]. CS è un noto agente mucoadesivo che è stato utilizzato come promotore della permeazione para-cellulare, perché è in grado di aprire le giunzioni strette epiteliali in modo reversibile per aumentare l'assorbimento intestinale di macromolecole terapeuticamente attive [80]. Alcuni ricercatori hanno preparato un idrogel a base di PAA, come sistema di trasporto reattivo al pH, al fine di somministrare l'insulina per via orale [81]. Il valore della pKa dato dai gruppi acidi carbossilici presenti sul PAA è di circa 4,5 così che le molecole di insulina possono essere protette con questo sistema di trasporto nell'ambiente acido dello stomaco. I gruppi di acido carbossilico presenti sul PAA vengono deprotonati a contatto con il pH neutro

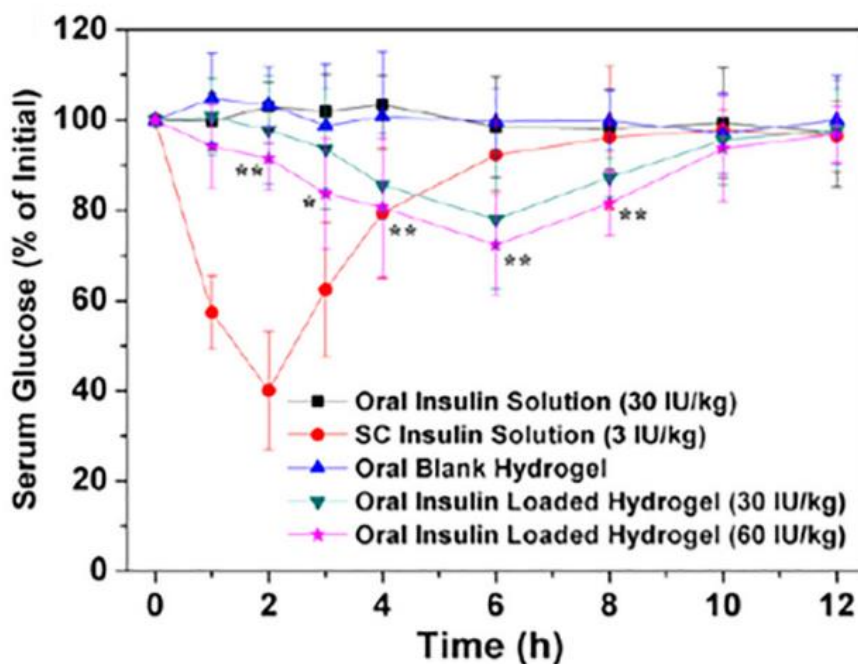
dell'intestino tenue, generando repulsione elettrostatica tra le catene polimeriche, consentendo il rilascio del farmaco incapsulato (Fig. 3).



**Figura 3:** Profili di rilascio di insulina da idrogel a base di PAA dopo incubazione nel liquido gastrico artificiale (AGF) per 2 ore, seguita da incubazione nel liquido intestinale artificiale (AIF) per altre 6 ore [66].

I gel caricati con insulina sono stati liofilizzati e attraverso macinazione successiva trasformati in MP con una dimensione di 100–200  $\mu\text{m}$  che sono state somministrate per via orale ai ratti con diabete indotto da streptozotocina (STZ) utilizzando un ago per sonda gastrica.

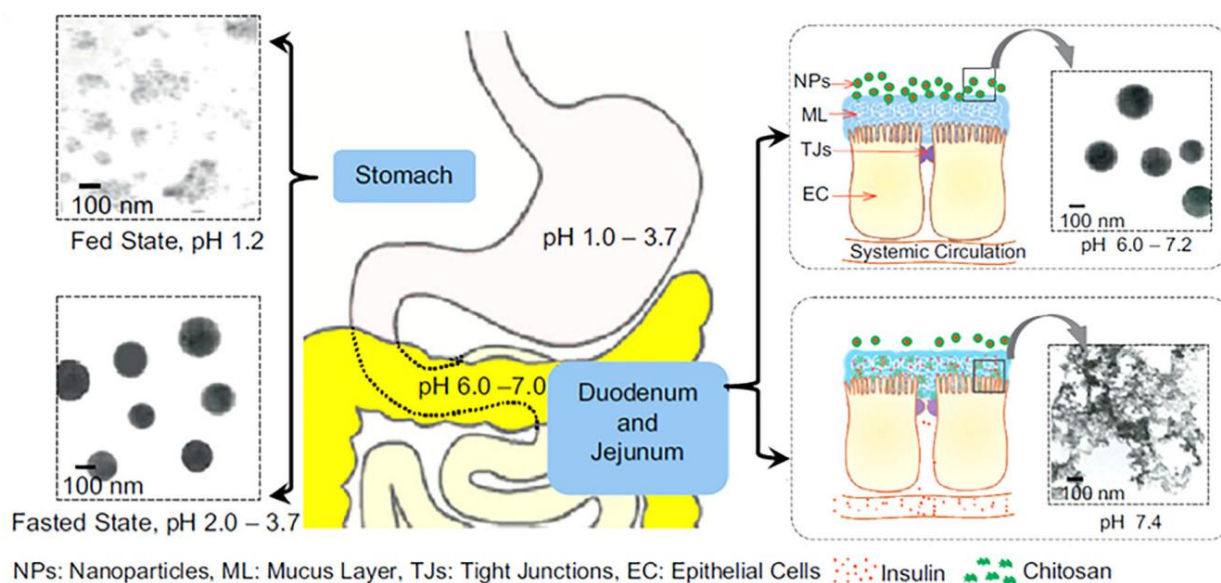
Si è osservato un continuo calo dei livelli di glucosio nel sangue, fino a 6 ore dopo la somministrazione; poi gradualmente il glucosio è tornato al livello iniziale (Fig. 4).



**Figura 4:** Livelli di glucosio nel sangue di ratti diabetici a seguito di diversi trattamenti [66].

Altri ricercatori [82] hanno preparato un sistema di somministrazione NP, che comprendeva il CS con carica positiva e l'acido  $\gamma$ -poligluttammico con carica negativa ( $\gamma$ -PGA) per la somministrazione orale di insulina. Le NP preparate erano reattive al pH, poiché il pKa di CS è di circa 6,5 [83], in ambiente con pH minore di 7,0, come il lume del duodeno, le CS NPs sono rimaste intatte, mentre a pH maggiore di 7,0, come nello strato di muco vicino agli spazi intercellulari, sono diventati instabili e si sono disgregate.

Si suppone che il meccanismo di rilascio delle NPs sia dovuto al fatto che il CS è mucoadesivo e questo favorisce l'adesione nello strato di muco che copre l'intestino tenue. Le NPs successivamente aprono transitoriamente le giunzioni strette tra le cellule epiteliali, rilasciando l'insulina caricata grazie alla loro reattività al pH. L'insulina, quindi, riesce a permeare grazie alla via para-cellulare, ed è assorbito nella circolazione sistemica, esercitando così gli effetti ipoglicemizzanti propri della molecola (fig. 5).



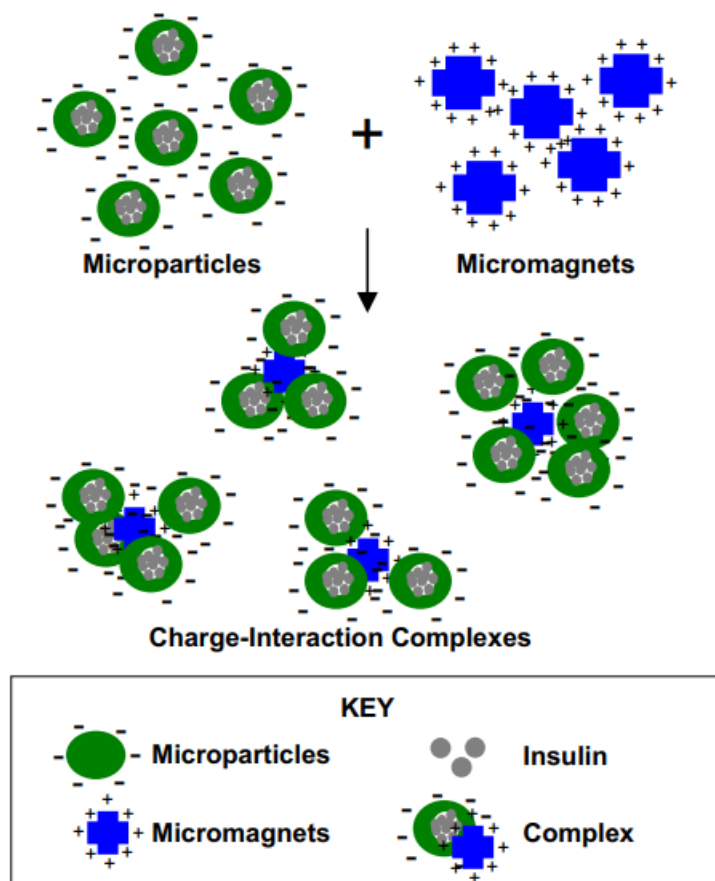
**Figura 5:** Presunto meccanismo di trasporto paracellulare di insulina rilasciata da CS NPs pH-sensibili [66].

Oltre agli esempi sopra citati, sono stati proposti altri polimeri di complessazione per la somministrazione orale di insulina, come i derivati di PAA (acido poli(metacrilico)) [84] e CS (N-trimetil CS e lauril succinile CS) [85] PAA/CS [86], PAA/liposomi [87], CS/ $\gamma$ PGA [88] e CS/alginato [89].

Sebbene la ricerca sulla somministrazione orale di insulina si sia concentrata principalmente sull'uso di carrier che rispondono al pH, sono stati proposti altri metodi che utilizzano carrier magneticamente reattivi, o reattivi al glucosio, per prolungare la ritenzione intestinale dei carrier di trasporto e per innescare il rilascio di farmaci, rispettivamente.

### 3.1.2 Carrier magneticamente sensibili

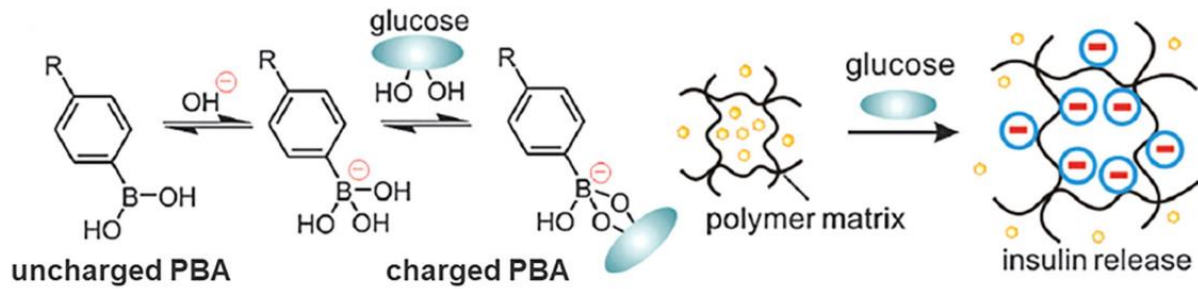
In letteratura vengono riportati alcuni studi di formulazione che utilizzano un campo magnetico esterno per localizzare e prolungare il tempo di permanenza di MP di poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), contenenti al loro interno cristalli di magnetite e insulina (fig. 6) [90]. Gli effetti ipoglicemizzanti dei vettori magneticamente reattivi sono stati valutati in un modello murino in presenza di un campo magnetico esterno applicato in modo circolare. I risultati così ottenuti, hanno rivelato che il prolungamento del tempo di permanenza intestinale dei veicoli di somministrazione dell'insulina, aumentavano l'abbassamento della glicemia, poiché la quantità di insulina rilasciata maggiormente, incrementava quella assorbita.



**Figura 6:** Schema della formazione di complessi ottenuti attraverso l'interazione di microparticelle polimeriche contenenti insulina caricate negativamente e micromagneti caricati positivamente [66].

### 3.1.3 Carrier sensibili al glucosio

I polimeri funzionalizzati con acido fenilboronico (PBA) sono stati ampiamente studiati come materiali di trasporto sensibili al glucosio per la somministrazione di insulina, a causa dell'interazione altamente specifica tra acido boronico e 1,2-dioli nel glucosio (Fig. 7) [91].



**Figura 7:** meccanismo di rilascio dell'insulina a seguito di interazione con il glucosio rilasciato da polimeri funzionalizzati con PBA [66].

È stato inoltre proposto un sistema NP sensibile al glucosio che comprende polimeri funzionalizzati con PB, come sistema alternativo per la somministrazione di insulina per via orale [92].

Per prendere di mira i recettori dei folati, i quali sono sovra-espressi sulle cellule epiteliali intestinali, viene introdotto acido folico sulle NP, facilitando la consegna di NP a livello dei recettori tramite endocitosi. Le NP preparate, rigonfiano significativamente in presenza di glucosio (Fig. 7), consentendo il rilascio di insulina.

La somministrazione orale delle NP caricate con insulina nei ratti diabetici ha avuto un efficace effetto ipoglicemizzante, con la massima depressione del livello di glucosio nel sangue dopo 5 h.

Sebbene il trattamento con insulina per via orale sia molto impegnativo, l'insulina orale sfrutta il suo assorbimento diretto nel fegato tramite circolazione portale, che è una via che replica la secrezione endogena di insulina [93]. L'assorbimento diretto dell'insulina nel fegato, come principale sito d'azione, è stato considerato fisiologicamente benefico, anche se i suoi effetti a lungo termine devono ancora essere chiariti. Al contrario, la somministrazione sottocutanea di insulina mira piuttosto al tessuto periferico rispetto al fegato, e quindi è dissimile dalla via fisiologica dell'insulina.

### 3.2 Somministrazione intranasale di insulina

#### 3.2.1. Sistemi sensibili alla temperatura

I polossameri sono copolimeri non ionici a tre blocchi poliossietilene/ poliossipropilene/ poliossietilene, con caratteristiche termosensibili [94], che sono stati formulati come gel nasali in situ in combinazione con vari agenti muco-adesivi [95]. Il meccanismo alla base della gelificazione del poloxamero coinvolge la sua micellizzazione e aggregazione micellare, che è concentrazione-dipendente e temperatura-dipendente. Alcuni ricercatori hanno studiato questi composti gelificanti in situ, in particolare un gel Poloxamer 407/CS che conteneva insulina [96]. La durata del rilascio di insulina in vitro da questo gel in situ era sei volte tanto quella con semplice Poloxamer 407. La somministrazione nasale di gel Poloxamer 407/CS in ratti con il diabete sperimentalmente indotto,



ha provocato un effetto iperglicemico prolungato. In presenza di  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), derivati quaternarizzati del chitosano come, ad esempio, trimetilchitosano (TMC) possono gelificare rapidamente in situ in risposta ad un aumento della temperatura [97]. È stato dimostrato che i gel formati da TMC/ $\beta$ -GP determinano un rilascio controllato di insulina in base alla temperatura. Negli esperimenti sugli animali, la somministrazione di insulina contenente le formulazioni di idrogel per via intranasale ha ridotto i livelli di glicemia per circa 24 h nei ratti diabetici, senza una citotossicità apparente.

### **3.2.2 Sistemi sensibili al pH**

Un altro tipo di polimero gelificante in situ, di cui si è valutata l'efficacia della somministrazione di insulina attraverso la cavità nasale è il Carbopol, un polimero dell'acido poliacrilico reticolato che mostra una transizione di fase sol-gel indotta da un pH appropriato [97]. L'insulina rilasciata dal gel nasale formulato con Carbopol viene assorbita rapidamente dopo l'applicazione.

Secondo quanto presente in letteratura, l'effetto ipoglicemizzante di questo gel che si forma in situ dura più a lungo nei ratti che nei volontari umani [98].

Questo perché la cavità nasale umana può trattenere un volume limitato di liquido (circa 200  $\mu$ L per narice) di conseguenza solo una piccola quantità della formulazione può essere somministrata per via intranasale [99]. La somministrazione di un volume di liquido eccessivo nella cavità nasale disturberebbe la normale funzionalità della mucosa. La somministrazione nasale del farmaco è, quindi, principalmente adatta per soluzioni concentrate o per farmaci potenti.

### **3.3 Somministrazione polmonare di insulina**

La somministrazione di insulina per via polmonare è stata considerata una potenziale metodologia alternativa alla terapia iniettiva sottocutanea per il trattamento del diabete.

La somministrazione di farmaci tramite inalazione polmonare, partendo dalla trachea, attraversando l'epitelio alveolare del polmone fino ad arrivare alla circolazione sistemica, può essere convenientemente realizzata utilizzando un inalatore portatile o un nebulizzatore [100].

L'epitelio alveolare è permeabile ai farmaci lipofili e idrofili, che diffondono rispettivamente attraverso la via trans-cellulare e la via para-cellulare, in modo passivo [101].

L'enorme superficie assorbente (80–120 m<sup>2</sup>) e sottile (0,2  $\mu$ m) e l'epitelio altamente vascolarizzato degli alveoli possono fornire un'elevata biodisponibilità del farmaco somministrato e una rapida insorgenza dell'azione farmacologica [102]. Inoltre, la somministrazione di farmaci attraverso la via polmonare determina un limitato e quindi vantaggioso metabolismo epatico di primo passaggio ed è

relativamente resistente alla maggior parte delle peptidasi, rendendo l'inalazione polmonare una via non invasiva e favorevole per la somministrazione di farmaci peptidici/proteici [103].

In ogni caso però, la rapida rimozione delle particelle di supporto, mediante clearance muco-ciliare da parte delle cellule epiteliali ciliate nella trachea e la fagocitosi da parte dei macrofagi, non favorisce la somministrazione polmonare di farmaci [104].

Tra le varie strategie per migliorare la somministrazione di farmaci polmonari, hanno suscitato un crescente interesse quelli che coinvolgono degli agglomerati di NP con queste caratteristiche: densità  $< 0.4 \text{ g/cm}^3$  e diametro  $> 5 \text{ }\mu\text{m}$ . La bassa densità di massa degli agglomerati NP e il piccolo diametro aerodinamico impedisce loro di subire clearance muco-ciliare e ne facilita la deposizione nelle regioni profonde del polmone, mentre la loro dimensione geometrica relativamente grande permette loro di sfuggire alla fagocitosi da parte dei macrofagi alveolari [104]. Al momento della deposizione nelle basse vie respiratorie dei polmoni e in conseguenza all'esposizione di un ambiente umido, gli agglomerati nano-compositi si dissolvono e rilasciano rapidamente le NP [105].

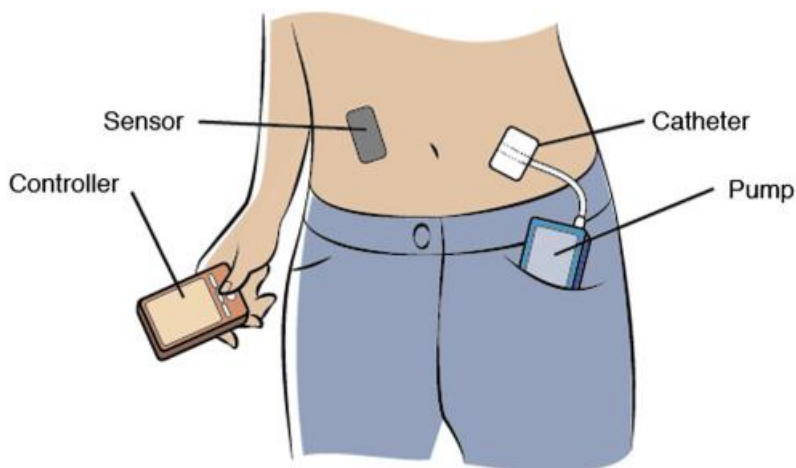
### **3.4 Somministrazione sottocutanea**

La tecnica di somministrazione sottocutanea di insulina ha compiuto progressi incoraggianti nell'ultimo decennio [106]. La modalità tradizionale di somministrazione di insulina avviene tramite iniezione sottocutanea, dove la compliance del paziente è sicuramente inferiore per il dolore, lo stress nervoso e la possibile infezione. Molti tentativi sono stati realizzati per migliorare il livello di comfort e la compliance del paziente, ad esempio come la terapia con microinfusore, il pancreas artificiale e l'impianto di cellule insulari, che possono rendere la terapia del diabete più facile, più sicura, più stabile e più confortevole. Sono tutte tecnologie che appaiono promettenti ma che non superano determinate problematiche legate al tipo di patologia.

#### **3.4.1. Terapia con pompa insulinica**

Il primo microinfusore per insulina è stato sviluppato nel 1977. Questo dispositivo, indossato esternamente, ha un catetere incorporato per via sottocutanea per erogare insulina [107].

Questo tipo di dispositivo rimane in uso nella pratica clinica, con una pompa di dimensione più piccola, una batteria con una durata maggiore, un catetere più morbido e un funzionamento più facile. Alcune pompe hanno dispositivi di controllo remoto, attraverso i quali la dose di insulina può essere impostata in base al livello di glucosio misurato nel sangue, dove la dose di insulina raccomandata viene scelta dal computer collegato (figura 8).



**Figura 8:** pompa ad infusione continua sottocutanea di insulina [108].

Rispetto all'iniezione sottocutanea di insulina, la pompa per insulina è più flessibile, è vantaggiosa in termini di farmacocinetica, e può migliorare il controllo glicemico con dosi di insulina ridotte, con meno eventi ipoglicemici.

Tuttavia, potrebbero essere correlate all'utilizzo della pompa, un aumento della frequenza di chetoacidosi diabetica e infezioni cutanee locali causate da impianto di catetere [109].

Il primo microinfusore impiantabile è stato applicato nel 1979 [110].

Questo device dovrebbe simulare la funzione del pancreas fornendo insulina attraverso un catetere posizionato all'interno della cavità peritoneale; tuttavia, lo sviluppo della pompa per insulina impiantabile non è stato regolarizzato. Le prime pompe per insulina impiantabili [107] sono state utilizzate per via endovenosa o via intraperitoneale, con l'insulina nella pompa e la punta del catetere diretto verso il fegato. L'insulina può essere ricaricata per via transcutanea tramite una porta di ricarica, da parte di medici specializzati per almeno 3 mesi, a seconda del fabbisogno di insulina di ciascun paziente. Le tecniche associate a questa apparecchiatura sono complicate, e l'insulina immagazzinata nella pompa è meno stabile di quella di un'iniezione sottocutanea.

