

2025

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

***Evaluarea unor potențiatori de permeabilitate selectați
pentru facilitarea absorbției intestinale a calcitoninei de
somon și pramlintidei***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. ȘARAMET GABRIEL**

**Student-doctorand:
HAMZA ANDREI**

Cuprins

Lista cu lucrările științifice publicate.....	pagina 3
Lista cu abrevieri și simboluri.....	pagina 4
Introducere.....	pagina 6
I. Partea generală.....	pagina 13
1. Stadiul actual al cunoașterii: demersurile de cercetare realizate cu scopul dezvoltării formelor farmaceutice orale ale peptidelor active.....	pagina 13
1.1. Bariere generate de anatomia și fiziologia sistemului digestiv.....	pagina 14
1.2. Caracteristicile peptidelor active.....	pagina 14
1.3. Calcitonina.....	pagina 16
1.3.1. Calcitonina de somon în co-formulare cu acidul citric.....	pagina 18
1.3.2. Calcitonina de somon în co-formulare cu 5-CNAC.....	pagina 19
1.4. Semaglutida.....	pagina 20
1.5. Concluzii.....	pagina 28
II. Contribuții personale.....	pagina 29
2. Contribuții privind selecția preliminară a potențiatorilor de permeabilitate.....	pagina 29
2.1. Introducere.....	pagina 29
2.2. Metodologia cercetării.....	pagina 29
2.3. Criterii de includere și de excludere.....	pagina 32
2.4. Stabilirea criteriilor de selecție a potențiatorilor de permeabilitate identificați în literatura de specialitate.....	pagina 32
2.5. Rezultate.....	pagina 34
2.6. Concluzii.....	pagina 47
3. Contribuții privind evaluarea <i>in vitro</i> a celor patru potențiatori de permeabilitate selectați în cadrul etapei anterioare, din perspectiva eficacității și siguranței efectului de creștere a transportului calcitoninei de somon pe liniile celulare Caco-2.....	pagina 49
3.1. Introducere.....	pagina 49
3.2. Materiale.....	pagina 51
3.3. Metodologia cercetării.....	pagina 51

3.3.1. Etapele studiului.....	pagina 51
3.3.2. Determinarea parametrului de măsurare a eficacității.....	pagina 54
3.3.3. Evaluarea siguranței potențiatorilor de permeabilitate.....	pagina 55
3.3.4. Analiza statistică.....	pagina 58
3.4. Rezultate.....	pagina 58
3.4.1. Rezultate de eficacitate.....	pagina 58
3.4.2. Rezultate de siguranță.....	pagina 59
3.4.3. Rezultate de eficacitate și siguranță analizate în agregat.....	pagina 61
3.5. Discuții.....	pagina 69
3.6. Concluzii.....	pagina 72
4. Contribuții privind evaluarea <i>in vitro</i> a eficacității și siguranței tetradecil-maltozidei și dimetil-palmitoil-amoniu-propansulfonatului asupra creșterii transportului calcitoninei de somon și a pramlintidei pe liniile celulare Caco-2 și realizarea unui model matematic de extrapolare a rezultatelor la om.....	pagina 74
4.1. Introducere.....	pagina 74
4.2. Materiale.....	pagina 77
4.3. Metodologia cercetării.....	pagina 77
4.3.1. Etapele studiului.....	pagina 77
4.3.2. Determinarea parametrului de măsurare a eficacității.....	pagina 79
4.3.3. Determinarea cantităților de peptide active recuperate.....	pagina 80
4.3.4. Evaluarea siguranței potențiatorilor de permeabilitate.....	pagina 80
4.3.5. Analiza statistică.....	pagina 84
4.4. Rezultate.....	pagina 84
4.4.1. Rezultate de eficacitate.....	pagina 84
4.4.2. Rezultate de siguranță.....	pagina 91
4.4.3. Extrapolarea rezultatelor la om.....	pagina 93
4.5. Discuții.....	pagina 98
4.6. Concluzii.....	pagina 101
5. Concluzii generale.....	pagina 102
Bibliografie.....	pagina 106