Inoltre, è associata ad un alto rischio di trombosi e infezione. Pertanto, diverse pompe prodotte in commercio si sono guastate, e l'applicazione di questo tipo di microinfusori impiantabili rimane limitata, nonostante le sue interessanti caratteristiche tecniche [111]. In un numero limitato di pazienti, sono state osservate la sicurezza, l'efficacia e la tollerabilità di impianti di microinfusori per insulina per un uso prolungato. La soddisfazione del trattamento era superiore a quello con il trattamento sottocutaneo, e la qualità della vita correlata alla salute dei pazienti è stata elevata e stabile durante la ricerca. Tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza significativa nei livelli monitorati di HbA1c, e sono state osservate più volte situazioni iperglicemiche grazie al continuo monitoraggio dei livelli di glucosio tramite il sensore di misurazione del glucosio [112]. Diversi

studi, hanno anche riportato la comparsa di anticorpi anti-insulina in seguito all'impianto di pompe per insulina negli anni '90, che potrebbero essere correlati ad una reazione immunitaria sistemica.

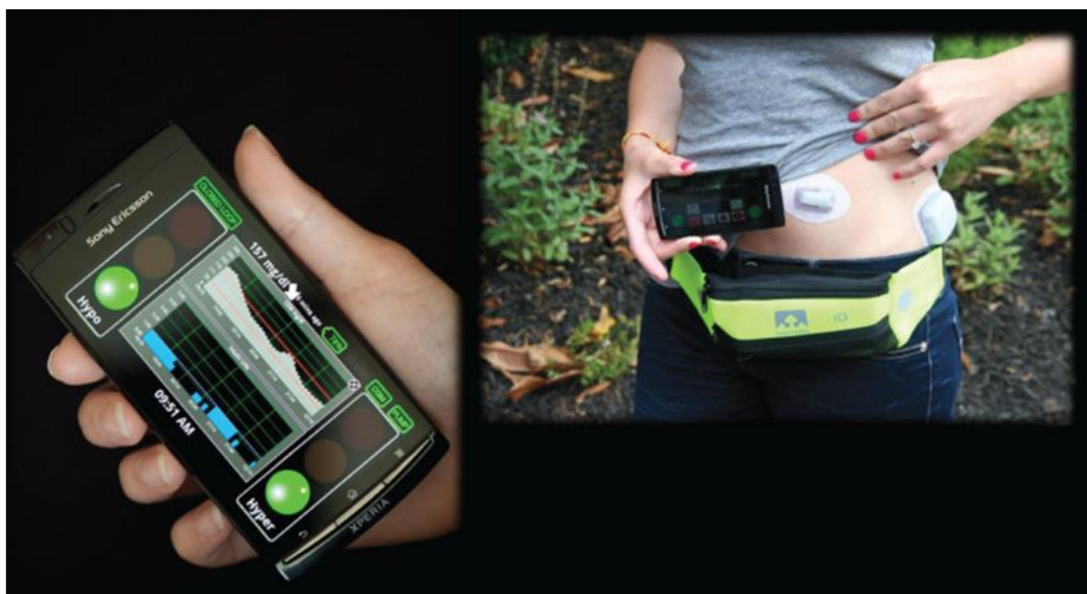
Inoltre, ci sono alcuni studi sul sistema di pompa osmotica per altri farmaci antidiabetici. ITCA 650 è un sistema di pompa osmotica in miniatura, progettata per fornire un rilascio continuo sottocutaneo di ordine zero di exenatide, ad una velocità precisa e predeterminata per un massimo di 12 mesi. Studi clinici di fase 3 hanno mostrato che, rispetto al placebo, ITCA 650 ha ridotto significativamente HbA1c e peso corporeo in pazienti con T2DM non controllati, con una HbA1c basale compresa tra il 7,5% al 10% su farmaci antidiabetici orali [113].

Uno studio successivo ha rivelato che anche ITCA 650 ha portato a miglioramenti significativi nel controllo glicemico di pazienti con diabete di tipo 2, scarsamente controllati nel lungo periodo, con HbA1c N10% basale elevato [114]. Inoltre, il trattamento con la terapia con ITCA 650 ha significativamente aumentato la compliance complessiva dei pazienti rispetto a quelli trattati con due iniezioni al giorno con exenatide [115]. Pertanto, ITCA 650 potrebbe essere in futuro un approccio terapeutico promettente per i pazienti con diabete di tipo 2.

### **3.4.2. Pancreas artificiale**

Una pompa per insulina può controllare automaticamente il rilascio di insulina a seconda del livello locale di glucosio, proprio come il pancreas naturale? Basandosi su questa idea, medici, scienziati e ingegneri hanno lavorato insieme da oltre 50 anni per sviluppare sistemi complessi automatizzati a circuito chiuso in grado di simulare la regolazione pancreatica del glucosio in individui sani.

Composto da un microinfusore per insulina, da un sensore di monitoraggio continuo della glicemia e un algoritmo di controllo, questo sistema a circuito chiuso può automaticamente rilevare il livello di glucosio e modificare di conseguenza il rilascio di insulina, proprio come il pancreas umano; pertanto, è noto come pancreas artificiale [116] (figura 9).



**Figura 9:** (sinistra) uno smartphone di nuova generazione utilizzato nei recenti studi sul pancreas artificiale ambulatoriale con gli algoritmi di controllo a circuito chiuso che operano su uno smartphone anziché su un computer portatile. (destra) una paziente che tiene lo smartphone accanto a un sistema di monitoraggio del glucosio e al microinfusore per insulina sull'addome [116]

La creazione del pancreas artificiale, questo circuito chiuso, è stato considerato un ponte verso la cura biologica per il diabete. Recentemente, sono stati ottenuti progressi ammirevoli riguardo ai sistemi di somministrazione di insulina responsivi al glucosio [117], tuttavia, rimangono molte sfide per quanto riguarda il pancreas artificiale.

In primo luogo, l'ostacolo tecnico principale è l'algoritmo che aiuta i pazienti a prendere decisioni appropriate, in tempo reale, in base al loro livello di glicemia [118]. In secondo luogo, l'accuratezza e l'affidabilità dei dati derivanti dal sistema di monitoraggio continuo della glicemia, può essere l'ostacolo più grande, che è strettamente correlato al rischio di ipoglicemia [119]. Terzo, molti stati biologici o patologici, come esercizio fisico, malattia concomitante, l'effetto dei pasti e la cinetica dell'insulina sottocutanea in diversi pazienti diabetici, influenzano l'accuratezza dell'algoritmo e di conseguenza influenzano il controllo della glicemia da parte del pancreas artificiale [120].

### 3.4.3 Trapianto di cellule insulari

Il principale obiettivo terapeutico del trattamento del diabete è quello di raggiungere una stabilità del controllo glicemico quasi normale senza ipoglicemia, l'evitare complicazioni e una qualità di vita soddisfacente [121]. Anche se esistono molti farmaci antidiabetici e sistemi di

somministrazione, raggiungere un buon controllo glicemico risulta sempre più difficile a causa del progressivo danno alle cellule beta durante il corso del diabete.

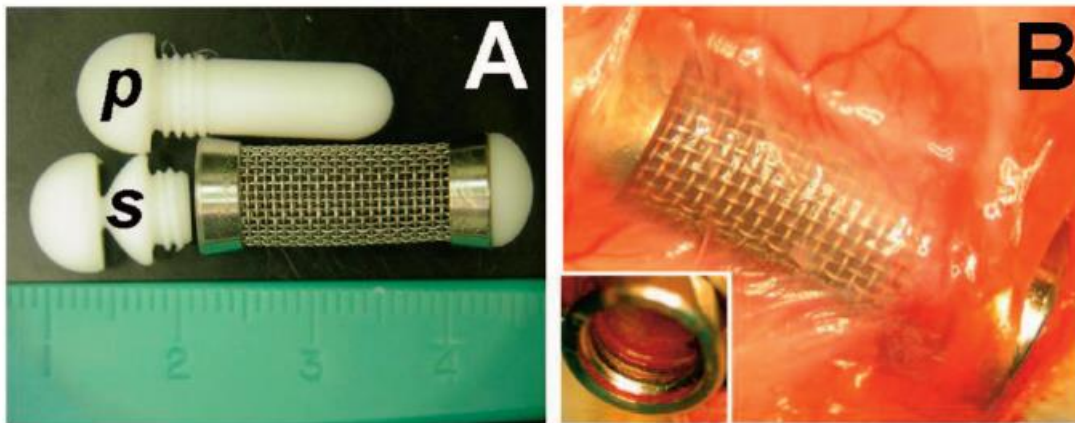
Inoltre, gli attacchi ipoglicemizzanti, secondari a uno stretto controllo glicemico, influiscono gravemente sulla qualità della vita dei pazienti diabetici. Il pancreas artificiale ha ancora molta strada da fare per avere un controllo intelligente della glicemia. Pertanto, imitare la funzione fisica del pancreas attraverso il trapianto di cellule insulari può essere l'approccio più vicino alla rappresentazione della funzione fisica di un pancreas sano. In uno studio di follow-up di cinque anni, è stata osservata una significativa riduzione di HbA1c senza ipoglicemia in tutti i 10 pazienti con diabete di tipo 1 che avevano ricevuto trapianti con infusioni di isole pancreatiche singole [122]. Pertanto, il trapianto di isole pancreatiche potrebbe diventare una strategia interessante per il trattamento del diabete mellito, in particolare per quello di tipo 1.

Tuttavia, i risultati a lungo termine del trapianto di isole sono lontani dall'essere soddisfacenti [123]. Come avviene in altri trapianti, le cellule insulari trapiantate vengono eliminate immunologicamente a causa della perdita precoce dell'innesto dell'isolotto, che potrebbe essere dovuta all'HMGB1 proteina secreta dalle cellule insulari danneggiate [124]. Gli isolotti devono mantenere la loro morfologia ed essere rivascularizzati rapidamente dopo il trapianto per preservare il rilascio di insulina stimolato dal glucosio.

Inoltre, la risorsa perfetta delle cellule insulari è ancora irrisolta. Inoltre, rischi di sanguinamento, di trombosi e l'aumento della pressione portale si sono verificati quando gli isolotti vengono impiantati tramite la vena porta nel fegato.

Come proteggere gli isolotti trapiantati dall'eliminazione da parte del sistema immunitario è diventato il primo problema associato al trapianto di isole.

I biomateriali sono stati utilizzati per incapsulare gli impianti sottocutanei a lungo termine per superare la risposta da corpo estraneo al trapianto osservata diversi decenni fa [125]. Sulla base di questa idea, alcuni biomateriali erano utilizzati per costruire un dispositivo di incapsulamento permanente che potesse essere impiantato in un corpo per proteggere le isole estranee in questo dispositivo dall'eliminazione corporea. Questo dispositivo impiantabile biocompatibile era costituito da una rete in acciaio inox, con tappi amovibili in politetrafluoroetilene su ciascuna estremità che vengono impiantate per via sottocutanea nella regione intra-capsulare e gli isolotti sono stati impiantati 40 giorni dopo utilizzando questo dispositivo. L'impianto sottocutaneo di questo dispositivo è stato ben tollerato e l'impianto ha mostrato una risposta positiva alla glicemia [126] (figura 10).



**Figura 10:** A: biocompatibile device impiantabile, B: Aspetto macroscopico del dispositivo impiantabile 80 giorni dopo il trapianto di isole che mostra abbondanti strutture vascolari e tessuto connettivo che lo incorpora. Strutture vascolari sono evidenti anche nelle pareti interne del dispositivo (inserto). Lo stesso schema è stato osservato in tutti i dispositivi rimossi a 160 giorni dal trapianto di isole [126]

Tuttavia, questi materiali sono oggetti estranei che spesso generano una capsula granulare fibrotica e inducono come risposta un'inflammatione cronica che può portare al fallimento dell'innesto. Da notare i recenti progressi in tecnologia di incapsulamento cellulare inclusa la microincapsulazione e strategie di macroincapsulazione che rendono possibile il trapianto delle isole nella clinica [127].

Gli sforzi per modificare la chimica dei biomateriali di incapsulamento, il co-trapianto con cellule in grado di modulare il sistema immunitario, sono state fatte per evitare risposte di immunosoppressione permanente dopo il trapianto di isole [127]. Per evitare gli effetti collaterali permanenti dei biomateriali estranei, una nuova tecnica consiste nel trapianto sottocutaneo senza dispositivo, che consente di eseguire con successo, il trapianto di isole di topo o di isole umane nei topi. Si posiziona un dispositivo impiantabile a livello di un sito sottocutaneo, un sito sottocutaneo prevascolarizzato composto da tessuto connettivo in cui la neo-vascularizzazione è costruita attraverso la risposta controllata dal corpo estraneo. Poi, il dispositivo impiantabile viene rimosso. Le isole sono isolate e incastonate in questa tasca artificiale e possono inibire o terminare la reazione da corpo estraneo [128]. Questo approccio è efficace nel facilitare l'impianto di cellule produttrici di insulina, dove si sono testati diversi materiali per cateteri con diverse proprietà di superficie e di diametro per ottimizzare il trattamento. A causa della carenza di donatori di pancreas umano, i ricercatori hanno prestato maggiore attenzione alle isole derivate da cellule staminali embrionali umane (hESC). e isole xenogene [129]. Tuttavia, entrambe le scelte, destano preoccupazioni. Anche se ci sono barriere da abbattere, il rapido progresso nella modulazione immunitaria, le strategie di incapsulamento cellulare, i protocolli di differenziazione delle cellule

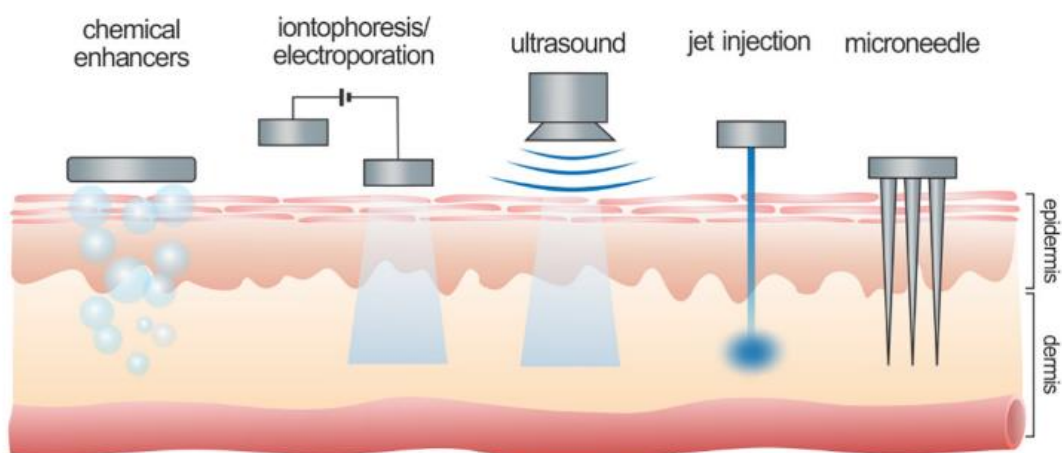
staminali, la tecnologia dei dispositivi e la tecnologia di editing genetico, rendono il trapianto di isole un approccio promettente per la cura biologica del diabete [129].

#### 4. Somministrazione transdermica di insulina

La strategia di somministrazione transdermica in cui l'insulina viene trasportata per diffusione attraverso la barriera cutanea rappresenta un metodo poco invasivo e attraente per la somministrazione di insulina in contrasto con le iniezioni ipodermiche che risultano dolorose [130]. Presenta inoltre numerosi vantaggi rispetto alle tecniche di somministrazione orale, polmonare e nasale. Ad esempio, l'insulina somministrata tramite un sistema transdermico è in grado di evitare la degradazione chimica ed enzimatica nel tratto digestivo. Questo approccio può anche fornire un rilascio prolungato per mantenere le concentrazioni terapeutiche per un tempo prolungato. Infine, la comodità di questa somministrazione può aumentare l'aderenza della terapia per il paziente, portando a un migliore controllo glicemico.

Tuttavia, l'efficace somministrazione di insulina attraverso la pelle rimane difficile a causa delle proprietà protettive intrinseche della pelle intatta. I farmaci a basso peso molecolare (<500 Da) possono penetrare facilmente nella pelle, mentre il trasporto passivo di farmaci proteici a più alto peso molecolare, come l'insulina, è significativamente limitato. Per superare le barriere cutanee nella somministrazione transdermica di insulina, sono stati esplorati vari approcci per migliorare fisicamente o chimicamente l'efficienza di trasporto della molecola di insulina attraverso la pelle.

In questa ultima parte della tesi vengono presentati i recenti progressi nei sistemi di somministrazione transdermica di insulina, inclusi gli approcci promossi da stimolatori chimici, facilitati elettricamente, attivati dalla forza meccanica e assistiti da microaghi (MN) (Figura 11).



**Figura 11:** Rappresentazione schematica delle diverse tecniche transdermiche per il trasporto di insulina [130].



#### **4.1 Somministrazione transdermica promossa da stimolatori chimici**

Al fine di migliorare la permeabilità cutanea, sono stati studiati dei potenziatori chimici di penetrazione, capaci di scombinare la barriera cutanea e fornire una forza ed una guida aggiuntiva nel trasporto delle terapie [131].

Esistono vari potenziatori chimici (enhancers) efficaci, compresi quelli convenzionali, come molecole chimiche come i peptidi permeabili alla membrana e le molecole carrier. I potenziatori chimici possono inserirsi nel doppio strato lipidico altamente ordinato, nello strato corneo, per disorganizzare l'impalcatura lipidica, al fine di creare fessurazioni di dimensioni nanometriche, portando così ad un maggiore passaggio di insulina [132].

Alcuni ricercatori hanno esaminato il miglioramento delle proprietà di permeazione di 43 diversi potenziatori chimici che sono stati utilizzati nella somministrazione di insulina [133]. Gli autori hanno anche discusso dei potenziali criteri per un ulteriore screening dei potenziatori.

Altri hanno mostrato che lo iodio facilita il rilascio di insulina attraverso la pelle, poiché lo iodio potrebbe inattivare i sulfidril endogeni, come glutatione e gammaglutamilcisteina, riducendo così la formazione di legami disolfuro e mantenendo elevato il flusso di insulina durante il suo rilascio in circolazione, attraverso la pelle [134].

Anche la capacità della tripsina di reagire con lo strato corneo è stata valutata per una maggiore somministrazione transdermica di insulina, dove è stato dimostrato che la tripsina alterava la struttura proteica dello strato corneo, dalla forma alfa alla forma beta, diminuendo la resistenza elettrica della pelle, riflettendo un aumento di 5 volte dell'assorbimento di insulina (insulina a pH 3) [135].

Alcuni studiosi hanno identificato una classe di peptidi permeabili alla membrana, che possono promuovere il trasporto del farmaco a livello della circolazione sistemica, come i domini di trasduzione proteica (PTD) che potrebbero trasportare solo localmente i farmaci [136].

Il peptide sintetico, ACSSSPSKHCG (TD-1), è stato suggerito per essere in grado di creare un'apertura transitoria nella pelle, consentendo la penetrazione dell'insulina nei follicoli piliferi oltre una profondità di 600 micron. È stata osservata un'evidente soppressione dei livelli di glucosio nel sangue (~ 40% dei valori iniziali) nei ratti diabetici, che è stata mantenuta oltre 11 h, rispetto ad una insulina iniettata per via sottocutanea che è stata mantenuta per meno di 5 h.

Questa ricerca, ha stimolato lo sviluppo di una serie alternativa di peptidi potenziatori, progettati per fornire una somministrazione per via transcutanea di macromolecole idrofile ad uso terapeutico.

Ad esempio, Chang et al. hanno studiato un numero di ciclo-peptidi cationici derivati da TD-1, in un mono-strato cellulare Caco-2 basato su un modello in vitro, e valutato le prestazioni in vivo nei ratti diabetici [137].

I risultati hanno indicato che TD-34 (ACSSKSKHCG), con lisina bis-sostituita nei siti N-5 e N-6, ha mostrato un miglioramento dell'attività di permeazione transdermica, dove la somministrazione di 2,1 UI di insulina con 0,5  $\mu\text{mol}$  di TD-34 ha portato a una riduzione di circa il 26% dei livelli di glucosio nei ratti, che è stata sostenuta per 8 ore.

Nano/micro vescicole, come liposomi e nano/microemulsioni, sono stati anche studiati come potenziatori chimici [138].

Queste forme farmaceutiche non migliorano solo la permeabilità cutanea, ma agiscono anche come veicoli per la solubilizzazione dei farmaci e il trasporto di farmaci attraverso la pelle [139].

Diversi nano-carrier, come le vescicole a base di lipidi [140], nanoparticelle di  $\text{CaCO}_3$  [141] e nanoemulsioni [142], hanno mostrato la capacità di incapsulare e trasportare per via transdermica l'insulina nel derma.

Per esempio, King et al. hanno studiato vescicole bifasiche a base lipidica come stimolatori della penetrazione cutanea per la somministrazione di insulina [143]. Questi ricercatori hanno incorporato vescicole bifasiche incapsulate con insulina in un cerotto transdermico, e applicato il cerotto sulla pelle addominale dei topi diabetici per 48 h. I topi hanno mostrato una diminuzione della glicemia di ~ 43%, in risposta al cerotto che caricava 50 mg di insulina intrappolata in vescicole per oltre 51 h.

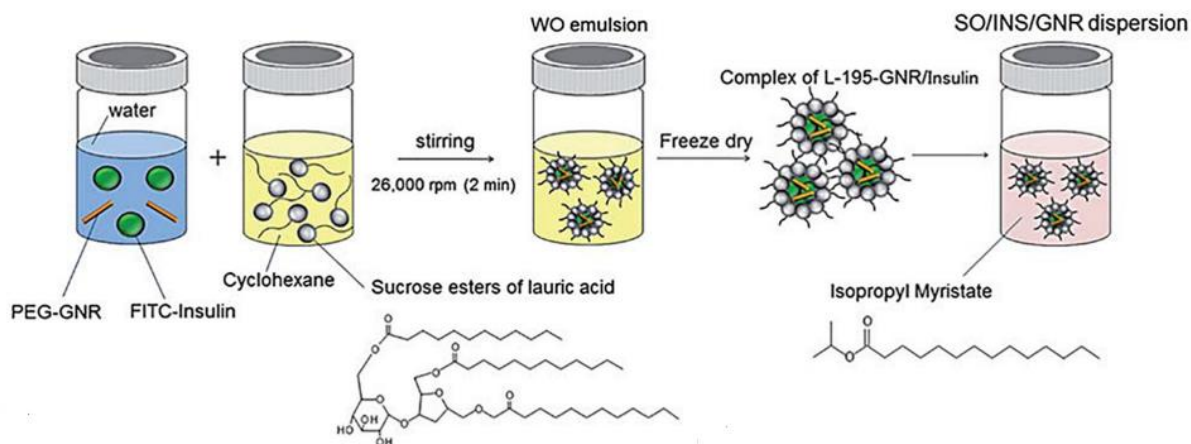
Un'ulteriore analisi in merito alla somministrazione topica di vescicole bifasiche, ha dimostrato che il trasporto e l'assorbimento dell'insulina, erano principalmente mediati dalla via linfatica in un modello di ratto diabetico [140].

Goto e colleghi hanno proposto una formulazione alternativa basata su nano-dispersione solida in olio (S/O) per il rilascio di proteine [142].

I preparati nanodispersi avevano dimensioni di circa 250 nm e la fase oleosa costituita da isopropilmiristato (IPM), un olio con effetto stimolante la penetrazione, contenenti insulina e peptidi R9 caricati con un rapporto molare di 1:3 [142]. I peptidi R9, un tipo di peptidi ricchi di arginina, erano coinvolti come enhancers (PTD) per migliorare la permeabilità della pelle all'insulina. È stato dimostrato in vitro, un effetto sinergico dell'isopropilmiristato e del PTD nel modificare le proprietà di barriera della pelle e migliorare la penetrazione dell'insulina attraverso la pelle.

Altri ricercatori hanno provato una formulazione S/O diversa, introducendo nano-rods d'oro in una fase oleosa, per una somministrazione transdermica sotto irraggiamento di luce infrarossa localizzata [144].

Individualmente, le nano-rods d'oro (27 nm di larghezza e 66 nm di lunghezza) sono rivestite con metossi(polietilenglicole)-tiolo e formate da un complesso con tensioattivo (L-195) e insulina, seguiti da dispersione nella fase oleosa di IPM (Figura 12) [144].



**Figura 12:** schema di preparazione dei nanorods d'oro in fase oleosa (IPM) per il trasporto di insulina [130].

Alla luce del vicino infrarosso (potenza  $0,4 \text{ W/cm}^2$  per 10 min), l'effetto fototermico causato dalle nano-barre d'oro potrebbe rompere la barriera cutanea, interrompendo i lipidi della pelle o modificando la dimensione e densità della barriera cutanea, permettendo così all'insulina di permeare attraverso la pelle. Inoltre, il tensioattivo L-195 e l'IPM hanno agito come stimolatori, promuovendo il trasporto transdermico di insulina.

Dopo il trattamento della nano-dispersione e dell'irradiazione della luce, i valori glicemici dei topi diabetici si sono significativamente ridotti di circa il 58% rispetto ai valori pretrattamento dopo 4 h. Gli stimolatori chimici della penetrazione possono alterare la struttura della pelle promuovendo la permeabilità e migliorando la solubilità del farmaco, per fornire al farmaco una forza motrice secondo gradiente di concentrazione. Nonostante questo, molti stimolatori chimici mostrano ancora un'efficienza limitata nella somministrazione transdermica di insulina.

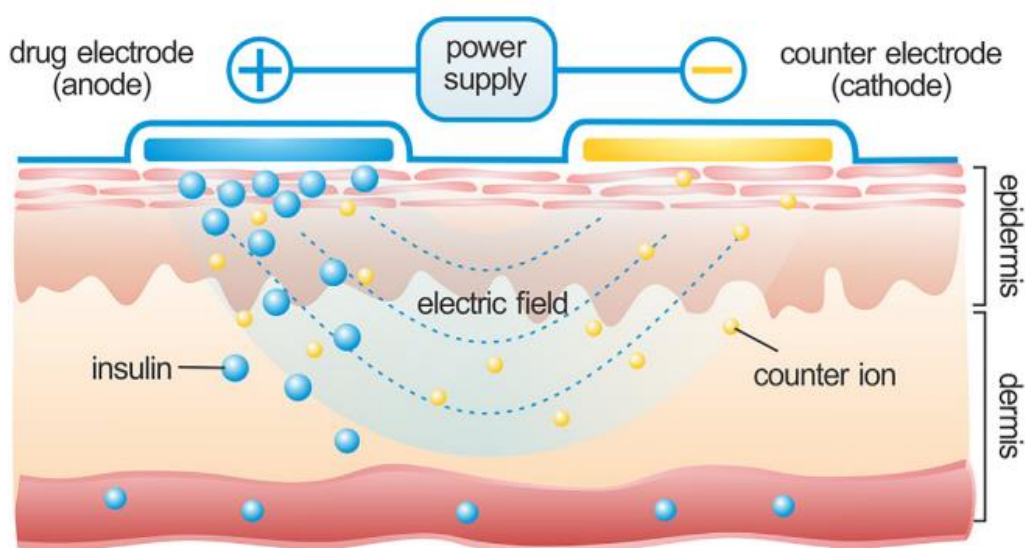
Per gli stimolatori chimici più efficaci, dovrebbero essere approfondite ulteriormente delle strategie per prevenire la loro diffusione fuori dallo strato corneo e la relativa irritazione a discapito dei tessuti più profondi.

#### 4.2 Somministrazione transdermica facilitata elettricamente

Oltre agli stimolatori di penetrazione chimica, hanno ricevuto notevole attenzione anche strumenti elettrici che facilitano il trasporto di insulina attraverso la pelle [145]. A differenza degli stimolatori di penetrazione chimica, questi strumenti elettrici migliorano l'efficienza della somministrazione di insulina attraverso la pelle, fornendo ulteriore forza motrice tramite interazioni elettriche o introducendo perturbazioni transitorie dello strato corneo tramite impulso elettrico ad alta tensione.

### 4.2.1 Ionoforesi

La ionoforesi è emersa come tecnica di potenziamento transdermico all'inizio del XX secolo. Questa tecnica utilizza una leggera corrente elettrica per la somministrazione di molecole grandi e/o cariche [145]. Questa tecnologia si basa su una coppia di elettrodi che viene posizionato sulla pelle per generare un potenziale elettrico tra la superficie cutanea e i capillari sottostanti (Figura 13). Le molecole terapeutiche, caricate positivamente, sono guidate verso i capillari dalla superficie della pelle all'elettrodo positivo, mentre il trasporto delle molecole cariche negativamente, attraverso la pelle verso l'elettrodo negativo.



**Figura 13:** Illustrazione della somministrazione di insulina assistita da ionoforesi attraverso la pelle [130].

Studi approfonditi hanno identificato l'elettro-migrazione e l'elettro-osmosi come due delle forze trainanti predominanti che influenzano il trasporto di farmaci ionici attraverso la pelle nella circolazione sistemica [146] e la quantità di carica trasportata dipende dall'intensità del campo elettrico e dalla durata del trattamento [147].

La pelle è selettivamente permeabile ai cationi sotto una corrente elettrica poiché, a condizioni fisiologiche, è caricata negativamente [148].

Quindi, la somministrazione transdermica per fornire livelli terapeutici di insulina è condizionata dalla carica negativa dell'insulina umana (~5800 Da) in condizioni fisiologiche [149].

Alcuni ricercatori hanno notato che, regolare la soluzione acquosa di insulina (concentrazione pari a 500 UI/mL) a un pH di 3.7 era la condizione necessaria per attuare una ionoforesi dell'insulina [150]. Allo stesso modo, Pillai et al. hanno notato che la ionoforesi anodica dell'insulina a pH 3.6 risultava avere migliore stabilità e permeazione dell'insulina [151]. Altri hanno tentato di aumentare l'efficienza del trasporto di insulina, utilizzando la carica dei liposomi come vettori durante la

ionofresi [152]. La performance in vivo, in un modello di ratto diabetico, ha mostrato che la ionofresi transdermica ( $0.45 \text{ mA/cm}^2$  per 1 ora) di insulina incapsulata con liposomi cationici attraverso la via trans-follicolare, ha portato ad una graduale diminuzione del 20% dei livelli glicemici 18 h dopo la somministrazione e che è stata mantenuta fino a 24 ore. È stato anche rilevato un corrispondente aumento dei livelli plasmatici di insulina ( $\sim 1,4 \text{ ng/mL}$  18 h dopo il trattamento) che ha superato i livelli rilevati nei ratti trattati con insulina iniettata per via intraperitoneale.

Il pretrattamento della pelle con lo stripping [153], utilizzando stimolatori di penetrazione [154] e crema depilatoria [155] è stato segnalato perché migliora il trasporto di insulina attraverso la pelle sotto ionofresi.

Una ricerca sull'effetto dei diversi stimolatori chimici, tra cui etanolo (EtOH), glicole propilenico (PG), dimetilacetamide (DMA), acetato di etile (EtOAc) e IPM, hanno dimostrato che la permeabilità cutanea è stata notevolmente migliorata con DMA, seguito da EtOH ed EtOAc, mentre IPM e PG hanno mostrato insignificanti alterazioni del potenziale della barriera cutanea [154]. Agendo sul doppio strato lipidico, queste sostanze chimiche hanno portato al disordine dei lipidi di barriera (EtOH, DMA, EtOAc), cambiamenti nelle proteine della pelle (EtOH, DMA) o aumento della fluidità lipidica (IPM), dando così un miglioramento sinergico con la ionofresi.

Inoltre, le formulazioni di idrogel sono considerate preferibili per la ionofresi, in quanto possono fungere da base elettro-conduttiva e adattarsi ai contorni della pelle; queste formulazioni possono anche essere facilmente integrate con i sistemi di erogazione della ionofresi [156]. Kagatani et al. hanno riportato un sistema pulsatile di somministrazione di insulina con un gel elettro-reattivo di poli(dimetilamminopropilacrilammide) (PDMAPAA) [157].

Il gel PDMAPAA caricato con insulina è stato iniettato come depot, per via sottocutanea nella pelle di topo. Alla stimolazione con una corrente costante di  $1.0 \text{ mA}$  ( $0,36 \text{ mA/cm}^2$ ), è stata rilevata una diminuzione pulsatile del glucosio plasmatico negli animali. Sia l'insulina che il gel PDMAPAA in questo sistema, potrebbero essere caricati positivamente al pH di 2.3.

Quando viene applicato un campo elettrico, la rete di PDMAPAA reticolata subisce una leggera espansione al lato catodico, consentendo all'insulina solvatata di diffondere rapidamente fuori dal gel con il deflusso della soluzione, causato dal flusso elettrocinetico dell'insulina solvatata con acqua. In un altro studio, Pillai et al. hanno usato il polassamero 407 per preparare il gel di insulina, che è stato ulteriormente integrato con gli stimolatori chimici per l'analisi della permeazione cutanea ex vivo e in vivo [158].

L'applicazione della ionofresi, da sola o in combinazione con acido linoleico, ha comportato una riduzione del 36-40% dei livelli glicemici nei ratti diabetici.

Per mitigare il danno del potenziale elettrochimico causato durante la ionoforesi, come ustioni e irritazioni cutanee [159], è stata studiata la ionoforesi a corrente alternata rispetto alla ionoforesi a corrente continua convenzionale; questo approccio ha mostrato effetti collaterali ridotti [160].

Gli studi hanno dimostrato che i sistemi di somministrazione transdermica di insulina attivati dalla ionoforesi a corrente alternata erano associati a un rilascio medio del 57% della quantità iniziale di insulina [161].

A differenza degli stimolatori di penetrazione chimica, la ionoforesi non interrompe la struttura della pelle che può influire sulla sua capacità di barriera. Ciò nonostante, la bassa corrente utilizzata in tale tecnica limita l'efficienza del trasporto di insulina attraverso lo strato corneo. Sebbene l'aumento dell'intensità della corrente possa portare a una velocità di erogazione più elevata, il potenziale rischio di irritazione e dolore della pelle limita anche l'intensità massima della corrente.

#### **4.2.2 Elettroporazione**

L'elettroporazione si è evoluta come un'altra tecnica interessante per la somministrazione transdermica di farmaci elettricamente assistita [162]. Diversamente dall'applicazione continua (ore) di corrente a bassa intensità della ionoforesi, la procedura di elettroporazione prevede l'utilizzo di brevi impulsi ad alta tensione per indurre perturbazioni transitorie nello strato corneo creando micro-percorsi attraverso i suoi doppi strati lipidici [163]. Lo strato corneo costituisce la barriera principale e contribuisce alla maggior parte della resistenza elettrica della pelle ( $5\text{--}25\text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ ) [163].

Nell'elettroporazione, l'applicazione di impulsi ad alta tensione sono superiori al potenziale di rottura dello strato corneo ( $75\text{--}100\text{ V}$ ) e quindi ciò si traduce nella formazione di pori temporanei nei doppi strati lipidici dello strato corneo che facilitano il trasporto dei farmaci attraverso la pelle.

Diversi studi sono stati fatti per convalidare la somministrazione transdermica di insulina potenziata mediante elettroporazione. Mohammad e colleghi hanno esaminato l'effetto di diversi parametri di elettroporazione (numero di impulsi, concentrazioni di insulina e intensità di campo) e potenziatori chimici (olio di ricino, iodio e acido oleico) sulla somministrazione transdermica di insulina nei conigli [164]. In un altro lavoro, Rastogi et al. hanno sperimentato l'elettroporazione di nanoparticelle polimeriche incapsulate con insulina, dimostrando un aumento della deposizione di insulina nella pelle di ratto 4 volte maggiore rispetto all'elettroporazione fatta utilizzando insulina libera, nonché un effetto terapeutico esteso da 24 ore a 36 ore.

Sen et al. hanno riportato un metodo alternativo di potenziamento transdermico mescolando i lipidi anionici con molecole bersaglio che erano associate al miglioramento del trasporto elettroporativo di permeanti caricati negativamente fino a 10 kDa di dimensione. L'effetto del potenziamento risultante è stato attribuito all'aumento del numero e delle dimensioni, nonché alla durata

prolungata, dei pori creati durante l'elettroporazione, in presenza della dispersione lipidica. In particolare, i lipidi anionici hanno dimostrato avere un effetto positivo nell'abbassare la resistenza cutanea e ritardare il recupero della resistenza dopo la cessazione dell'applicazione dell'impulso, espandendo così il potenziale dell'elettroporazione aumentato dai lipidi per il rilascio di grandi biomolecole.

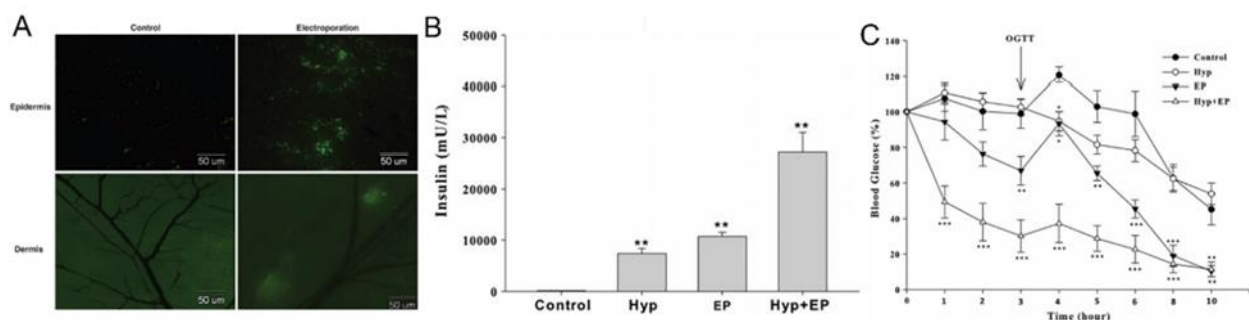
Più recentemente, questi ricercatori hanno esaminato l'impatto di un altro lipide anionico, l'1,2 dimiristoil-3-fosfatidilserina (DMPS), sul trasporto transdermico dell'insulina utilizzando un modello di epidermide suina e hanno osservato che con la dispersione nell'elettroporazione DMPS per 10 min (100–105 V, ampiezza di impulso di 1 ms a 1 Hz) si osservava un aumento dell'insulina, 20 volte maggiore rispetto a quello senza DMPS [165].

Sen e colleghi hanno anche dimostrato un effetto sinergico derivante dall'accoppiamento di DMPS e ionoforesi anodica (elettroosmosi) con l'elettroporazione sul trasporto di insulina sia ex vivo che in vivo, dove il trattamento combinato di DMPS (in 0.2% di dodecil solfato di sodio) ed elettroosmosi ha determinato un aumento del livello di insulina nel plasma pari a 10 volte, in un modello di ratto Sprague-Dawley.

È interessante notare che questo gruppo ha suggerito che l'insulina aveva diverse proprietà di aggregazione in diverse condizioni di pH nei loro studi: l'insulina a pH 10 aveva un rapporto più alto di formulazione non associata, mentre la maggior parte dell'insulina a pH 7 è associata agli esameri.

Pertanto, è stato rilevato un livello plasmatico di insulina molto più elevato a pH 10 che a 7.

Considerando l'applicazione clinica dell'elettroporazione, Wong et al. hanno sviluppato una tecnica di elettroporazione indolore, utilizzando un blocco in serie di micro-elettrodi per mitigare la potenziale sensazione dolorosa indotta dagli elettrodi sulla pelle umana, mantenendo l'efficacia della somministrazione dell'insulina. Studi su topi diabetici hanno indicato un aumento della somministrazione transdermica di insulina di 100 volte, mediante l'elettroporazione con l'ausilio della serie di elettrodi (150 V, 120 impulsi a 0.2 ms, 1 Hz) rispetto alla diffusione passiva (Figura 14) [166].



**Figura 14:** A. immagini in fluorescenza della pelle trattata con insulina per elettroporazione, B livelli di diffusione dell'insulina attraverso la pelle e C andamento della concentrazione del glucosio nel sangue [130].

Gli studi associati sull'uomo hanno suggerito che il design della serie di microelettrodi fornisca una condizione di elettroporazione che fosse sia indolore che innocua per l'uomo. Da notare, che la combinazione di lieve ipertermia (40°C per 20 minuti) con l'elettroporazione ha comportato un'efficienza di somministrazione ancora più elevata nei topi, che risulta essere 237 volte superiore rispetto ai valori di controllo della diffusione passiva. L'efficienza della somministrazione è coerente con gli studi farmacodinamici dell'insulina: è stato osservato un significativo effetto ipoglicemizzante subito dopo l'attivazione dell'elettroporazione e il trattamento di riscaldamento che è proseguito fino a 10 h.

Altri ricercatori hanno sviluppato un dispositivo di elettroporazione compatto, economico e programmabile in grado di regolare facilmente le onde elettriche ad alta tensione (2–300 V), comprese le forme pulsate e bifasiche, per una regolazione precisa dell'ampiezza e della forma d'onda dell'elettroporazione [167]. Hanno anche valutato la potenza di questo dispositivo in vitro per la somministrazione transdermica di farmaci, inclusa l'insulina. Poiché c'è un coinvolgimento del campo elettrico ad alta intensità, l'elettroporazione porta ad una maggiore efficienza di erogazione dell'insulina rispetto alla ionoforesi.

Tuttavia, gli impulsi ad alta tensione colpiscono inevitabilmente i tessuti più profondi, causando potenziale dolore e stimolazione muscolare. Ulteriori studi sulla progettazione del dispositivo, per ridurre al minimo gli effetti collaterali, dovrebbero essere condotti per facilitare il passaggio della tecnologia alla pratica clinica.

### **4.3 Somministrazione di insulina transdermica attivata da forza meccanica**

Oltre al campo elettrico, la forza meccanica è un'altra alternativa per la somministrazione transdermica di farmaci perché producono canali transitori sulla superficie della pelle [168]. L'ecografia e l'iniezione a getto sono due metodi rappresentativi per la somministrazione di insulina attivati da una forza meccanica.

Gli ultrasuoni possono aumentare la permeabilità dei farmaci attraverso la pelle per effetto dell'ipertermia o della cavitazione.

L'iniezione a getto si basa sull'applicazione del liquido ad alta velocità tale da produrre discontinuità della superficie della pelle, al fine di erogare la soluzione di insulina all'interno del tessuto cutaneo.

#### **4.3.1 Ultrasuoni**



Gli ultrasuoni, sono onde sonore longitudinali con una frequenza superiore a 20 kHz e sono state utilizzate a lungo per scopi biomedici dall'inizio del XX secolo, per l'imaging, nonché per l'ablazione di tessuti, la frantumazione di calcoli renali e per facilitare la somministrazione transdermica di farmaci [169].

È stato dimostrato che la forza meccanica prodotta dagli ultrasuoni migliora la permeabilità della pelle ai composti terapeutici tramite l'ipertermia o la cavitazione indotta dagli ultrasuoni stessi.

L'applicazione degli ultrasuoni per la somministrazione di farmaci attraverso la pelle è generalmente definita sono-foresi e la gamma di frequenze utilizzate varia tra i 20 kHz e i 16 MHz.