Introducere

În ultima jumătate de secol, peptidele și proteinele active au câștigat o popularitate semnificativă din perspectiva utilizării ca agenți farmacologici [1]. Odată cu progresele realizate în bioinginerie, un număr tot mai mare de peptide și proteine terapeutice au fost dezvoltate pentru tratamentul bolilor cronice [2]. Această tendință este confirmată de cele mai recente analize privind dezvoltarea, aprobarea și utilizarea în practica clinică a macromoleculelor active. Într-adevăr, conform celor mai recente cercetări realizate de Nova One Advisor, piața globală a medicamentelor biologice a fost estimată la 511 miliarde de dolari în 2023 și se preconizează că va atinge aproximativ 1,37 de trilioane de dolari până în 2033, înregistrând o rată anuală compusă de creștere de 10,4% în perioada 2024–2033[3]. În plus, având origini biologice, peptidele și proteinele terapeutice prezintă o toxicitate mai redusă față de moleculele de sinteză, în special când sunt administrate o perioadă îndelungată și în doze adecvate [4]. Principalul dezavantaj al acestor agenți farmacologici este reprezentat de necesitatea administrării pe cale parenterală, adesea percepută de pacienți ca un atribut negativ, în special atunci când tratamentul este administrat cronic (precum în cazul diabetului zaharat de tip 2) [6]. Deși eficacitatea și siguranța medicamentelor biologice sunt evaluate în cadrul programelor ample de cercetare și dezvoltare, adesea, rezultatele studiilor clinice nu sunt observate și în condițiile din practica clinică [7]. Principalul factor care determină reproductibilitatea redusă a rezultatelor studiilor clinice este aderența scăzută a pacienților la tratament [7]. Numeroși factori contribuie la scăderea aderenței pacienților la tratament, însă unul dintre cei mai importanți factori este nivelul ridicat de complexitate al tratamentelor cronice [7]. Prin urmare, este necesară dezvoltarea unor tehnologii care simplifică administrarea medicamentelor, cum ar fi formulările cu eliberare prelungită, formele farmaceutice orale și combinațiile în doză fixă, care prezintă în co-formulare două sau mai multe substanțe active. Pacienții cu afecțiuni cronice preferă tratamentele administrate pe cale orală și tind să renunțe la terapiile injectabile în favoarea formelor farmaceutice orale, chiar și în situațiile în care opțiunile orale prezintă o eficacitate terapeutică inferioară [6]. Însă preferința pacienților față de formele farmaceutice orale reprezintă o provocare majoră din perspectiva administrării tratamentelor pe termen lung, deoarece peptidele macromoleculare au o biodisponibilitate foarte scăzută atunci când sunt administrate pe cale orală. În prezent se depun eforturi considerabile pentru cercetarea și

dezvoltarea tehnologiilor care să permită administrarea acestor molecule pe cale orală, nazală și chiar transdermică.

Potențiatorii de permeabilitate (PP) sau potențiatorii de absorbție reprezintă o clasă eterogenă de excipienți care, pe lângă rolul lor principal în formulări, permit macromoleculelor să penetreze membrana gastrică prin modificarea temporară a barierei epiteliale intestinale [8]. Prin alterarea temporară a barierei gastrice, potențiatorii de permeabilitate pot facilita transportul macromoleculelor pe calea paracelulară sau transcelulară [8]. Deoarece acești potențiatori acționează printr-o varietate de mecanisme, numeroase proiecte de cercetare au investigat efectele lor [9].

Calcitonina și amilina sunt hormoni cu structuri peptidice similare și care acționează pe același grup de receptori [10]. Calcitonina de somon (sCT) este o peptidă cu masa moleculară de 3432 Da, formată din 32 de aminoacizi [11] și este utilizată atât în tratamentul osteoporozei postmenopauzale, hipercalcemiei și bolii Paget, cât și pentru ameliorarea durerilor osoase datorită efectului său analgezic [12]. În practica clinică se preferă utilizarea calcitoninei de somon în locul calcitoninei umane, datorită afinității mai ridicate față de receptorii de calcitonină și a potenței de aproximativ 100 de ori mai mari [12]. Principalul impediment al calcitoninei de somon este reprezentat de administrarea parenterală ceea ce poate cauza pacienților un grad ridicat de disconfort sau chiar durere [11], efecte care pot contribui la scăderea aderenței și complianței la tratament. Având în vedere relevanța clinică și caracteristicile moleculare ale calcitoninei de somon, au fost realizate eforturi considerabile cu scopul de a dezvolta o formă de calcitonină de somon cu administrare orală, prin co-formulare cu potențiatori de permeabilitate, deși doar două dintre aceste proiecte au avansat până etapele finale de cercetare clinică (studiile clinice de fază 3) [11]. Amilina, de asemenea un hormon cu structura peptidică (însă constituită din 37 de aminoacizi), este secretată alături de insulină și are un rol foarte important în controlul glicemiei postprandiale [13]. Pramlintida (Pram), un analog sintetic al amilinei, are o greutate moleculară de aproximativ 3949,9 Da și modificări structurale menite să reducă tendința de agregare a moleculelor [13]. Are efecte similare cu cele ale amilinei și a fost aprobată în anul 2005 pentru tratamentul diabetului zaharat de tip 1 și 2 sub denumirea comercială de Symlin® [13]. De asemenea, pramlintida se administrează injectabil, fapt care poate limita acceptabilitatea tratamentului pe termen lung, având în vedere preferința pacienților pentru formele farmaceutice orale [14].