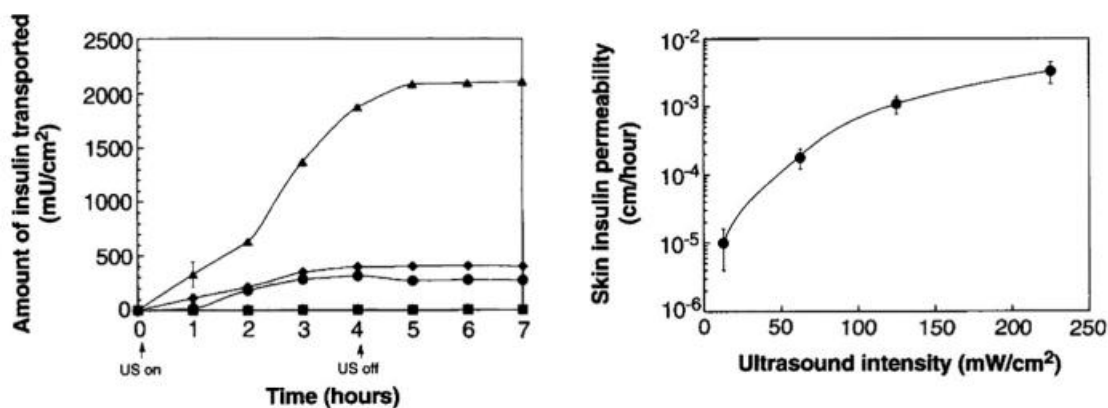
All'inizio, la sono-foresi ad alta frequenza (HFS) ( $\geq 700$  kHz) è stata principalmente studiata per la somministrazione transdermica di farmaci, con miglioramenti della penetrazione cutanea tra 1 e 10 volte rispetto alla diffusione passiva.

Nella prima metà degli anni '90, gli scienziati hanno compreso meglio gli effetti cavitazionali della sono-foresi [170] e hanno scoperto che la sono-foresi a bassa frequenza (LFS) (20-100 kHz) era più efficace dell'HFS nel migliorare la permeabilità cutanea.

Alcuni studiosi hanno utilizzato gli ultrasuoni con una frequenza di 48 kHz o 105 kHz per produrre un maggiore trasporto di insulina attraverso la pelle rispetto alla diffusione passiva che ha comportato una significativa diminuzione di livelli di glicemia nei topi e nei conigli.

Altri hanno mostrato anche un efficace trasporto transdermico mediato da LFS di proteine, tra cui insulina, interferone- $\gamma$  ed eritropoietina (Fig. 15).

I loro esperimenti in un modello di ratto diabetico hanno mostrato una somministrazione di insulina sufficiente da parte di LFS, con una riduzione di livelli glicemici da  $\sim 400$  a  $\sim 200$  mg/dL in 30 min. Un'indagine successiva ha dimostrato che l'LFS a 20 kHz era fino a tre ordini di grandezza più efficace dell'HFS a 1 MHz per migliorare la permeabilità cutanea [171]. Da allora, la somministrazione transdermica di insulina mediata da LFS è stata ampiamente studiata.



**Figura 15:** trasporto attraverso la pelle di insulina utilizzando ultrasuoni a bassa intensità (LSF) [130].

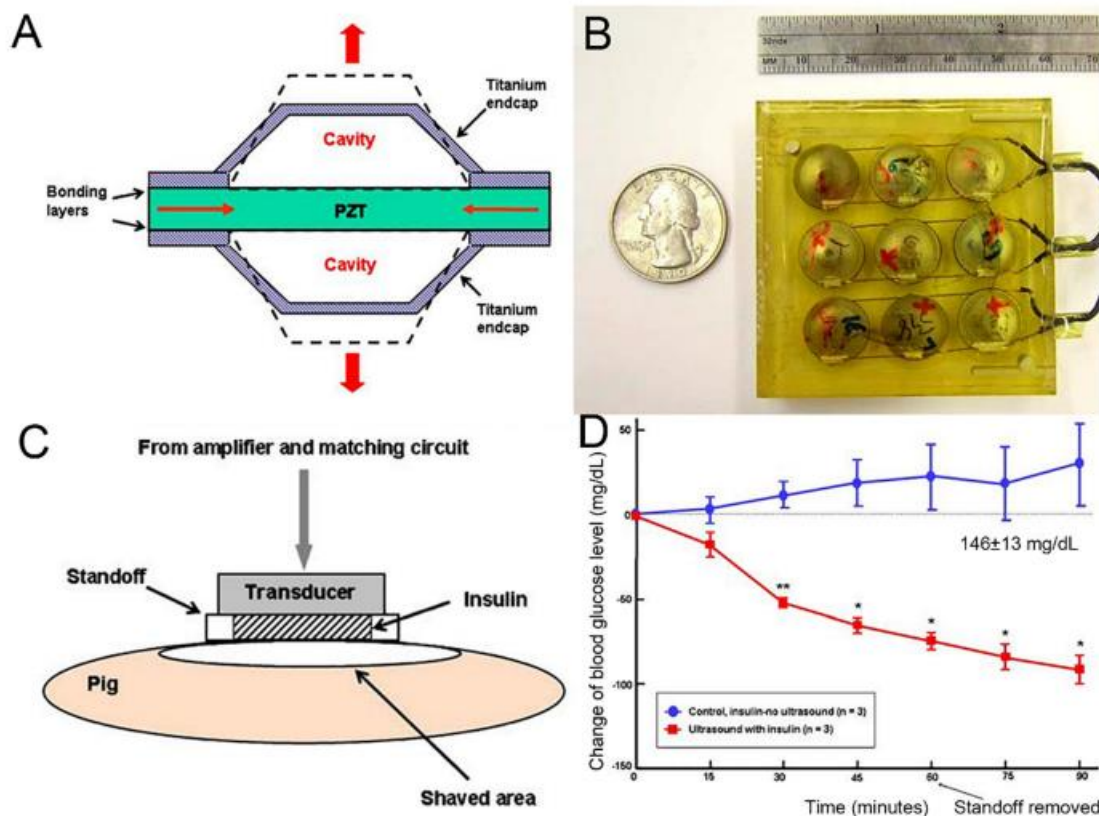
Gli studi condotti da Boucaud et al. in ratti e maiali, hanno mostrato che l'uso di LFS (20 Hz) potrebbe facilitare la somministrazione transdermica di insulina rapida in modo riproducibile e reversibile. Hanno anche dimostrato che la quantità di insulina trasportata attraverso la pelle dei ratti era significativamente associata alla dose di energia e alla durata di un impulso di ultrasuono, coerentemente con il meccanismo correlato alla cavitazione [172].

Le apparecchiature ad ultrasuoni commerciali sono strumenti grandi e pesanti, per fornire insulina attraverso la pelle, Smith et al. hanno sviluppato un sistema di trasduttori portatili ed efficienti dal punto di vista energetico per la somministrazione transdermica di insulina con LFS.

In particolare, questo sistema di trasduttori leggero (38 g) e compatto ( $56 \times 56 \times 8 \text{ mm}^3$ ) consisteva in singoli trasduttori a forma di piatto, che erano disposti in un design multi-elemento ( $3 \times 3$ ). La frequenza di risonanza era regolabile tra 1 e 100 kHz, a seconda della geometria. L'efficacia del trasduttore portatile è stata valutata confrontando la via di somministrazione dell'insulina basata su LFS con la via di iniezione sottocutanea nei ratti [173].

Il trasduttore è stato posizionato sopra un serbatoio di insulina (4 mL di 50 U/mL) che aderiva alla pelle dei ratti. Il trattamento di irradiazione con ultrasuoni a 20 kHz con un'intensità di  $100 \text{ mW/cm}^2$  per 60 minuti ha comportato una riduzione dei livelli glicemici di  $262 \pm 40 \text{ mg/dL}$  entro 90 minuti; piccoli cambiamenti o una diminuzione minore ( $-190 \pm 96 \text{ mg/dl}$ ), sono stati osservati nei livelli glicemici di ratti trattati con insulina iniettata per via sottocutanea (0,15, 0,2 e 0,25 U/kg).

In un altro studio, i ricercatori hanno valutato l'effetto del trasduttore a piatti sui maiali dello Yorkshire (45–64 kg) (Fig. 16).



**Figura 16:** Insulina transdermica attivata da un trasduttore piatto. A) Schema del trasduttore del piatto e del movimento del disco del piatto. B) Foto di un array di trasduttori per piatti  $3 \times 3$ . C) Schema di un array di trasduttori per piatti sulla pelle di maiale. D) Livelli di glucosio nel sangue del maiale trattato con insulina pura o somministrazione transdermica di insulina mediata da ultrasuoni [130].

Il gruppo trattato con insulina e LFS per 60 minuti ( $20 \text{ kHz}$ ,  $100 \text{ mW/cm}^2$ , ciclo di lavoro 20%) ha mostrato una diminuzione di livelli glicemici di  $72 \pm 5 \text{ mg/dL}$  a 60 minuti dopo il trattamento e una diminuzione di  $91 \pm 23 \text{ mg/dL}$  a 90 min, mostrando la possibilità di utilizzare il trasduttore per piatti nelle applicazioni cliniche. Nel tentativo di migliorare l'accuratezza delle dosi di insulina erogate, questo team ha ulteriormente progettato un sistema a circuito chiuso che consentiva la somministrazione di insulina su richiesta accoppiando la somministrazione di insulina assistita da ultrasuoni con il rilevamento del glucosio tramite un feedback di controllo [174].

Gli esperimenti in vivo sono stati eseguiti su maiali a cui sono stati applicati due array di ultrasuoni: uno per la somministrazione di insulina ( $3 \times 3$ ,  $30 \text{ kHz}$ ,  $100 \text{ mW/cm}^2$ ) e l'altro per il rilevamento del glucosio ( $2 \times 2$ ,  $20 \text{ kHz}$ ,  $100 \text{ mW/cm}^2$ ). I livelli glicemici sono stati valutati ogni 20 minuti per 2 ore e il livello di insulina erogata automaticamente è stato determinato in base ai livelli glicemici da un sistema di feedback di controllo. I risultati hanno suggerito la fattibilità dell'utilizzo del sistema combinato di array di ultrasuoni per piatti per il rilevamento non invasivo del glucosio e la

somministrazione di insulina. Più recentemente, alcuni studi si sono focalizzati sugli effetti che gli ultrasuoni possono provocare sulle risposte secretorie nelle cellule  $\beta$  pancreatiche [175].

Dopo l'esposizione a ultrasuoni per 5 minuti, ad una intensità di picco di 1 W/cm<sup>2</sup> e frequenze di 400 kHz o 600 kHz, è stato osservato un marcato rilascio di insulina dalle cellule  $\beta$  (circa 150 ng/10<sup>6</sup> cellule). Inoltre, l'applicazione di ultrasuoni a frequenze di 800 kHz, ha comportato il rilascio di insulina da parte di 24 ng/10<sup>6</sup> cellule, pur mantenendo la vitalità cellulare. Nel loro ulteriore studio, i ricercatori hanno cercato di chiarire il meccanismo con cui gli ultrasuoni stimolavano la secrezione e hanno descritto il ruolo del calcio nel processo [176]. Questi risultati implicano il potenziale degli ultrasuoni per aumentare il rilascio di insulina dalle cellule del pancreas per il trattamento del diabete.

La somministrazione di farmaci transdermici mediata da ultrasuoni è stata ampiamente studiata in studi su animali in vivo e ha dimostrato il potenziale clinico nella somministrazione di piccole macromolecole, inclusa l'insulina. Tuttavia, l'HFS può causare danni al tessuto cutaneo profondo e l'LFS spesso necessita di un supporto o scaffold corrispondente, come idrogel, nano-rete e cellule, che vengano iniettate in modo invasivo nel tessuto cutaneo. Inoltre, la necessità di dispositivi sofisticati limita anche l'uso per le persone con il diabete.

#### **4.3.2 Iniezione a getto**

L'iniezione a getto è un'altra tecnica senza ago, per la somministrazione transdermica di insulina. Al posto delle siringhe, l'iniettore a getto applica un flusso ad alta velocità contenente insulina per creare un minuscolo foro per il trasporto dell'insulina attraverso la pelle.

L'iniezione a getto è stata associata ad un'elevata efficienza di erogazione superiore al 90%, simile all'iniezione ipodermica [177]. Inoltre, la somministrazione di insulina da parte di iniettori a getto permette di ottenere un picco plasmatico di insulina più rapido.

Wit et al. hanno dimostrato una rapida correzione dell'iperglicemia mediante iniezione a getto in pazienti sovrappeso e obesi con diabete. Inoltre, poiché l'iniezione a getto eroga insulina su un'area più ampia del tessuto cutaneo rispetto all'iniezione convenzionale, la farmacocinetica di questa via di somministrazione dell'insulina è più simile alla secrezione endogena di insulina da parte del pancreas [178].

Guo et al. hanno confrontato il controllo glicemico postprandiale ottenuto utilizzando un iniettore a getto, con quello ottenuto utilizzando una penna per insulina, scoprendo che l'assorbimento di insulina derivante dall'utilizzo dell'iniettore a getto è migliore e vantaggioso per la regolazione della glicemia postprandiale [179].

Nonostante i vantaggi sopra menzionati, diverse preoccupazioni limitano l'uso attuale della tecnologia di iniezione a getto. Sebbene la tecnologia di iniezione a getto liquido, sia una somministrazione senza ago, il grande volume di spray ad alta pressione può anche portare a reazioni avverse tra cui lividi, sanguinamento e dolore.

Gli studi hanno riportato che gli iniettori a getto in realtà non causano meno dolore degli aghi ipodermici. Per ridurre al minimo le reazioni avverse, Mitragotri e colleghi hanno progettato un dispositivo di iniezione a micro-getto, che inietta solo volumi di soluzione entro l'intervallo dei nanolitri [180]. Hanno riferito che, utilizzando micro-getti pulsati, l'insulina viene iniettata nella pelle senza una penetrazione profonda in un modello di ratto, il che potrebbe potenzialmente ridurre il dolore e il sanguinamento. Inoltre, il rilascio prolungato e controllato di insulina realizzato dall'integrazione con particelle biodegradabili può anche migliorare l'applicazione dell'iniezione a getto.

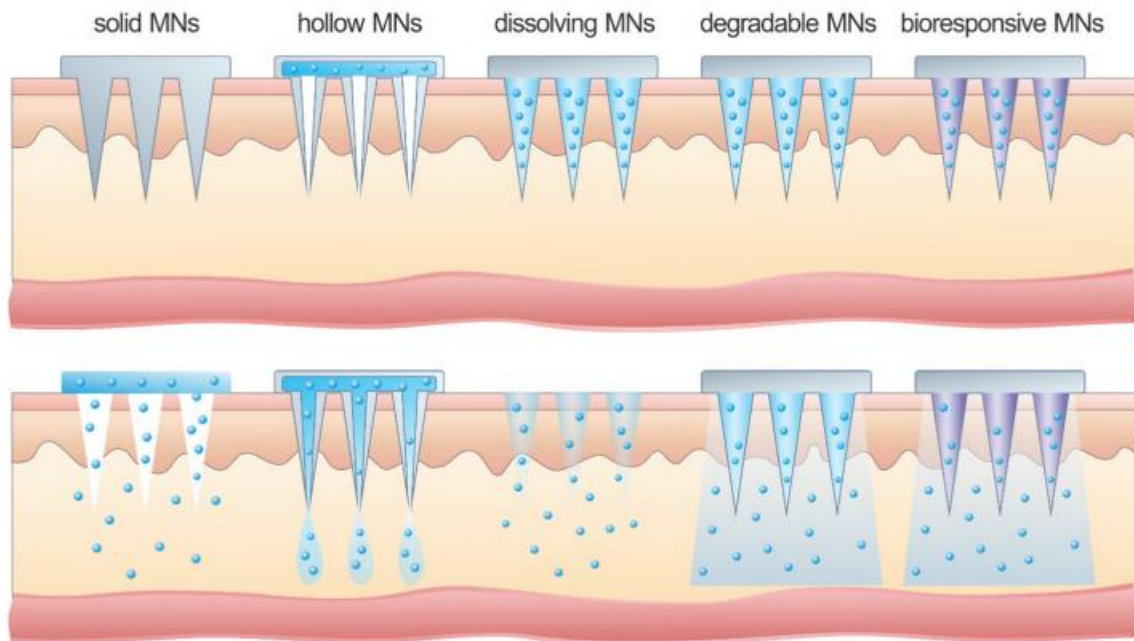
Quando alcuni ricercatori hanno valutato la capacità degli iniettori a getto di somministrare nanoparticelle polimeriche attraverso la pelle, hanno scoperto che le nanoparticelle non penetravano in profondità nella pelle ma potevano rilasciare carichi per periodi prolungati. Diversi iniettori a getto sono disponibili in commercio sebbene non siano stati ampiamente adottati. In futuro, il costo, le dimensioni e le prestazioni degli iniettori a getto potrebbero essere ottimizzati per facilitarne l'uso di routine.

#### **4.4 Somministrazione transdermica di insulina mediante microaghi (MICRONEEDLE-MD)**

Recentemente, l'emergere di nuove tecnologie che utilizzano microaghi (MN), hanno fornito un metodo alternativo per la somministrazione transdermica di proteine. Gli aghi a sono in grado di interrompere lo strato corneo in modo indolore e di raggiungere lo strato epidermico e dermico per il rilascio del farmaco [181]. I micro-canali causati dai MN, sono temporanei per permettere il trasporto di farmaci e si richiudono rapidamente dopo la rimozione del MN, per prevenire danni a lungo termine al tessuto cutaneo [182].

Sulla base del materiale con cui sono costruiti i MN e del meccanismo di somministrazione del farmaco, il dispositivo MN è classificato in diversi tipi (Fig. 17). Generalmente, i MN solidi sono progettati per perforare la pelle al fine di migliorare il trasporto del farmaco; i MN cavi invece vengono utilizzati per l'iniezione di una formulazione fluida di farmaci attraverso l'apertura della pelle causata dagli aghi stessi, mentre i MN che si dissolvono o si degradano sono costituiti da polimeri all'interno dei quali vengono incapsulati i farmaci. Verranno anche descritti particolari MN detti bio-reattivi e recentemente sviluppati che possono rispondere ai livelli di glucosio

fisiologici per la somministrazione di insulina a seconda della richiesta e della risposta dell'organismo diabetico.



**Figura 17:** Illustrazione schematica dei meccanismi di trasporto e di rilascio del farmaco nei differenti tipi di MNs [130].

#### 4.4.1 Microaghi solidi

La prima generazione di somministrazione di insulina assistita da MN era spesso basata sulle perforazioni cutanee di MN solidi, che viene anche definito "perforare attraverso un cerotto".

In questo approccio, i MN perforano la pelle per creare micro-canali in cui l'insulina può essere trasportata durante la successiva somministrazione con un cerotto o con una formulazione topica. Negli ultimi decenni sono stati riportati numerosi studi che hanno dimostrato un'efficace somministrazione di insulina attraverso la pelle.

Ad esempio, Prausnitz e colleghi hanno dimostrato l'effetto ipoglicemizzante dell'insulina nei ratti diabetici utilizzando MN [183]. È stata preparata una serie di 105 microaghi mediante taglio laser da un foglio di acciaio inossidabile, e inserita nella pelle di ratti diabetici, dopodiché è stata somministrata una soluzione di insulina a contatto con la pelle per 4 ore. Questi MN solidi in metallo hanno mostrato un aumento della somministrazione transdermica di insulina e una riduzione dei livelli glicemici in vivo fino all'80%.

Zhou et al. hanno valutato il potenziale utilizzo di un rullo di MN disponibile in commercio per la somministrazione transdermica di insulina in un modello di ratto, testando tre diverse lunghezze (250, 500 e 1000  $\mu\text{m}$ ) di MN in acciaio inossidabile. È stata osservata una rapida riduzione dei livelli glicemici dopo un'ora dall'applicazione dei rulli di MN, l'effetto glicemico è diminuito e sono

scomparsi i fori cutanei creati dai MN. I rulli MN con una lunghezza di 500  $\mu\text{m}$  o inferiore si sono dimostrati sicuri e in grado di migliorare la somministrazione transdermica di insulina in vivo. È stato anche riportato che la riduzione dei livelli glicemici potrebbe essere estesa regolando l'area di trattamento dei MN [184].

Inoltre, una combinazione tra microaghi e ionoforesi è stata studiata per la somministrazione transdermica di una più ampia gamma di farmaci. Chen et al. hanno presentato un tasso di assorbimento dell'insulina 700 volte superiore tramite le nano-vescicole guidate dalla ionoforesi attraverso i micro-canali indotti dai MN, rispetto a quello della diffusione passiva [185].

Le nano-vescicole caricate positivamente hanno mostrato una capacità di permeazione significativa con l'assistenza di MN e ionoforesi con riduzione dei livelli glicemici in ratti diabetici del 33,3% e del 28,3% dei livelli iniziali, rispettivamente a 4 e 6 ore.

Per controllare e massimizzare la dose di insulina erogata, gli MN solidi sono stati recentemente modificati, caricando il farmaco direttamente sulla superficie dei MN.

Al-Qallaf et al. hanno studiato i profili di concentrazione di insulina nel sangue utilizzando microaghi rivestiti con farmaci con diverse forme e dimensioni in modelli teorici [186]. I risultati della simulazione hanno indicato che una concentrazione massima di insulina è stata raggiunta con MN a forma allungata e appuntita.

#### **4.4.2 Microaghi cavi**

I MN cavi sono progettati per facilitare il rilascio di farmaci nella pelle attraverso la parte interna degli aghi (Fig. 17). Prausnitz e colleghi hanno iniettato insulina nella pelle di ratti diabetici attraverso MN cavi di vetro mediante micro-infusione, determinando un calo costante fino al 70% dei livelli glicemici in pre-infusione, in un periodo di 5 ore.

Hanno anche progettato e fabbricato MN cavi di metallo per la somministrazione transdermica di insulina. Lo studio meccanico ha mostrato che questi MN erano abbastanza forti da perforare l'intera pelle senza rompersi. Inoltre, sono stati studiati anche MN cavi di silicio per la somministrazione di insulina [187].

Nordquist, Roxhed e colleghi hanno sviluppato e progettato un cerotto MN a "rilascio controllato", integrato con una funzione di erogazione attiva, capace di controllare il rilascio di insulina nel range di microlitri. [188].

L'erogatore, controllato elettricamente, era costituito da uno strato riscaldante, un composto espandibile e un serbatoio di liquido. Quando la corrente passava attraverso il riscaldatore, il composto veniva riscaldato e quindi fungeva da serbatoio del liquido, che poteva di conseguenza espellere la soluzione di insulina attraverso i MN cavi di silicone.

In un modello di ratto diabetico, questo sistema è stato associato a una concentrazione plasmatica di insulina 5 volte superiore rispetto alla diffusione passiva con una significativa diminuzione dei livelli glicemici. L'efficacia della somministrazione tramite MN cavi è stata anche valutata in studi umani.

Gupta et al., hanno esaminato la somministrazione transdermica di insulina tramite MN cavi di metallo su due adulti diabetici di tipo 1 [189]. Una pompa per insulina è stata collegata ai MN quindi applicata sulla pelle addominale per controllare la velocità di infusione dell'insulina. I risultati hanno dimostrato un rapido assorbimento dell'insulina e una diminuzione dei livelli glicemici con l'inserimento di MN a una profondità di 1 mm all'interno della pelle. Sono stati inoltre condotti ulteriori studi clinici per valutare la sicurezza e l'efficienza dei MN cavi per la somministrazione di insulina nell'uomo.

#### **4.4.3 Microaghi che si dissolvono**

Oltre ai MN insolubili in metallo e silicio, hanno suscitato particolare interesse dei recenti studi fatti su MN polimerici biocompatibili, come i MN che si dissolvono.

Questi MN sono costituiti da polimeri solubili in cui viene incapsulato il farmaco nella matrice, una volta inseriti nella pelle, possono dissolversi completamente per rilasciare il farmaco. La durata terapeutica dipende dalla velocità di dissoluzione del materiale polimerico, che può essere regolata da minuti a ore per raggiungere gli obiettivi del trattamento [190].

Inoltre, l'uso dei polimeri biocompatibili che si sciolgono potrebbe evitare la produzione di rifiuti taglienti a rischio biologico.

Ad oggi, sono stati riportati vari MN che si dissolvono, fatti di polimeri di zuccheri, come maltosio, trealosio e saccarosio.

I MN di carboidrati zuccherini, in genere, si dissolvono rapidamente nella pelle umana dopo l'inserimento. Tuttavia, la fabbricazione di questi MN richiede una temperatura elevata superiore a 100 °C per indurre la transizione vetrosa dello zucchero stesso e questo può essere un aspetto negativo in quanto si può andare a danneggiare la attività delle biomolecole, inclusa l'insulina.

Sono state sviluppate nuove tecniche di fabbricazione per superare i problemi derivanti dal processo di fabbricazione ad alte temperature. Ad esempio, Martin et al. hanno utilizzato un metodo di preparazione a bassa temperatura per fabbricare questo tipo di MN. [191].

Un'altra strategia potrebbe essere l'utilizzo di altri polimeri ad alta solubilità per formare MN, come acido ialuronico (HA), carbossimetilcellulosa (CMC), chitosano, alginato, polivinilpirrolidone (PVP) e alcol polivinilico (PVA).



Il processo di fabbricazione associato può evitare temperature elevate, migliorando così la capacità di conservazione dei MN contenenti farmaci.

Liu et al. hanno fabbricato MN di HA tramite la tecnologia di micro-stampaggio e ne hanno caratterizzato l'applicazione nella somministrazione transdermica di insulina [192]. Il 90% dell'insulina caricata ha mantenuto l'attività, anche dopo un mese di conservazione a diverse temperature (-40, 4, 20 e 40 °C).

Inoltre, gli MN di HA hanno mostrato una maggiore resistenza alla deformazione contro l'umidità rispetto ai MN in zucchero. Studi in vivo su ratti diabetici hanno dimostrato un effetto ipoglicemizzante dose-dipendente dopo la somministrazione di MN HA caricati con insulina. Inoltre, il micro-canale transitorio causato dall'inserimento di MN è scomparso entro 24 h.

Chen e colleghi hanno sviluppato un cerotto MN dissolvente composto da amido e gelatina per la somministrazione transdermica di insulina [193].

La gelatina è stata miscelata con l'amido per produrre composti resistenti e adatti alla penetrazione della pelle grazie alla sua capacità di formare un film. I test di penetrazione in vitro e in vivo hanno verificato una sufficiente resistenza meccanica dei MN per essere inseriti nella pelle di suino o ratto con una profondità di circa 200 µm.

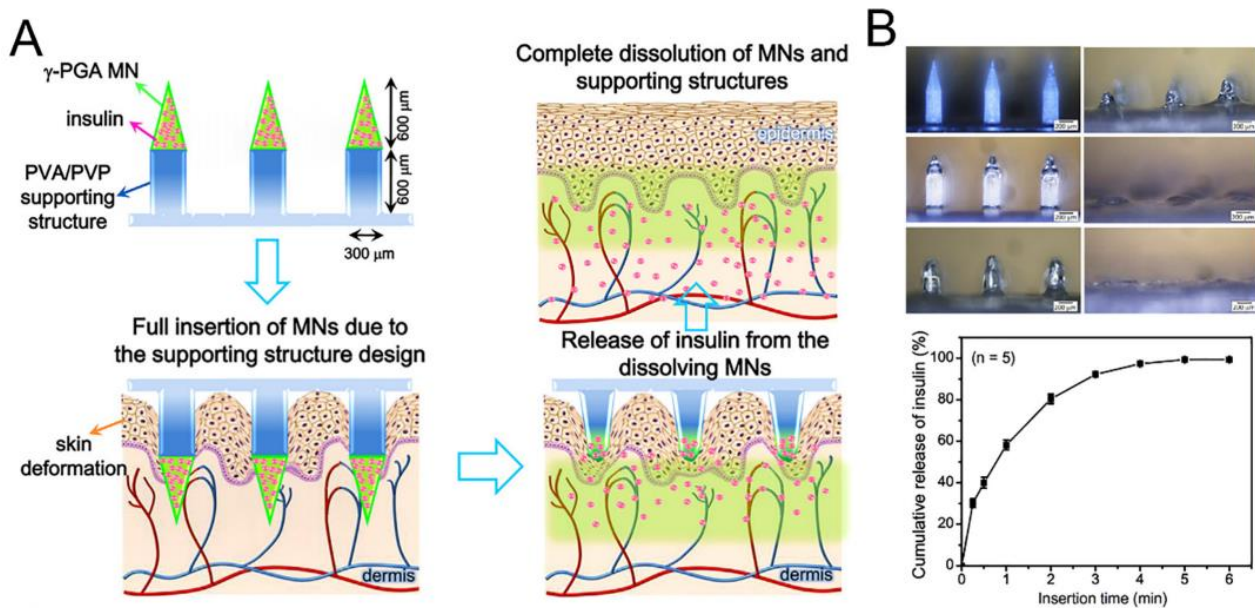
Il processo di colata nel solvente, per la fabbricazione di MN, ha preservato l'attività dell'insulina incapsulata che è stata in grado di indurre un calo significativo di BGL nei ratti diabetici al momento dell'inserimento.

Inoltre, la disponibilità relativa e l'attività dell'insulina erano ancora superiori al 90% dopo un mese di conservazione a 25 o 37°C, suggerendo che questi MN costituiti da amidi/gelatine potrebbero essere dispositivi promettenti per la somministrazione di biomolecole.

Sebbene sia stato dimostrato che molte formulazioni di MN che si dissolvono somministrano con successo l'insulina e riducono i livelli glicemici in vivo, l'inserimento incompleto di MN polimerici, a causa dell'elasticità della pelle, limita la loro efficienza di somministrazione e provoca alcune volte anche lo spreco di farmaci economicamente molto cari.

A tal fine, i ricercatori hanno progettato MN completamente inseribili con una struttura di supporto che fornissero una lunghezza estesa per contrastare la deformazione compressiva cutanea durante la somministrazione [194].

In questo studio, l'insulina è stata prima caricata su punte di MN alte 600 µm a base di acido poli- $\gamma$ -glutammico ( $\gamma$ PGA), mentre lo strato di supporto era di PVA/PVP (Fig. 18). Una volta inseriti nella pelle, sia gli MN che lo strato di supporto, si sono dissolti entro 4 minuti per rilasciare completamente il carico di farmaco.



**Figura 18:** A) illustrazione schematica del sistema di MN che si dissolvono e B) rapido rilascio di insulina [130].

Un effetto ipoglicemico comparabile è stato rilevato nei topi diabetici trattati con la stessa dose di insulina (0,2 UI) tramite cerotti MN, rispetto all'iniezione sottocutanea, indicando la fattibilità e l'accuratezza dell'utilizzo di questo nuovo sistema di rilascio con MN proposto per la somministrazione di insulina.

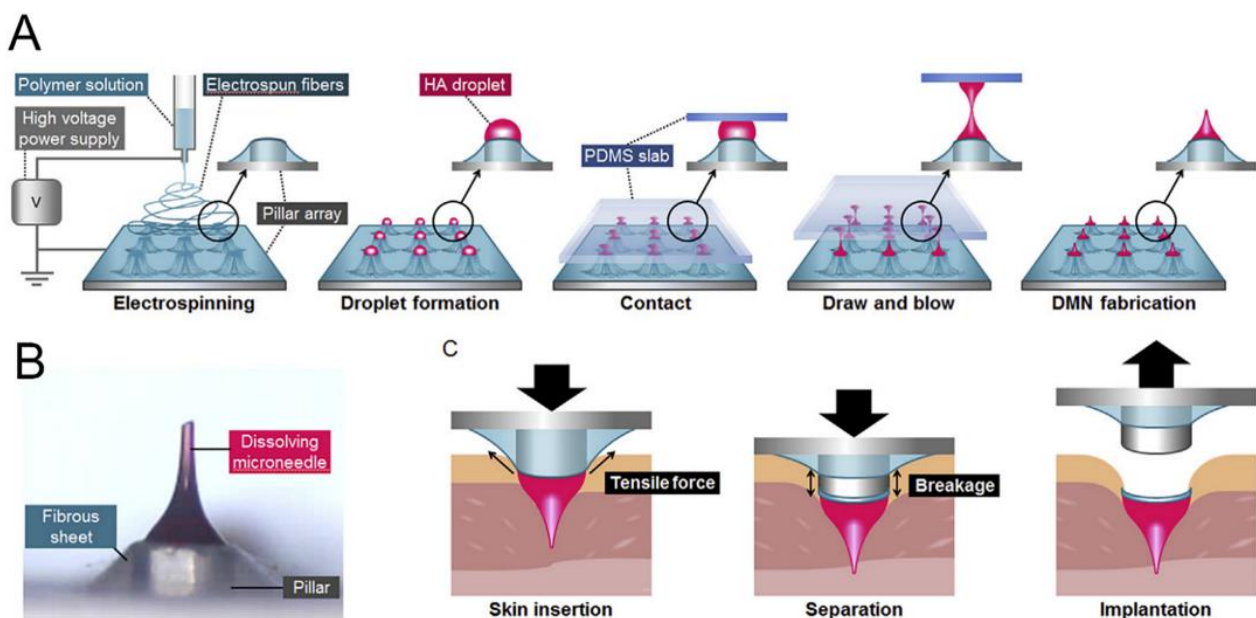
Sulla base di un meccanismo simile, Liu e colleghi hanno sviluppato cerotti contenenti MN dissolvibili multistrato, costituiti da punte rigide di fibra di seta e supportati da piedistalli flessibili in PVA [195]. Le punte avevano una robusta resistenza meccanica ed erano in grado di penetrare nella pelle e dissolversi rapidamente per rilasciare l'insulina incapsulata.

I test in vivo su un modello murino obeso hanno indicato un rapido assorbimento di insulina attraverso la pelle nella circolazione sistemica, dove le concentrazioni sieriche massime di insulina sono state raggiunte 2 ore dopo la somministrazione attraverso il sistema a MN.

Il cerotto MN può anche essere conservato a temperatura ambiente per 20 giorni, con una concentrazione di insulina che rimane negli MN maggiore del 99,4%. Il processo di fabbricazione multistrato può contenere più dosaggi per le diverse terapie e soddisfare diversi requisiti di prestazioni meccaniche per punte e piedistalli. Seguendo questa logica sono stati valutati MN a due strati, realizzati con materiali e rapporti diversi per ottimizzare l'efficienza della somministrazione di insulina. Lee et al. hanno analizzato la capacità di penetrazione dei MN costituiti da diversi rapporti di PVP con due pesi molecolari (PVP10/PVP360) e hanno riscontrato che il rapporto di 1:3 era il migliore per la somministrazione di insulina in vivo [196]. Lo strato di supporto costituito da PVP360/CMC è stato selezionato per una migliore flessibilità e per un più confortevole 'adattamento alla pelle rispetto al supporto PVP360 puro. Tradizionalmente, gli MN che si

dissolvono sono per lo più fabbricati utilizzando micro-stampi attraverso un metodo di casting (versamento). Kim et al. hanno sviluppato una tecnica di fabbricazione alternativa, applicando un metodo che prevede un flusso d'aria generato da goccioline (DAB) che serve per modellare direttamente le goccioline di polimero e ottenere una solidificazione sui MN, le condizioni di fabbricazione sono ottimali (4–25 °C) e rapide ( $\leq 10$  min) senza perdita di farmaco [197].

In questo metodo, le goccioline di biopolimero sono state prima posizionate su una superficie piana per la fabbricazione della base dei MN attraverso elettofilatura (electrospinning) e un secondo momento una goccia contenente il polimero e il farmaco è stata posizionata sopra per la fabbricazione della punta dei MN. Successivamente, una piastra superiore è stata posta sopra e poi allontanata, in questo modo di è creata la punta dei MN che viene solidificata mediante insufflazione d'aria (Fig.19)



**Figura 19:** A) metodo di fabbricazione di MN che si dissolvono secondo la tecnica DAB. B) vari step di inserzione, separazione e impianto della punta dei MN preparati [130].

La diminuzione dei livelli glicemici nei topi diabetici e la biodisponibilità osservata ( $96,6 \pm 2,4\%$ ) hanno confermato l'efficacia della somministrazione di insulina associata a questo metodo di fabbricazione. Questa tecnologia può anche fornire più opzioni per quanto riguarda i materiali per la fabbricazione dei MN che si dissolvono, inclusi HA, CMC e PVP, mentre la struttura a strati ha ridotto al minimo gli eventuali sprechi del farmaco.

#### 4.4.4 Microaghi degradabili

La dinamica di rilascio dei carichi utili, derivanti dalla dissoluzione dei MN, è strettamente associata al tasso di dissoluzione dei polimeri, che di solito è veloce.

Per i farmaci proteici, che richiedono la somministrazione continua per mantenere una dose terapeutica costante, vengono preferiti come dispositivi di somministrazione gli MN con un periodo di degradazione più lungo [198].

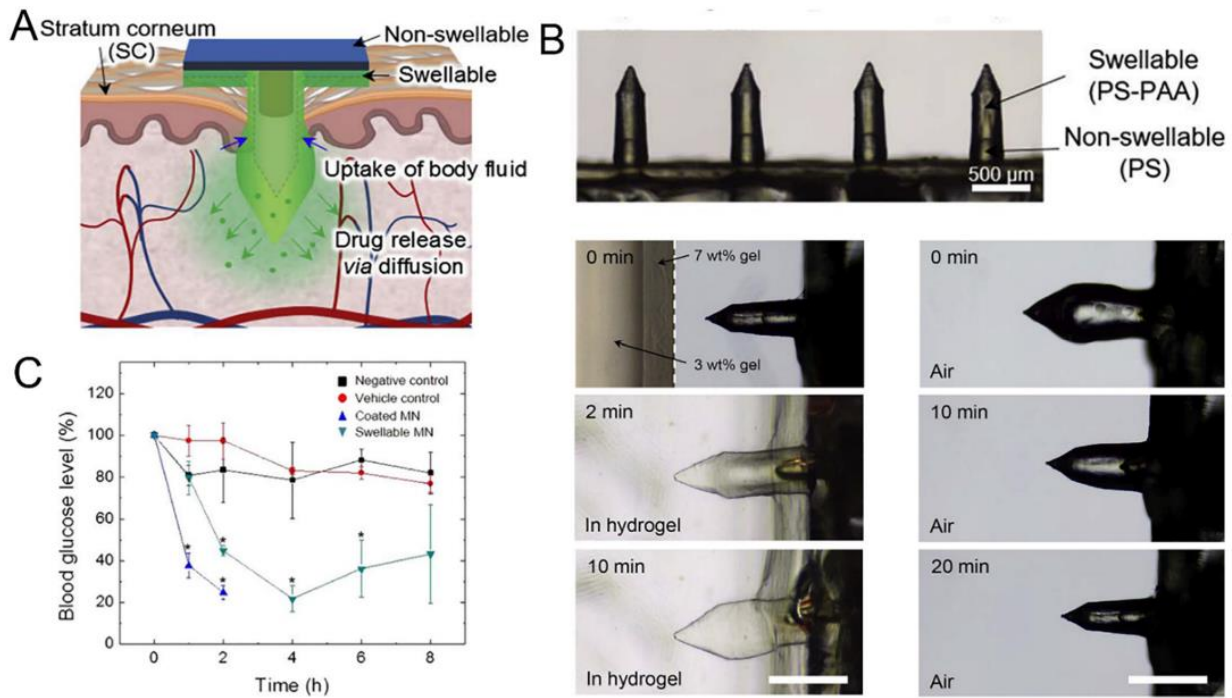
È stato dimostrato che i polimeri con peso molecolare e densità di reticolazione più elevati, forniscono un rilascio prolungato di insulina così come le proprietà meccaniche più stabili degli MN.

Il farmaco viene gradualmente rilasciato dagli MN biodegradabili attraverso la diffusione passiva durante il processo di degradazione, mentre il rigonfiamento degli MN può anche accelerare la diffusione del farmaco.

Ad esempio, sono stati studiati MN composti da alginato/maltosio reticolato con ioni calcio per la somministrazione di insulina, in cui il maltosio è stato incluso per migliorare la resistenza meccanica dei MN. I risultanti MN biodegradabili hanno mostrato una resistenza meccanica di circa 0,41 N per ago e si sono rigonfiati rapidamente in 5 minuti, con dissoluzione in 40 minuti. Gli MN caricati con insulina hanno rivelato un calo sostenuto di livelli glicemici nei ratti diabetici e hanno mantenuto l'attività farmacologica dell'insulina per un periodo più lungo rispetto al gruppo a cui è stata iniettata la stessa dose di insulina per via sottocutanea.

Yang e colleghi hanno progettato un cerotto rigonfiabile che potrebbe aderire alla pelle per un rilascio prolungato di insulina (Fig. 20) [199].

Il cerotto di MN a doppio strato consisteva in punte rigonfiabili di polystyrene- -poly(acrylic acid) (PS-PAA) che potevano rigonfiarsi assorbendo i fluidi corporei dopo l'inserimento nella pelle e uno strato PS non rigonfiabile. L'insulina in vitro rilasciata dagli MN era più sostenuta nell'arco di 12 ore senza presenza di burst release. Coerentemente con il comportamento di rilascio, questa piattaforma MN rigonfiabile, ha fornito un effetto ipoglicemico esteso nei topi normali che è durato fino a 8 ore.



**Figura 20:** sistema di MN rigonfiabili per la somministrazione transdermica di insulina [130].

Il gruppo di Jin et al ha sviluppato un cerotto MN a transizione di fase da PVA per la somministrazione transdermica di insulina. La reticolazione microcristallina ha permesso al MN di rigonfiarsi, ma non di dissolversi, dopo l'inserimento nella pelle, portando così a un rilascio prolungato di insulina dal cerotto.

Studi in vivo su un modello di suino diabetico, hanno dimostrato una biodisponibilità transdermica superiore al 20%. Nel frattempo, l'emoglobina glicata dei suini trattati con i cerotti continuamente per 2 mesi era inferiore a quelli trattati con la penna per insulina, indicando che i cerotti per insulina fornivano una migliore capacità di regolazione della glicemia.

In un altro studio recente, Diet et al. hanno integrato un cerotto MN estensibile per la somministrazione transdermica di insulina innescata da sforzo di trazione [200].

Il cerotto in elastomero incorporava depositi di micro-gel carichi con insulina all'interno, deformati sotto allungamento meccanico per promuovere il rilascio di quantità utili di insulina, che si diffondevano ulteriormente nel micro-ago di HA reticolato, per la somministrazione transdermica. Studi in vivo hanno dimostrato un'efficace riduzione di livelli glicemici nei topi diabetici in seguito alla somministrazione con questo dispositivo estensibile.

Ultimamente le bio-ceramiche hanno suscitato un crescente interesse nel campo della somministrazione transdermica di farmaci a causa della loro attraente biocompatibilità e delle loro forti proprietà meccaniche.

Yu et al. hanno preparato dei MN composti da bio-ceramiche organiche-inorganiche a base di gelatina e idrossiapatite per la somministrazione transdermica di insulina [201]. L'idrossiapatite, che ha una composizione chimica simile a quella dei tessuti umani, è considerata una ceramica biodegradabile ampiamente utilizzata nell'applicazione biomedica.

Gli MN composti da gelatina reticolata e incorporati in idrossiapatite hanno fornito una resistenza meccanica sufficiente per penetrare nella pelle umana, hanno mostrato un effetto ipoglicemico efficace ed un rilascio plasmatico di insulina prolungato, rispetto a quello ottenuto dall'iniezione sottocutanea nei ratti diabetici.

#### **4.4.5 Microaghi bioreattivi**

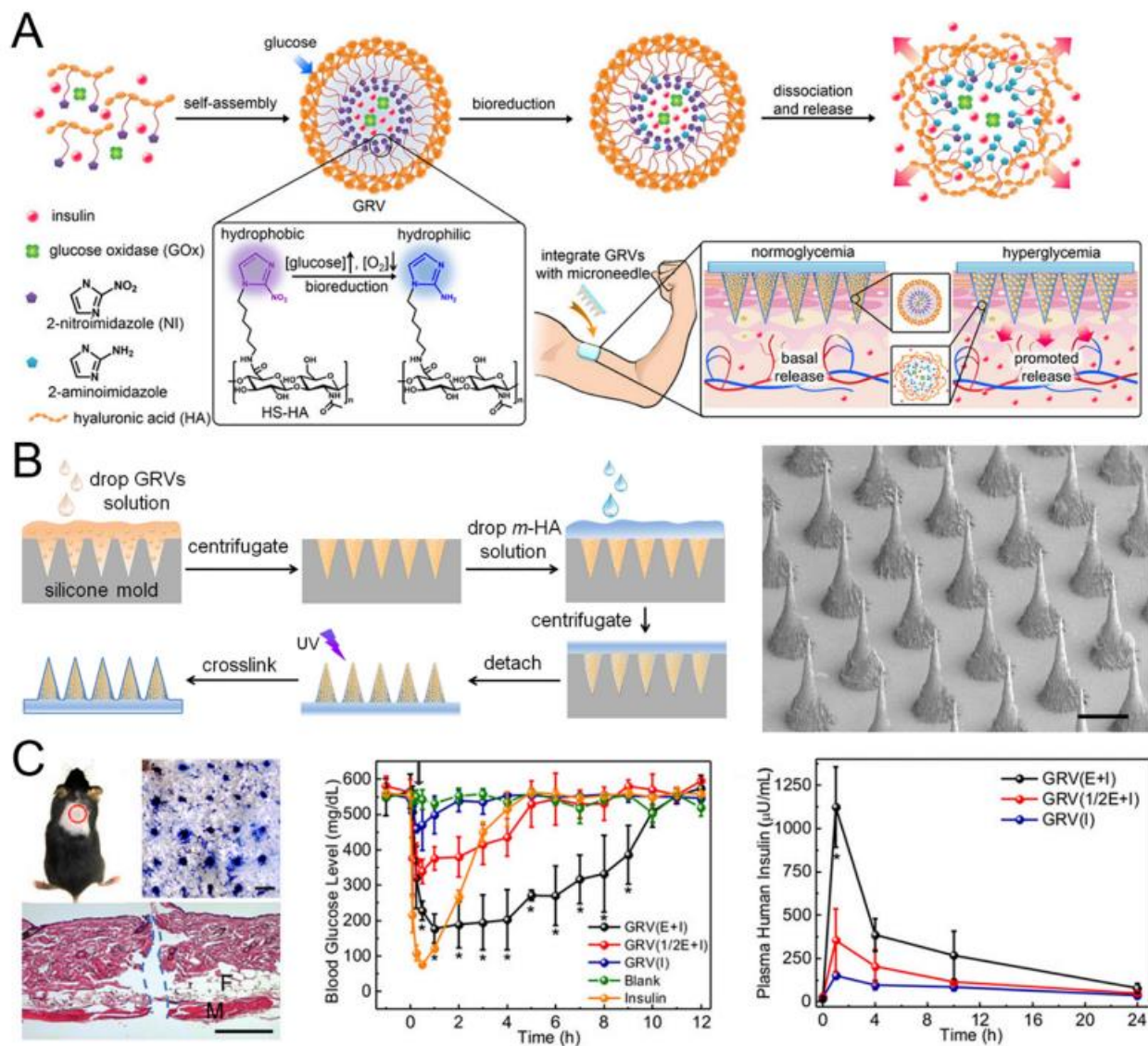
Recentemente, sono stati dedicati ampi sforzi per ottenere una somministrazione intelligente di insulina in funzione al glucosio presente nell'organismo. I MN bioreattivi che possono rispondere ai segnali fisiologici sono stati evidenziati come un approccio promettente per la somministrazione di insulina regolata dal glucosio. Questa piattaforma generalmente integra componenti sensibili al glucosio con matrice polimerica dei MN.

Nel 2015 Yu et al. hanno studiato un cerotto di MN sensibile al glucosio composto da matrice HA reticolata e vescicole reattive all'ipossia (GRV) come un "cerotto intelligente per insulina", che rappresenta una modalità indolore e autoregolata (Fig. 21) [202].

Le GRV sono state autoassemblate dal derivato dell'acido ialuronico sensibile all'ipossia (HS-HA), che conteneva un gruppo sensibile all'ipossia, il 2-nitroimidazolo (NI). In condizioni riduttive, l'NI idrofobico su HS-HA viene ridotto a 2-aminoimidazolo idrofilo, inducendo il disassemblaggio delle nanovesicole. Le GRV che incapsulano insulina e glucosio ossidasi (GOx) sono state quindi depositati nei MN per rilevare il livello elevato di glucosio nel sangue nel derma.

GOx, un enzima in grado di convertire il glucosio in acido gluconico, è stato ampiamente applicato come elemento sensibile al glucosio [203].

Durante l'ossidazione del glucosio catalizzata da GOx, l'ossigeno nel fluido corporeo è stato consumato, portando un ambiente ipossico localizzato.



**Figura 21:** Cerotto transcutaneo con MN caricato con nanoformulazioni (GVR) sensibili al glucosio [130].

Il microambiente ipossico indotto dall'enzima ha ulteriormente attivato la dissociazione delle GRV come risultato della bioriduzione di HS-HA e ha portato al successivo rilascio di insulina. Le GRV reattive all'ipossia sono stati in grado di rilasciare rapidamente insulina in presenza di glucosio e hanno ridotto rapidamente i livelli glicemici dei topi diabetici di tipo 1 a circa 200 mg/dL entro 0,5 ore con mantenimento in un intervallo normale fino a 4 ore. Inoltre, la somministrazione di un cerotto aggiuntivo è stata in grado di prolungare il periodo di trattamento, evitando il rischio di ipoglicemia.

Oltre a un ambiente ipossico o acido generato enzimaticamente, la generazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la reazione può anche fungere da fattore scatenante per promuovere il rilascio di insulina dai MN. Hu et al. segnalati MN bioreattivi incorporati in vescicole polimeriche (PV) [204].

Le PV sono state preparate mediante autoassemblaggio di un copolimero a blocchi composto da poliserina coniugata con polietilenglicole (PEG) ed estere fenilboronico (PBE) e ulteriormente caricato nei MN presenti in un cerotto. In presenza di livelli elevati di glucosio, l' $H_2O_2$  prodotto enzimaticamente ha ossidato la porzione di PBE, portando alla disgregazione delle vescicole e alla liberazione di insulina attraverso la matrice polimerica dei MN. In questo sistema, i profili di rilascio che rispondono al glucosio possono essere modulati regolando la quantità di GOx. L'introduzione delle PV che rispondono all' $H_2O_2$  nei MN ha mostrato la capacità di autoregolazione dei livelli glicemici in un modello di topo diabetico di tipo 1.

In un altro studio, Tong et al. hanno sintetizzato PVs sensibili al glucosio e all' $H_2O_2$  mediante approccio ingegneristico dell'acido fenilboronico (sensibile al glucosio) e 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-) benzil acrilato (sensibile all' $H_2O_2$ ). I risultanti MN caricati con PV hanno presentato un effetto ipoglicemico efficace in un modello di ratto diabetico rispetto a quello dell'iniezione sottocutanea o solo di MN caricati con insulina.

Xu et al. hanno costruito nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN) reattive all' $H_2O_2$ , che sono state quindi caricate con insulina e intrappolate in MN per la somministrazione transdermica [240]. Gli MSN porosi hanno agito come serbatoio di insulina insieme a GOx per la generazione di  $H_2O_2$  negli stati iperglicemici.

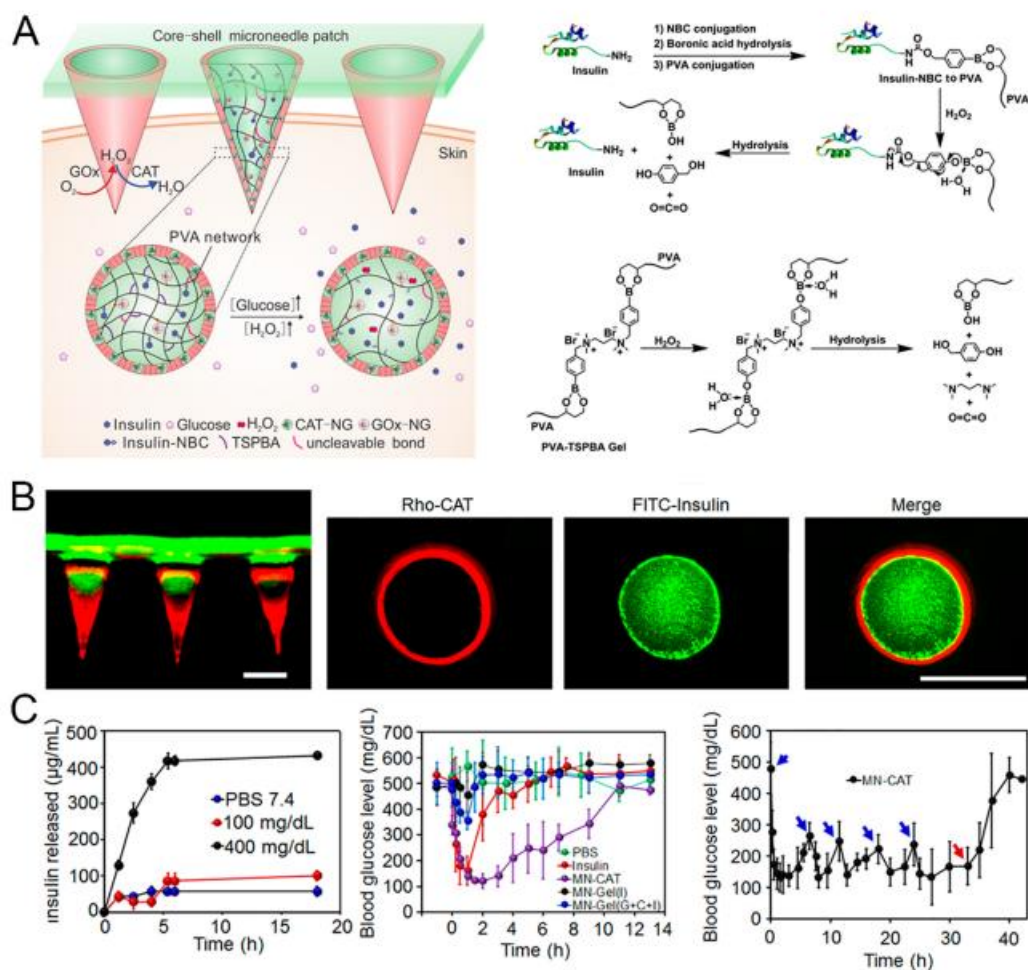
Per migliorare ulteriormente la capacità di risposta al glucosio, Yu et al. hanno progettato un sistema a doppia sensibilità all'ipossia e all' $H_2O_2$  basato su MN incorporati nel polimero per la somministrazione ottimizzata di insulina [205].

Un copolimero diblock anfifilico costituito da PEG e poliserina è stato utilizzato per preparare i polimeri a doppia sensibilità (d-GRP), su cui il gruppo NI ipossia sensibile è stato modificato tramite la frazione tioetere sensibile all' $H_2O_2$ .

Il rapido consumo di ossigeno e la generazione di  $H_2O_2$  da reazioni enzimatiche a livelli elevati di glucosio hanno contribuito all'aumentata solubilità in acqua del copolimero, innescando la dissociazione e il rilascio dell'insulina dai d-GRP. I risultati in vivo nei topi diabetici hanno mostrato che questo cerotto regolava efficacemente i livelli glicemici per 10 ore dopo la somministrazione con un'inflammatione cutanea minima.

In un altro progetto, Wang et al. hanno studiato un prodotto contenente MN core-shell direttamente da gel polimerico  $H_2O_2$ -degradabile (Fig. 22) [206]. Il nucleo dei MN consisteva in una rete di PVA reticolata con un linker in grado di scindersi con  $H_2O_2$  (TSPBA), l'insulina era inserita chimicamente nel PVA tramite un collegamento sensibile all' $H_2O_2$ . La GOx è stata incapsulata nel nanogel acrilato (GOx-NG) per limitare la perdita di GOx pur mantenendo la facilità di rilascio di insulina.





**Figura 22:** Cerotto di MN a matrice sensibile al glucosio per la somministrazione controllata di insulina, schema del sistema di somministrazione di insulina sensibile al glucosio utilizzando gel PVA-TSPBA reattivo all'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [130].

In condizioni iperglicemiche, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata generata localmente da GOx, con conseguente ossidazione e idrolizzazione sia dei reticolanti il PVA che dei coniugati di insulina, facilitando il rapido rilascio di insulina libera dai MN. I ricercatori hanno dimostrato che questo cerotto insulinico sensibile all'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentava una rapida reattività al glucosio e, con una ulteriore somministrazione di MN, era in grado di controllare i livelli glicemici per 40 ore senza dare una grave ipoglicemia.

Da notare, i MN sono stati ulteriormente rivestiti con uno strato sottile di nanogel che incorpora enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging (catalasi), facilitando così l'eliminazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per mitigare la sua lesione verso i tessuti normali dallo stress ossidativo. Le prestazioni in vivo di questo cerotto sono state superiori in quanto hanno effettivamente migliorato l'infiammazione nel tessuto cutaneo

trattato con MN rivestiti rispetto ai MN non rivestiti. Più recentemente, lo stesso gruppo di ricerca ha sviluppato un sistema di somministrazione di insulina attivato a cascata con  $H_2O_2$  e pH, in cui i MN presentavano una struttura a guaina [207]. L'insulina è stata intrappolata da copolimeri diblocco  $H_2O_2$  sensibili e caricati positivamente in micelle complesse di dimensioni nanometriche. Dopo l'incubazione in condizioni iperglicemiche, questo polimero altamente caricato può essere ossidato da  $H_2O_2$  e successivamente idrolizzato. La riduzione del pH durante l'ossidazione del glucosio ha anche ridotto la densità delle cariche negative sull'insulina per indebolire l'interazione tra insulina e polimeri, favorendone ulteriormente il rilascio.

Il meccanismo di innesco basato sia su pH che sulla presenza di  $H_2O_2$  assicurava che l'insulina fosse rilasciata solo nell'ambiente ossidativo e acido creato dall'ossidazione del glucosio in presenza di GOx. Incorporando catalasi-nanogel nella guaina che copre il nucleo dei MN caricato con micelle del complesso di insulina, questo cerotto potrebbe regolare i livelli di glucosio nei topi diabetici entro l'intervallo normale con un'efficace mitigazione dell'azione irritante di  $H_2O_2$ .

Infine, Ye et al. hanno descritto un'innovativa strategia di somministrazione transdermica di insulina che incorpora cellule  $\beta$  pancreatiche che secernono l'insulina con cerotto di MN per il trattamento del diabete [208].

Il trapianto di cellule secernenti insulina è stato studiato approfonditamente nel trattamento del diabete di tipo 1. Tuttavia, questo metodo può essere ostacolato dalla risposta immunitaria dell'ospite e da problemi con la biocompatibilità degli innesti cellulari. In questo approccio, la secrezione di insulina da cellule  $\beta$  esogene non viene impiantata e viene invece modulata dai livelli glicemici attraverso interazione con i MN contenenti amplificatori del segnale del glucosio (GSA). Le GSA erano nanovesicole polimeriche sensibili al glucosio che intrappolavano GOx,  $\alpha$ -amilasi (AM) e glucoamilasi (GA). La GOx è stata selezionata per indurre la dissociazione delle nanovesicole in condizioni iperglicemiche. L'AM rilasciata, idrolizzava a dare disaccaridi e trisaccaridi, che sono stati ulteriormente convertiti in glucosio dalla GA. Il glucosio "amplificato" localmente concentrato si è efficacemente diffuso nelle capsule di cellule  $\beta$  posizionate esternamente, dove promuove la secrezione e la diffusione dell'insulina attraverso i MN nella pelle. Questo sistema ha mostrato un'efficacia terapeutica estesa rispetto ai MN senza GSA, dove è stato dimostrato che uno di questi cerotti MN riduce rapidamente i livelli glicemici dei topi diabetici di tipo 1 e mantiene la riduzione dei livelli di glucosio per oltre 6 ore.

Poiché i microaghi non solo penetrano nello strato corneo per aumentare la permeabilità cutanea, ma trasportano anche direttamente l'insulina nello strato del derma, la tecnica basata sui microaghi ha dimostrato un'efficienza di trasporto relativamente maggiore rispetto ad altre strategie.

Grazie alla somministrazione comoda, facile e indolore, è considerato adatto alle persone non ospedalizzate con diabete per il trattamento domiciliare e mostra inoltre una grande promessa per una regolazione continua ed efficace della glicemia. Tuttavia, la potenziale rottura, irritazione e infezione dovrebbe essere studiata a fondo prima dell'applicazione sistematica nella pratica clinica.

## **5. Conclusioni e prospettive**

In conclusione, in questo elaborato di tesi abbiamo preso dapprima in considerazione i diversi tipi di farmaci antidiabetici con diversi bersagli terapeutici che sono stati testati e si è messa in evidenza l'appropriata combinazione di questi farmaci per ottenere un migliore controllo della glicemia e ridurre le complicazioni legate al diabete.

Oltre ai nuovi farmaci, le terapie hanno tenuto il passo con l'innovazione scientifica in nuovi percorsi terapeutici per i pazienti diabetici. Tra queste nuove vie, si sta esplorando la via orale, intranasale e polmonare per la somministrazione di insulina superando la classica via sottocutanea. I sistemi di trasporto maggiormente studiati si basano sulla nanotecnologia che mostra un grande potenziale con i vantaggi di una maggiore efficienza, una maggiore biodisponibilità, una ridotta tossicità e una ridotta frequenza di somministrazione. Un altro approccio trattato è stato quello del pancreas artificiale e l'impianto di cellule insulari che sono entrambi metodi promettenti per curare il diabete, nonostante gli ostacoli che devono ancora essere superati.

Infine, abbiamo esaminato i progressi tecnologici nello sviluppo di sistemi di somministrazione transdermica di insulina per la regolazione della glicemia.

Rispetto al trasporto passivo attraverso la pelle, l'uso di potenziatori chimici, strumenti esterni e dispositivi a micro-ago hanno mostrato un grande potenziale per migliorare la permeazione dell'insulina superando più facilmente la barriera cutanea.

A differenza della tradizionale iniezione ipodermica, la somministrazione transdermica di insulina si dimostra un metodo con maggiore compliance per il paziente e risulta minimamente invasivo per la gestione quotidiana del diabete.

Nonostante i grandi successi nella somministrazione transdermica di insulina, ci sono diverse limitazioni associate all'uso a lungo termine, all'efficienza della somministrazione e all'affidabilità che giustificano ulteriori ricerche che dovrebbero essere eseguite per valutare gli effetti collaterali a breve e lungo termine associati ai potenziatori chimici e ai diversi materiali con cui vengono fabbricati i micro-ago.

Infine, le tecnologie innovative per migliorare la stabilità, aumentare la biodisponibilità e mantenere la bioattività dell'insulina, sono fondamentali per consentire lo sviluppo definitivo di sistemi di somministrazione transdermica di insulina efficaci, economici e convenienti

## **Bibliografia**

- [1] O. Veiseh, B.C. Tang, K.A. Whitehead, D.G. Anderson, R. Langer, Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 45–57.
- [2] D.R. Owens, B. Zinman, G.B. Bolli, Insulins today and beyond, *Lancet* 358 (2001) 739–746.
- [3] A.R. Saltiel, C.R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414 (2001) 799–806.
- [4] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas, 8th edition* International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2017.
- [5] K.Wong, D. Glovaci, S.Malik, S.S. Franklin, G. Wygant, U. Iloeje, H. Kan, N.D.Wong, Comparison of demographic factors and cardiovascular risk factor control among U.S. adults with type 2 diabetes by insulin treatment classification, *J. Diabetes Complicat.* 26 (2012) 169–174.
- [6] K.M. Fox, R.A. Gerber Pharmd, B. Bolinder, J. Chen, S. Kumar, Prevalence of inadequate glycemic control among patients with type 2 diabetes in the United Kingdom general practice research database: a series of retrospective analyses of data from 1998 through 2002, *Clin. Ther.* 28 (2006) 388–395.
- [7] B. Carstensen, M.E. Jorgensen, S. Friis, The epidemiology of diabetes and cancer, *Curr. Diab. Rep.* 14 (2014) 535.
- [8] G. Danaei, C.M. Lawes, S. Vander Hoorn, C.J. Murray, M. Ezzati, Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-thanoptimum blood glucose concentration: comparative risk assessment, *Lancet* 368 (2006) 1651–1659.
- [9] J.W. Yau, S.L. Rogers, R. Kawasaki, E.L. Lamoureux, J.W. Kowalski, T. Bek, S.J. Chen, J.M. Dekker, A. Fletcher, J. Grauslund, S. Haffner, R.F. Hamman, M.K. Ikram, T. Kayama, B.E. Klein, R. Klein, S. Krishnaiah, K. Mayurasakorn, J.P. O'Hare, T.J. Orchard, M. Porta, M. Rema, M.S. Roy, T. Sharma, J. Shaw, H. Taylor, J.M. Tielsch, R. Varma, J.J. Wang, N. Wang, S. West, L. Xu, M. Yasuda, X. Zhang, P. Mitchell, T.Y. Wong, Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy, *Diabetes Care* 35 (2012) 556–564.
- [10] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas, 8th edition* International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2017.
- [11] C. Bommer, V. Sagalova, E. Heesemann, J.Manne-Goehler, R. Atun, T. Barnighausen,

J. Davies, S. Vollmer, Global economic burden of diabetes in adults: projections from 2015 to 2030, *Diabetes Care* 41 (2018) 963–970.

[12] Cheng Hu a,b, Weiping Jia a, □ , Therapeutic medications against diabetes: What we have and what we expect , *Advanced Drug Delivery Reviews* 139 (2019) 3–15

[13] C.J. Bailey, R.C. Turner, Metformin, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 574–579.

[14] R. Holman, Metformin as first choice in oral diabetes treatment: the UKPDS experience, *J. Annu. Diabetol. Hotel. Dieu.* (2007) 13–20.

[15] W.C. Knowler, S.E. Fowler, R.F. Hamman, C.A. Christophi, H.J. Hoffman, A.T. Brennehan, J.O. Brown-Friday, R. Goldberg, E. Venditti, D.M. Nathan, 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study, *Lancet* 374 (2009) 1677–1686.

[16] G. Rena, D.G. Hardie, E.R. Pearson, The mechanisms of action of metformin, *Diabetologia* 60 (2017) 1577–1585.

[17] R.C. Turner, The U.K. prospective diabetes study. A review, *Diabetes Care* 21 (1998) C35–C38.

[18] S.E. Inzucchi, R.M. Bergenstal, J.B. Buse, M. Diamant, E. Ferrannini, M. Nauck, A.L. Peters, A. Tsapas, R. Wender, D.R. Matthews, Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD), *Diabetes Care* 35 (2012) 1364–1379.

[19] L. Guo, L. Chen, B. Chang, L. Yang, Y. Liu, B. Feng, A randomized, open-label, multicentre, parallel-controlled study comparing the efficacy and safety of biphasic insulin aspart 30 plus metformin with biphasic insulin aspart 30 monotherapy for type 2 diabetes patients inadequately controlled with oral antidiabetic drugs: the merit study, *Diabetes Obes. Metab.* (2018).

[20] C.J. Bailey, R.C. Turner, Metformin, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 574–579.

[21] H. Yokoshiki, M. Sunagawa, T. Seki, N. Sperelakis, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells, *Am. J. Phys.* 274 (1998) C25–C37.

[22] A.J. Krentz, C.J. Bailey, Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus, *Drugs* 65 (2005) 385–411.

[23] M. Chen, C. Hu, W. Jia, Pharmacogenomics of glinides, *Pharmacogenomics* 16 (2015) 45–60.

[24] A. Dornhorst, Insulinotropic meglitinide analogues, *Lancet* 358 (2001) 1709–1716

[25] J. Rosenstock, D.R. Hassman, R.D. Madder, S.A. Brazinsky, J. Farrell, N. Khutoryansky, P.M. Hale, Repaglinide versus nateglinide monotherapy: a randomized, multicenter study, *Diabetes Care* 27 (2004) 1265–1270.

[26] H. Zhang, P. Bu, Y.H. Xie, J. Luo, M.X. Lei, Z.H. Mo, E.Y. Liao, Effect of repaglinide and

gliclazide on glycaemic control, early-phase insulin secretion and lipid profiles in, *Chin. Med. J.* 124 (2011) 172–176.

[27] W.Wang, R. Bu, Q. Su, J. Liu, G. Ning, Randomized study of repaglinide alone and in combination with metformin in Chinese subjects with type 2 diabetes naive to oral antidiabetes therapy, *Expert. Opin. Pharmacother.* 12 (2011) 2791–2799.

[28] H. Yki-Jarvinen, Thiazolidinediones, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1106–1118.

[29] T.M. Willson, M.H. Lambert, S.A. Kliewer, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease, *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001) 341–367.

[30] G. Viberti, S.E. Kahn, D.A. Greene, W.H. Herman, B. Zinman, R.R. Holman, S.M. Haffner, D. Levy, J.M. Lachin, R.A. Berry, M.A. Heise, N.P. Jones, M.I. Freed, A diabetes outcome progression trial (ADOPT): an international multicenter study of the comparative efficacy of rosiglitazone, glyburide, and metformin in recently diagnosed type 2 diabetes, *Diabetes Care* 25 (2002) 1737–1743.

[31] A. Gastaldelli, E. Ferrannini, Y. Miyazaki, M. Matsuda, A. Mari, R.A. Defronzo, Thiazolidinediones improve beta-cell function in type 2 diabetic patients, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292 (2007) E871–E883.

[32] S.E. Nissen, K. Wolski, Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes, *N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 2457–2471.

[33] P.D. Home, S.J. Pocock, H. Beck-Nielsen, P.S. Curtis, R. Gomis, M. Hanefeld, N.P. Jones, M. Komajda, J.J. McMurray, Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial, *Lancet* 373 (2009) 2125–2135

[34] R.G. Bach, M.M. Brooks, M. Lombardero, S. Genuth, T.W. Donner, A. Garber, L. Kennedy, E.S. Monrad, R. Pop-Busui, S.F. Kelsey, R.L. Frye, Response to letter regarding article, "rosiglitazone and outcomes for patients with diabetes mellitus and coronary artery disease in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes (BARI 2D) trial", *Circulation* 129 (2014) e460–e461.

[35] A.A. Tahrani, A.H. Barnett, C.J. Bailey, Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Endocrinol.* 12 (2016) 566–592.

[36] S. Madsbad, Review of head-to-head comparisons of glucagon-like peptide-1 receptor agonists, *Diabetes Obes. Metab.* 18 (2016) 317–332.

[37] D.J. Drucker, M.A. Nauck, The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes, *Lancet* 368 (2006) 1696–1705.

[38] S. Madsbad, Review of head-to-head comparisons of glucagon-like peptide-1 receptor agonists, *Diabetes Obes. Metab.* 18 (2016) 317–332.

[39] V.R. Aroda, R.R. Henry, J. Han, W. Huang, M.B. Deyoung, T. Darsow, B.J. Hoogwerf, Efficacy of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors: meta-analysis and systematic review, *Clin. Ther.* 34 (2012) (1247–1258.e1222).

- [40] M.A. Pfeffer, B. Claggett, R. Diaz, K. Dickstein, H.C. Gerstein, L.V. Kober, F.C. Lawson, L. Ping, X. Wei, E.F. Lewis, A.P. Maggioni, J.J. McMurray, J.L. Probstfield, M.C. Riddle, S.D. Solomon, J.C. Tardif, Lixisenatide in patients with type 2 diabetes and acute coronary syndrome, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 2247–2257.
- [41] Y. Handelsman, Z.T. Bloomgarden, G. Grunberger, G. Umpierrez, R.S. Zimmerman, T.S. Bailey, L. Blonde, G.A. Bray, A.J. Cohen, S. Dagogo-Jack, J.A. Davidson, D. Einhorn, O.P. Ganda, A.J. Garber, W.T. Garvey, R.R. Henry, I.B. Hirsch, E.S. Horton, D.L. Hurley, P.S. Jellinger, L. Jovanovic, H.E. Lebovitz, D. Leroith, P. Levy, J.B. McGill, J.I. Mechanick, J.H. Mestman, E.S. Moghissi, E.A. Orzech, R. Pessah-Pollack, P.D. Rosenblit, A.I. Vinik, K. Wyne, F. Zangeneh, American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology - clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan - 2015, *Endocr. Pract.* 21 (2015) 1–87.
- [42] S.L. Zheng, A.J. Roddick, R. Aghar-Jaffar, M.J. Shun-Shin, D. Francis, N. Oliver, K. Meeran, Association between use of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors, glucagon-like peptide 1 agonists, and dipeptidyl peptidase 4 inhibitors with all-cause mortality in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *JAMA* 319 (2018) 1580–1591.
- [43] Y. Kanai, W.S. Lee, G. You, D. Brown, M.A. Hediger, The human kidney low affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose, *J. Clin. Investig.* 93 (1994) 397–404.
- [44] M.A. Nauck, Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes, *Drug Des. Dev. Ther.* 8 (2014) 1335–1380.
- [45] C.E. Mogensen, Maximum tubular reabsorption capacity for glucose and renal hemodynamics during rapid hypertonic glucose infusion in normal and diabetic subjects, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 28 (1971) 101–109.
- [46] S. Sha, D. Devineni, A. Ghosh, D. Polidori, S. Chien, D. Wexler, K. Shalayda, K. Demarest, P. Rothenberg, Canagliflozin, a novel inhibitor of sodium glucose cotransporter 2, dose dependently reduces calculated renal threshold for glucose excretion and increases urinary glucose excretion in healthy subjects, *Diabetes Obes. Metab.* 13 (2011) 669–672.
- [47] R.A. Defronzo, M. Hompesch, S. Kasichayanula, X. Liu, Y. Hong, M. Pfister, L.A. Morrow, B.R. Leslie, D.W. Boulton, A. Ching, F.P. Lacteta, S.C. Griffen, Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 36 (2013) 3169–3176.
- [48] E. Ferrannini, E. Muscelli, S. Frascerra, S. Baldi, A. Mari, T. Heise, U.C. Broedl, H.J. Woerle, Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 499–508.
- [49] V. Vallon, K. Richter, R.C. Blantz, S. Thomson, H. Osswald, Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (1999) 2569–2576.
- [50] E. Ferrannini, S.J. Ramos, A. Salsali, W. Tang, J.F. List, Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial, *Diabetes Care* 33 (2010) 2217–2224

- [51] M.C. Thomas, Renal effects of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes, *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 5 (2014) 53–61
- [52] S. Sha, D. Polidori, T. Heise, J. Natarajan, K. Farrell, S.S.Wang, D. Sica, P. Rothenberg, L. Plum-Morschel, Effect of the sodium glucose co-transporter 2 inhibitor canagliflozin on plasma volume in patients with type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Obes. Metab.* 16 (2014) 1087–1095.
- [53] S.A. Brunton, The potential role of sodiumglucose co-transporter 2 inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes mellitus, *Int. J. Clin. Pract.* 69 (2015) 1071–1087.
- [54] M. Bliss, Rewriting medical history: Charles best and the banting and best myth, *J. Hist. Med. Allied Sci.* 48 (1993) 253–274.
- [55] C. Mathieu, P. Gillard, K. Benhalima, Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (2017) 385–399.
- [56] D.M. Nathan, S. Genuth, J. Lachin, P. Cleary, O. Crofford, M. Davis, L. Rand, C. Siebert, The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus, *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 977–986.
- [57] V.A. Fonseca, M.A. Haggard, Achieving glycaemic targets with basal insulin in T2DM by individualizing treatment, *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (2014) 276–281.
- [58] A.N. Zaykov, J.P. Mayer, R.D. Dimarchi, Pursuit of a perfect insulin, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (2016) 425–439.
- [59] D.R. Owens, New horizons—alternative routes for insulin therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 529–540.
- [60] A.V. Madenidou, P. Paschos, T. Karagiannis, A. Katsoula, E. Athanasiadou, K. Kitsios, E. Bekiari, D.R. Matthews, A. Tsapas, Comparative benefits and harms of basal insulin analogues for type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis, *Ann. Intern. Med.* 169 (2018) 165–174.
- [61] J.C. Pickup, Management of diabetes mellitus: is the pump mightier than the pen? *Nat. Rev. Endocrinol.* 8 (2012) 425–433.
- [62] R. Hovorka, Closed-loop insulin delivery: from bench to clinical practice, *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 (2011) 385–395.
- [63] B.M. Frier, Hypoglycaemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications, *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (2014) 711–722.
- [64] A.I. Geller, N. Shehab, M.C. Lovegrove, S.R. Kegler, K.N. Weidenbach, G.J. Ryan, D.S. Budnitz, National estimates of insulin-related hypoglycemia and errors leading to emergency department visits and hospitalizations, *JAMA Intern. Med.* 174 (2014) 678–686.
- [65] R. Mo, T. Jiang, J. Di, W. Tai, Z. Gu, Emerging micro- and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 3595–3629.
- [66] Yu-Jung Lin a,1, Fwu-Long Mi b,1, Po-Yen Lina, Yang-Bao Miao a, Tringyo Huang a, Kuan-Hung Chen a, Chiung-Tong Chen c, Yen Chang d,2, Hsing-Wen Sung a,□,2 , Strategies for improving diabetic therapy via alternative administration routes that involve stimuli-responsive insulin-delivering systems , *Advanced Drug Delivery Reviews* 139 (2019) 71–82



- [67] El-S. Khafagy, M. Morishita, Y. Onuki, K. Takayama, Current challenges in noninvasive insulin delivery systems: a comparative review, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1521–1546.
- [68] S. Maher, D.J. Brayden, Overcoming poor permeability: translating permeation enhancers for oral peptide delivery, *Drug Discov. Today* 9 (2012) e113–e119.
- [69] S. Ménard, N. Cerf-Bensussan, M. Heyman, Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens, *Mucosal Immunol.* 3 (2010) 247–259.
- [70] H.N. Nellans, Mechanisms of peptide and protein absorption: paracellular intestinal transport: modulation of absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 7 (1991) 339–364.
- [71] M. Thanou, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 (2001) 117–126.
- [72] D.F. Evans, G. Pye, R. Bramley, A.G. Clark, T.J. Dyson, J.D. Hardcastle, Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects, *Gut* 29 (1988) 1035–1041.
- [73] K. Sonaje, Y.H. Lin, J.H. Juang, S.P. Wey, C.T. Chen, H.W. Sung, In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery, *Biomaterials* 30 (2009) 2329–2339.
- [74] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* 12 (2013) 991–1003.
- [75] D. Ameye, J. Voorspoels, P. Foreman, J. Tsai, P. Richardson, S. Geresh, J.P. Remon, Trypsin inhibition, calcium and zinc ion binding of starch-g-poly(acrylic acid) copolymers and starch/poly(acrylic acid) mixtures for peroral peptide drug delivery, *J. Control. Release* 75 (2001) 357–364.
- [76] L.L. Chang, J.P. Bai, Evidence for the existence of insulin-degrading enzyme on the brush-border membranes of rat enterocytes, *Pharm. Res.* 13 (1996) 801–803.
- [77] J. Renukuntla, A.D. Vadlapudi, A. Patel, S.H. Boddu, A.K. Mitra, Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins, *Int. J. Pharm.* 447 (2013) 75–93.
- [78] E.Y. Chuang, K.J. Lin, P.Y. Lin, H.L. Chen, S.P. Wey, F.L. Mi, H.C. Hsiao, C.T. Chen, H.W. Sung, Self-assembling bubble carriers for oral protein delivery, *Biomaterials* 64 (2015) 115–124.
- [79] M.C. Chen, F.L. Mi, Z.X. Liao, C.W. Hsiao, K. Sonaje, M.F. Chung, L.W. Hsu, H.W. Sung, Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 865–879.
- [80] L.W. Hsu, Y.C. Ho, E.Y. Chuang, C.T. Chen, J.H. Juang, F.Y. Su, S.M. Hwang, H.W. Sung, Effects of pH on molecular mechanisms of chitosan-integrin interactions and resulting tight-junction disruptions, *Biomaterials* 34 (2013) 784–793.
- [81] X. Gao, Y. Cao, X. Song, Z. Zhang, X. Zhuang, C. He, X. Chen, Biodegradable, pH-responsive carboxymethyl cellulose/poly(acrylic acid) hydrogels for oral insulin delivery, *Macromol. Biosci.* 14 (2014) 565–575.
- [82] K. Sonaje, Y.H. Lin, J.H. Juang, S.P. Wey, C.T. Chen, H.W. Sung, In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery, *Biomaterials*

[83] Y.H. Lin, C.K. Chung, C.T. Chen, H.F. Liang, S.C. Chen, H.W. Sung, Preparation of nanoparticles composed of chitosan/poly-gamma-glutamic acid and evaluation of their permeability through Caco-2 cells, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1104–1112.

[84] M. Morishita, T. Goto, K. Nakamura, A.M. Lowman, K. Takayama, N.A. Peppas, Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats, *J. Control. Release* 110 (2006) 587–594.

[85] M.R. Rekha, C.P. Sharma, Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption, *J. Control. Release* 135 (2009) 144–151.

[86] F. Cui, F. Qian, Z. Zhao, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Preparation, characterization, and oral delivery of insulin loaded carboxylated chitosan grafted poly(methyl methacrylate) nanoparticles, *Biomacromolecules* 10 (2009) 1253–1258.

[87] A.K. Agrawal, H. Harde, K. Thanki, S. Jain, Improved stability and antidiabetic potential of insulin containing folic acid functionalized polymer stabilized multilayered liposomes following oral administration, *Biomacromolecules* 15 (2014) 350–360.

[88] K. Sonaje, K.J. Lin, S.P. Wey, C.K. Lin, T.H. Yeh, H.N. Nguyen, C.W. Hsu, T.C. Yen, J.H. Juang, H.W. Sung, Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: oral delivery using pH-responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection, *Biomaterials* 31 (2010) 6849–6858.

[89] P. Mukhopadhyay, S.C. hakraborty, S. Bhattacharya, R. Mishra, P.P. Kundu, pH sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 640–648.

[90] B.A. Teply, R. Tong, S.Y. Jeong, G.L. Luther, I. Sherifi, C.H. Yim, A. Khademhosseini, O.C. Farokhzad, R.S. Langer, J. Cheng, The use of charge-coupled polymeric microparticles and micromagnets for modulating the bioavailability of orally delivered macromolecules, *Biomaterials* 29 (2008) 1216–1223.

[91] R. Mo, T. Jiang, J. Di, W. Tai, Z. Gu, Emerging micro- and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 3595–3629.

[92] L. Li, G. Jiang, W. Yu, D. Liu, H. Chen, Y. Liu, Q. Huang, Z. Tong, J. Yao, X. Kong, A composite hydrogel system containing glucose-responsive nanocarriers for oral delivery of insulin, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 69 (2016) 37–45.

[93] D.R. Owens, New horizons—alternative routes for insulin therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 529–540.

[94] Y. Zhang, Y.M. Lam, W.S. Tan, Poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide)-g-poly (vinylpyrrolidone): association behavior in aqueous solution and interaction with anionic surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 285 (2005) 74–79.

[95] C. Karavasili, D.G. Fatouros, Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery, *Drug Discov. Today* 21 (2016) 157–166.

[96] T.W. Chung, D.Z. Liu, J.S. Yang, Effects of interpenetration of thermo-sensitive gels by

crosslinking of chitosan on nasal delivery of insulin: in vitro characterization and in vivo study, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 316–322.

[97] R.M. Singh, A. Kumar, K. Pathak, Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 (2013) 115–130.

[98] R. D'Souza, S. Mutalik, M. Venkatesh, S. Vidyasagar, N. Udupa, Nasal insulin gel as an alternate to parenteral insulin: formulation, preclinical, and clinical studies, *AAPS PharmSciTech* 6 (2005) E184–E189.

[99] M. Kapoor, J.C. Cloyd, R.A. Siegel, A review of intranasal formulations for the treatment of seizure emergencies, *J. Control. Release* 237 (2016) 147–159.

[100] C. Loira-Pastoriza, J. Todoroff, R. Vanbever, Delivery strategies for sustained drug release in the lungs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 81–91.

[101] O. Veisoh, B.C. Tang, K.A. Whitehead, D.G. Anderson, R. Langer, Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 45–57.

[102] O. Kammona, C. Kiparissides, Recent advances in nanocarrier-based mucosal delivery of biomolecules, *J. Control. Release* 161 (2012) 781–794.

[103] M. Smola, T. Vandamme, A. Sokolowski, Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases, *Int. J. Nanomedicine* 3 (2008) 1–19.

[104] P. Muralidharan, M. Malapit, E. Mallory, D. Hayes, H.M. Mansour, Inhalable nanoparticulate powders for respiratory delivery, *Nanomedicine* 11 (2015) 1189–1199.

[105] E. Karathanasis, R. Bhavane, A.V. Annapragada, Glucose-sensing pulmonary delivery of human insulin to the systemic circulation of rats, *Int. J. Nanomedicine* 2 (2007) 501–513

[106] Z. Chen, J. Wang, W. Sun, E. Archibong, A.R. Kahkoska, X. Zhang, Y. Lu, F.S. Ligler, J.B. Buse, Z. Gu, Synthetic beta cells for fusion-mediated dynamic insulin secretion, *Nat. Chem. Biol.* 14 (2018) 86–93.

[107] J.S. Skyler, Continuous subcutaneous insulin infusion—an historical perspective, *Diabetes Technol. Ther.* 12 (2010) S5–S9.

[108] Hovorka R. Closed-loop insulin delivery: from bench to clinical practice. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7: 385–395

[109] R.S. Mecklenburg, E.A. Benson, J.W. Benson Jr., P.N. Fredlund, T. Guinn, R.J. Metz, R.L. Nielsen, C.A. Sanner, Acute complications associated with insulin infusion pump therapy. Report of experience with 161 patients, *JAMA* 252 (1984) 3265–3269.

[110] P.J. Blackshear, T.D. Rohde, J.C. Grotting, F.D. Dorman, P.R. Perkins, R.L. Varco, H. Buchwald, Control of blood glucose in experimental diabetes by means of a totally implantable insulin infusion device, *Diabetes* 28 (1979) 634–639.

[111] L. Bally, H. Thabit, R. Hovorka, Finding the right route for insulin delivery - an overview of implantable pump therapy, *Expert Opin. Drug Deliv.* 14 (2017) 1103–1111.

[112] R. Alamoudi, M. Alsubaiee, A. Alqarni, Y. Saleh, S. Aljaser, A. Salam, M. Eledrisi,

Comparison of insulin pump therapy and multiple daily injections insulin regimen in patients with type 1 diabetes during ramadan fasting, *Diabetes Technol. Ther.* 19 (2017) 349–354.

[113] J. Rosenstock, J.B. Buse, R. Azeem, P. Prabhakar, H. Huang, M.A. Baron, Efficacy and safety of ITCA 650, a novel drug-device GLP-1 receptor agonist, in type 2 diabetes uncontrolled with oral antidiabetes drugs: the FREEDOM-1 trial, *Diabetes Care* 41 (2018) 333–340.

[114] R.R. Henry, J. Rosenstock, D.S. Denham, P. Prabhakar, L. Kjems, M.A. Baron, Clinical impact of ITCA 650, a novel drug-device GLP-1 receptor agonist, in uncontrolled type 2 diabetes and very high baseline HbA1c: the FREEDOM-1 HBL (High Baseline) study, *Diabetes Care* 41 (2018) 613–619.

[115] R. Henry, J. Rosenstock, J.F. McCarthy, G. Carls, T. Alessi, J. Yee, M. Baron, Treatment satisfaction with ITCA 650, a novel drug-device delivering continuous exenatide, versus twice-daily injections of exenatide in type 2 diabetics using metformin, *Diabetes Obes. Metab.* 20 (2018) 638–645.

[116] T. Peyser, E. Dassau, M. Breton, J.S. Skyler, The artificial pancreas: current status and future prospects in the management of diabetes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1311 (2014) 102–123.

[117] Z. Chen, J. Wang, W. Sun, E. Archibong, A.R. Kahkoska, X. Zhang, Y. Lu, F.S. Ligler, J.B. Buse, Z. Gu, Synthetic beta cells for fusion-mediated dynamic insulin secretion, *Nat. Chem. Biol.* 14 (2018) 86–93.

[118] G.M. Steil, Algorithms for a closed-loop artificial pancreas: the case for proportional-integral-derivative control, *J. Diabetes Sci. Technol.* 7 (2013) 1621–1631.

[119] Y. Ruan, L. Bally, H. Thabit, Hypoglycaemia incidence and recovery during home use of hybrid closed-loop insulin delivery in adults with type 1 diabetes, *Diabetes Obes. Metab.* 20 (2018) 2004–2008.

[120] B.W. Bequette, Challenges and recent Progress in the Development of a Closedloop Artificial Pancreas, *Annu. Rev. Control.* 36 (2012) 255–266.

[121] Standards of medical care in diabetes—2014, *Diabetes Care* 37 (2014) S14–S80.

[122] B. Ludwig, A. Reichel, A. Kruppa, S. Ludwig, A. Steffen, J. Weitz, S.R. Bornstein, Islet transplantation at the Dresden diabetes center: five years' experience, *Horm. Metab. Res.* 47 (2015) 4–8.

[123] H. Liljeback, L. Grapensparr, J. Olerud, P.O. Carlsson, Extensive loss of Islet Mass beyond the first day after intraportal human islet transplantation in a mouse model, *Cell Transplant.* 25 (2016) 481–489.

[124] Y.H. Hwang, M.J. Kim, Y.K. Lee, M. Lee, D.Y. Lee, HMGB1 modulation in pancreatic islets using a cell-permeable A-box fragment, *J. Control. Release* 246 (2017) 155–163.

[125] A.A. Sharkawy, B. Klitzman, G.A. Truskey, W.M. Reichert, Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. III. Effective tissue response times, *J. Biomed. Mater. Res.* 40 (1998) 598–605.

[126] A. Pileggi, R.D. Molano, C. Ricordi, E. Zahr, J. Collins, R. Valdes, L. Inverardi, Reversal

of diabetes by pancreatic islet transplantation into a subcutaneous, neovascularized device, *Transplantation* 81 (2006) 1318–1324.

[127] T. Desai, L.D. Shea, Advances in islet encapsulation technologies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 338–350.

[128] A.R. Pepper, B. Gala-Lopez, R. Pawlick, S. Merani, T. Kin, A.M. Shapiro, A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 518–523

[129] J.B. Sneddon, Q. Tang, P. Stock, J.A. Bluestone, S. Roy, T. Desai, M. Hebrok, Stem cell therapies for treating diabetes: progress and remaining challenges, *Cell Stem Cell* 22 (2018) 810–823.

[130] Y. Zhang et al., Advances in transdermal insulin delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 139 (2019) 51–70

[131] A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 603–618.

[132] M.E. Lane, Skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.* 447 (2013) 12–21.

[133] K.M. Yerramsetty, V.K. Rachakonda, B.J. Neely, S.V. Madihally, K.A. Gasem, Effect of different enhancers on the transdermal permeation of insulin analog, *Int. J. Pharm.* 398 (2010) 83–92.

[134] A.C. Sintov, U. Wormser, Topical iodine facilitates transdermal delivery of insulin, *J. Control. Release* 118 (2007) 185–188.

[135] Y.-z. Li, Y.-s. Quan, L. Zang, M.-n. Jin, F. Kamiyama, H. Katsumi, A. Yamamoto, S. Tsutsumi, Transdermal delivery of insulin using trypsin as a biochemical enhancer, *Biol. Pharm. Bull.* 31 (2008) 1574–1579.

[136] Y. Chen, Y. Shen, X. Guo, C. Zhang, W. Yang, M. Ma, S. Liu, M. Zhang, L.P. Wen, Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified via phage display, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 455–460.

[137] M. Chang, X. Li, Y. Sun, F. Cheng, Q. Wang, X. Xie, W. Zhao, X. Tian, Effect of cationic cyclopeptides on transdermal and transmembrane delivery of insulin, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 951–957.

[138] C.M. Nastiti, T. Ponto, E. Abd, J.E. Grice, H.A. Benson, M.S. Roberts, Topical nano and microemulsions for skin delivery, *Pharmaceutics* 9 (2017) 37.

[139] T.W. Prow, J.E. Grice, L.L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E.M. Wurm, C. Yoong, T.A. Robertson, H.P. Soyer, Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 470–491.

[140] M.J. King, D. Michel, M. Foldvari, Evidence for lymphatic transport of insulin by topically applied biphasic vesicles, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 1339–1344.

[141] M. Higaki, M. Kameyama, M. Udagawa, Y. Ueno, Y. Yamaguchi, R. Igarashi, T. Ishihara, Y. Mizushima, Transdermal delivery of CaCO<sub>3</sub>-nanoparticles containing insulin, *Diabetes Technol. Ther.* 8 (2006) 369–374.

- [142] Y. Tahara, S. Honda, N. Kamiya, M. Goto, Transdermal delivery of insulin using a solid-in-oil nanodispersion enhanced by arginine-rich peptides, *Med. Chem. Commun.* 3 (2012) 1496.
- [143] M.J. King, I. Badea, J. Solomon, P. Kumar, K.J. Gaspar, M. Foldvari, Transdermal delivery of insulin from a novel biphasic lipid system in diabetic rats, *Diabetes Technol. Ther.* 4 (2002) 479–488.
- [144] K. Nose, D. Pissuwan, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, Gold nanorods in an oilbase formulation for transdermal treatment of type 1 diabetes in mice, *Nanoscale* 4 (2012) 3776–3780.
- [145] Y.N. Kalia, A. Naik, J. Garrison, R.H. Guy, Iontophoretic drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 619–658.
- [146] M.J. Pikal, The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 281–305.
- [147] A. Sieg, F. Jeanneret, M. Fathi, D. Hochstrasser, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, R.H. Guy, M.B. Delgado-Charro, Extraction of amino acids by reverse iontophoresis in vivo, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 226–231.
- [148] A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, *Pharm. Sci. Technol. Today* 3 (2000) 318–326.
- [149] A.K. Banga, Y.W. Chien, Characterization of in vitro transdermal iontophoretic delivery of insulin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19 (1993) 2069–2087.
- [150] O. Siddiqui, Y. Sun, J.C. Liu, Y.W. Chien, Facilitated transdermal transport of insulin, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 341–345.
- [151] R. Panchagnula, P. Bindra, N. Kumar, C. Shanker Dey, O. Pillai, Stability of insulin under iontophoretic conditions, *Pharmazie* 61 (2006) 1014–1018.
- [152] K. Kajimoto, M. Yamamoto, M. Watanabe, K. Kigasawa, K. Kanamura, H. Harashima, K. Kogure, Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis, *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 57–65.
- [153] B. Kari, Control of blood glucose levels in alloxan-diabetic rabbits by iontophoresis of insulin, *Diabetes* 35 (1986) 217–221.
- [154] O. Pillai, V. Nair, R. Panchagnula, Transdermal iontophoresis of insulin: IV. Influence of chemical enhancers, *Int. J. Pharm.* 269 (2004) 109–120.
- [155] S.K. Rastogi, J. Singh, Transepidermal transport enhancement of insulin by lipid extraction and iontophoresis, *Pharm. Res.* 19 (2002) 427–433.
- [156] S. Murdan, Electro-responsive drug delivery from hydrogels, *J. Control. Release* 92 (2003) 1–17.
- [157] S. Kagatani, T. Shinoda, Y. Konno, M. Fukui, T. Ohmura, Y. Osada, Electroresponsive pulsatile depot delivery of insulin from poly(dimethylaminopropylacrylamide) gel in rats, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1273–1277.
- [158] O. Pillai, Transdermal delivery of insulin from poloxamer gel: ex vivo and in vivo skin permeation studies in rat using iontophoresis and chemical enhancers, *J. Control.*

Release 89 (2003) 127–140.

[159] H. Inada, A.-H. Ghanem, W.I. Higuchi, Studies on the effects of applied voltage and duration on human epidermal membrane alteration/recovery and the resultant effects upon iontophoresis, *Pharm. Res.* 11 (1994) 687–697.

[160] G. Yan, K.D. Peck, H. Zhu, W.I. Higuchi, S.K. Li, Effects of electrophoresis and electroosmosis during alternating current iontophoresis across human epidermal membrane, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 547–558.

[161] V.F. Lvovich, E. Matthews, A.T. Riga, L. Kaza, AC electrokinetic platform for iontophoretic transdermal drug delivery, *J. Control. Release* 145 (2010) 134–140.

[162] M.L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, D. Miklavčič, Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16 (2014).

[163] J.D. Denuzzio, B. Berner, Electrochemical and iontophoretic studies of human skin, *J. Control. Release* 11 (1990) 105–112.

[164] E.A. Mohammad, W.M. Elshemey, A.A. Elsayed, A.A. Abd-Elghany, Electroporation parameters for successful transdermal delivery of insulin, *Am. J. Ther.* 23 (2016) e1560–e1567.

[165] A. Sen, M.E. Daly, S.W. Hui, Transdermal insulin delivery using lipid enhanced electroporation, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1564 (2002) 5–8.

[166] T.W. Wong, T.Y. Chen, C.C. Huang, J.C. Tsai, S.W. Hui, Painless skin electroporation as a novel way for insulin delivery, *Diabetes Technol. Ther.* 13 (2011) 929–935.

[167] C.T.-S. Ching, T.-P. Sun, W.-T. Huang, S.-H. Huang, C.-S. Hsiao, K.-M. Chang, A circuit design of a low-cost, portable and programmable electroporation device for biomedical applications, *Sensors Actuators B Chem.* 166-167 (2012) 292–300.

[168] Y. Zhang, J. Yu, H.N. Bomba, Y. Zhu, Z. Gu, Mechanical force-triggered drug delivery, *Chem. Rev.* 116 (2016) 12536–12563.

[169] C.C. Coussios, R.A. Roy, Applications of acoustics and cavitation to noninvasive therapy and drug delivery, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 40 (2008) 395–420.

[170] W. Gaertner, Frequency dependence of ultrasonic cavitation, *J. Acoust. Soc. Am.* 26 (1954) 977–980.

[171] S. Mitragotri, D. Blankschtein, R. Langer, Transdermal drug delivery using low frequency sonophoresis, *Pharm. Res.* 13 (1996) 411–420.

[172] A. Boucaud, M.A. Garrigue, L. Machet, L.C. Vaillant, F. Patat, Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats, *J. Control. Release* 81 (2002) 113–119.

[173] E. Park, J. Dodds, N. Smith, Dose comparison of ultrasonic transdermal insulin delivery to subcutaneous insulin injection, *Int. J. Nanomedicine* 3 (2008) 335.

[174] E.J. Park, J. Werner, D. Jaiswal, N.B. Smith, Closed-loop controlled noninvasive ultrasonic glucose sensing and insulin delivery, *AIP Conf. Proc.*, AIP 2010, pp. 157–160.

- [175] I. Suarez Castellanos, A. Jeremic, J. Cohen, V. Zderic, Ultrasound stimulation of insulin release from pancreatic beta cells as a potential novel treatment for Type 2 diabetes, *Ultrasound Med. Biol.* 43 (2017) 1210–1222.
- [176] I. Suarez Castellanos, T. Singh, B. Balteanu, D.C. Bhowmick, A. Jeremic, V. Zderic, Calcium-dependent ultrasound stimulation of secretory events from pancreatic beta cells, *J. Ther. Ultrasound* 5 (2017) 30.
- [177] K. Sonoki, M. Yoshinari, M. Iwase, K. Tashiro, K. Iino, M. Wakisaka, M. Fujishima, Regurgitation of blood into insulin cartridges in the pen-like injectors, *Diabetes Care* 24 (2001) 603–604.
- [178] J. Malone, S. Lowitt, N. Grove, S. Shah, Comparison of insulin levels after injection by jet stream and disposable insulin syringe, *Diabetes Care* 9 (1986) 637–640.
- [179] L. Guo, X. Xiao, X. Sun, C. Qi, Comparison of jet injector and insulin pen in controlling plasma glucose and insulin concentrations in type 2 diabetic patients, *Medicine* 96 (2017).
- [180] A. Arora, I. Hakim, J. Baxter, R. Rathnasingham, R. Srinivasan, D.A. Fletcher, S. Mitragotri, Needle-free delivery of macromolecules across the skin by nanoliter-volume pulsed microjets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 4255–4260.
- [181] S. Henry, D.V. McAllister, M.G. Allen, M.R. Prausnitz, Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 922–925.
- [182] M.R. Prausnitz, Engineering microneedle patches for vaccination and drug delivery to skin, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 8 (2017) 177–200.
- [183] W. Martanto, S.P. Davis, N.R. Holiday, J. Wang, H.S. Gill, M.R. Prausnitz, Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo, *Pharm. Res.* 21 (2004) 947–952.
- [184] Y. Wu, Y. Gao, G. Qin, S. Zhang, Y. Qiu, F. Li, B. Xu, Sustained release of insulin through skin by intradermal microdelivery system, *Biomed. Microdevices* 12 (2010) 665–671.
- [185] H. Chen, H. Zhu, J. Zheng, D. Mou, J. Wan, J. Zhang, T. Shi, Y. Zhao, H. Xu, X. Yang, Iontophoresis-driven penetration of nanovesicles through microneedle-induced skin microchannels for enhancing transdermal delivery of insulin, *J. Control. Release* 139 (2009) 63–72.
- [186] B. Al-Qallaf, D.B. Das, A. Davidson, Transdermal drug delivery by coated microneedles: geometry effects on drug concentration in blood, *Asia Pac. J. Chem. Eng.* 4 (2009) 845–857.
- [187] D. Resnik, M. Možek, B. Pečar, A. Janež, V. Urbančič, C. Iliescu, D. Vrtačnik, In vivo experimental study of noninvasive insulin microinjection through hollow silicon microneedle array, *Micromachines* 9 (2018) 40.
- [188] N. Roxhed, B. Samel, L. Nordquist, P. Griss, G. Stemme, Painless drug delivery through microneedle-based transdermal patches featuring active infusion, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 55 (2008) 1063–1071.
- [189] J. Gupta, E.I. Felner, M.R. Prausnitz, Minimally invasive insulin delivery in subjects with type 1 diabetes using hollow microneedles, *Diabetes Technol. Ther.* 11 (2009) 329–337.



- [190] H.L. Quinn, E. Larrañeta, R.F. Donnelly, Dissolving microneedles: safety considerations and future perspectives, *Ther. Deliv.* 7 (2016) 283–285.
- [191] C. Martin, C.J. Allender, K.R. Brain, A. Morrissey, J.C. Birchall, Low temperature fabrication of biodegradable sugar glass microneedles for transdermal drug delivery applications, *J. Control. Release* 158 (2012) 93–101.
- [192] S. Liu, M.N. Jin, Y.S. Quan, F. Kamiyama, H. Katsumi, T. Sakane, A. Yamamoto, The development and characteristics of novel microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid, and their application in the transdermal delivery of insulin, *J. Control. Release* 161 (2012) 933–941.
- [193] M.H. Ling, M.C. Chen, Dissolving polymer microneedle patches for rapid and efficient transdermal delivery of insulin to diabetic rats, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8952–8961.
- [194] M.C. Chen, M.H. Ling, S.J. Kusuma, Poly-gamma-glutamic acid microneedles with a supporting structure design as a potential tool for transdermal delivery of insulin, *Acta Biomater.* 24 (2015) 106–116.
- [195] S. Lau, J. Fei, H. Liu, W. Chen, R. Liu, Multilayered pyramidal dissolving microneedle patches with flexible pedestals for improving effective drug delivery, *J. Control. Release* 265 (2017) 113–119.
- [196] I.C. Lee, Y.-C. Wu, S.-W. Tsai, C.-H. Chen, M.-H. Wu, Fabrication of two-layer dissolving polyvinylpyrrolidone microneedles with different molecular weights for in vivo insulin transdermal delivery, *RSC Adv.* 7 (2017) 5067–5075.
- [197] J.D. Kim, M. Kim, H. Yang, K. Lee, H. Jung, Droplet-born air blowing: Novel dissolving microneedle fabrication, *J. Control. Release* 170 (2013) 430–436.
- [198] X. Hong, L. Wei, F. Wu, Z. Wu, L. Chen, Z. Liu, W. Yuan, Dissolving and biodegradable microneedle technologies for transdermal sustained delivery of drug and vaccine, *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 945.
- [199] K.Y. Seong, M.S. Seo, D.Y. Hwang, E.D. O’Cearbhaill, S. Sreenan, J.M. Karp, S.Y. Yang, A self-adherent, bullet-shaped microneedle patch for controlled transdermal delivery of insulin, *J. Control. Release* 265 (2017) 48–56.
- [200] J. Di, S. Yao, Y. Ye, Z. Cui, J. Yu, T.K. Ghosh, Y. Zhu, Z. Gu, Stretch-triggered drug delivery from wearable elastomer films containing therapeutic depots, *ACS Nano* 9 (2015) 9407–9415.
- [201] W. Yu, G. Jiang, D. Liu, L. Li, Z. Tong, J. Yao, X. Kong, Transdermal delivery of insulin with bioceramic composite microneedles fabricated by gelatin and hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C* 73 (2017) 425–428.
- [202] J. Yu, Y. Zhang, Y. Ye, R. Disanto, W. Sun, D. Ranson, F.S. Ligler, J.B. Buse, Z. Gu, Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles provide fast glucose-responsive insulin delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 8260–8265.
- [203] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase—an overview, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 489–501.
- [204] X. Hu, J. Yu, C. Qian, Y. Lu, A.R. Kahkoska, Z. Xie, X. Jing, J.B. Buse, Z. Gu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-

responsive vesicles integrated with transcutaneous patches for glucose-mediated insulin delivery, *ACS Nano* 11 (2017) 613–620.

[205] J. Yu, C. Qian, Y. Zhang, Z. Cui, Y. Zhu, Q. Shen, F.S. Ligler, J.B. Buse, Z. Gu, Hypoxia and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dual-sensitive vesicles for enhanced glucose-responsive insulin delivery, *Nano Lett.* 17 (2017) 733–739.

[206] J. Wang, Y. Ye, J. Yu, A.R. Kahkoska, X. Zhang, C. Wang, W. Sun, R.D. Corder, Z. Chen, S.A. Khan, J.B. Buse, Z. Gu, Core-shell microneedle gel for self-regulated insulin delivery, *ACS Nano* 12 (2018) 2466–2473.

[207] Y. Zhang, J. Wang, J. Yu, D. Wen, A.R. Kahkoska, Y. Lu, X. Zhang, J.B. Buse, Z. Gu, Bioresponsive microneedles with a sheath structure for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pH cascade-triggered insulin delivery, *Small* 14 (2018) 1704181.

[208] Y. Ye, J. Yu, C. Wang, N.Y. Nguyen, G.M. Walker, J.B. Buse, Z. Gu, Microneedles integrated with pancreatic cells and synthetic glucose-signal amplifiers for smart insulin delivery, *Adv. Mater.* 28 (2016) 3115–3121.

## Traguardo.

Secondo il vocabolario , la parola traguardo viene definita come:

“ Punto d’arrivo, momento conclusivo o fase finale di opere, imprese, situazioni che si sono svolte per un lungo periodo di tempo o sono state precedute da lunga attesa “.

Bene , tutto molto bello , davvero.

Tuttavia , credo che la definizione appena citata sia schifosamente sommaria , impersonale, che non tenga minimamente conto di tutte le sensazioni che si provano durante il raggiungimento di un obiettivo, di un traguardo appunto.

È per questo motivo che ho deciso di condividere in queste righe , cosa ha significato per me, raggiungere un traguardo, questo traguardo.

Per me ha significato ritrovarsi davanti ad una bellissima e imponente montagna russa.

Esatto, una montagna russa come quelle che guardi esterrefatto da piccolo e sulla quale vuoi impazientemente salire. Cazzo che figata.

Quindi sali sulla montagna russa, prendi il tuo posto e subito davanti a te si delinea il percorso che dovrai affrontare.

Quella grossa struttura , la stessa che poco prima guardavi con incontenibile entusiasmo, sembra apparire sempre più spaventosa da quel maledetto seggiolino.

Ti continui a ripetere se sia stata una buona idea salire, ma nel mentre che lo fai , la giostra parte.

Sei spaventato, pensi di non poter essere all’altezza , di non poter resistere per quei 5 lunghissimi minuti di percorso.

Per tua fortuna però, questa montagna russa non è monoposto, ha parecchi seggiolini proprio a fianco al tuo.

Quei seggiolini, che sono occupati da persone a te care , che non ti lasciano mai solo , e che nei momenti di paura e sconforto, con un paio di sguardi e qualche parolina, come direbbe Checco Zalone , quella paura te la “scancellano”.

Allora ti appresti a salire la prima rampa ripidissima , cazzo quanto è ripida.

Sembra ci vogliano 3 mesi per arrivare in cima , un pò come il tempo che mi ci è voluto per studiare biologia, il mio primo esame, la mia prima rampa.

Quando raggiungi finalmente la cima , nel punto più alto, capisci che forse forse tutta questa attesa, tutta questa paura , possono essere ampiamente ripagate dall'incredibile senso di felicità e di liberazione che provi al momento della discesa.

E così lo è stato sempre , salita dopo salita, discesa dopo discesa, esame dopo esame.

Un turbinio continuo d'emozioni e sensazioni che possono sembrare in contrasto tra loro , ma che nella realtà dei fatti , riescono a trovare il modo di mescolarsi tra loro in modo disarmante, lasciandoti lì , in balia di tornanti e curve a cui puoi solo concederti , aspettando che ti guidino sempre più in là, sempre più vicino , alla fine di questo percorso.

Ora scendo dalla giostra , cinque sei minuti più vecchio.

Corro al bar e mi appresto ad ordinare la mia tennent's.

Guardo i miei compagni di viaggio senza i quali probabilmente starei ancora allacciando le cinture di sicurezza .

Mi sorridono.

Gli sorrido.

Ce l'abbiamo fatta.

24 marzo 2022