Considerând numeroasele similitudini structurale dintre calcitonina de somon și pramlintidă și având în vedere multitudinea proiectelor de cercetare dedicate dezvoltării unei forme orale de calcitonină de somon, obiectivul principal al acestui proiect de cercetare este acela de a evalua direct, *in vitro*, utilizând liniile celulare de cancer colorectal 2 (Caco-2), potențiatorii de permeabilitate cu efectul cel mai pronunțat de creștere a transportul calcitoninei de somon și de a investiga efectele acestora și asupra pramlintidei.

Proiectul de cercetare prezentat în cadrul acestei teze de doctorat a fost structurat în 4 etape:

Capitolul I. Partea generală

1. Stabilirea stadiului actual al cunoașterii privind demersurile de cercetare întreprinse cu scopul dezvoltării formelor farmaceutice orale ale peptidelor active: calcitonina de somon și semaglutida [11]

Acest capitol detaliază principalele motive pentru care peptidele macromoleculare prezintă o biodisponibilitate foarte redusă atunci când sunt administrate pe cale orală, motive care derivă din existența barierelor anatomice și fiziologice specifice sistemului digestiv, precum și din caracteristicile moleculare ale peptidelor terapeutice. De asemenea, acest capitol realizează o sinteză a cercetărilor din domeniul tehnologiei farmaceutice și dezvoltării clinice, prezentând atât un exemplu de succes (semaglutida orală) cât și eforturile realizate cu scopul dezvoltării unei forme orale a calcitoninei de somon. O parte importantă a informațiilor prezentate în cadrul acestui capitol a fost publicată în articolul cu titlul “*Advances In The Development Of Oral Formulations For Calcitonin And Semaglutide*” [11].

În cazul calcitoninei de somon, sunt detaliați factorii care au contribuit la rezultatele nesatisfăcătoare obținute în trialurile de faza 3 care au investigat cele două forme orale ale calcitoninei, dezvoltate până în prezent (TBRIA® și SMC 021) și anume:

- Absorbția gastrică insuficientă, care induce o biodisponibilitate scăzută prin administrarea orală a calcitoninei de somon.
- Distribuția receptorilor de calcitonină în alte țesuturi, ceea ce limitează concentrația disponibilă la nivelul țesutului osos.

- Tendința moleculelor de calcitonină de a se agrega și fibriliza, pierzând astfel din potență.

În cazul semaglutidei orale, sunt detaliați factorii care au contribuit la succesul acestei forme farmaceutice, și anume:

- Utilizarea unei tehnologii inovatoare de co-formulare cu un potentiator de permeabilitate care permite o absorbție eficientă la nivelul mucoasei gastrice, îmbunătățind astfel semnificativ biodisponibilitatea moleculei.
- Stabilitatea moleculară crescută, care previne agregarea și degradarea semaglutidei în mediul gastrointestinal.
- Selectivitatea ridicată și afinitatea crescută pentru receptorii GLP-1, asigurând astfel o concentrație optimă și un efect terapeutic consistent.
- Multitudinea dovezilor clinice privind eficacitatea și siguranța semaglutidei orale privind obținerea și menținerea controlului glicemic, siguranța cardiovasculară și scăderea ponderală.

Având în vedere disponibilitatea semaglutidei atât în forma farmaceutică orală, cât și injectabilă, în încheierea acestui capitol sunt prezentate rezultatele unei analize avansate și sistematice, efectuate în baza de date PubMed, cu scopul identificării studiilor care au evaluat impactul formei orale de semaglutidă asupra aderenței și persistenței la tratament a pacienților cu diabet zaharat tip 2. Rezultatele căutării sistematice au arătat că administrarea semaglutidei injectabile este asociată cu o incidență cumulativă a întreruperii tratamentului semnificativ mai mare *versus* semaglutida orală. Utilizând tratamentul cu semaglutidă orală ca referință, riscul relativ al întreruperii tratamentului cu semaglutida injectabilă a fost cu 45% mai mare [15]. Având în vedere importanța aderenței pacienților la tratament, aceste date subliniază relevanța subiectului abordat în cadrul tezei de doctorat și justifică eforturile curente de cercetare, orientate pentru dezvoltarea formelor orale ale peptidelor terapeutice destinate tratamentului bolilor cronice.

Capitolul II. Contribuții personale

2. Contribuții privind selectarea preliminară a potențiatorilor de permeabilitate

În cadrul acestui capitol sunt prezentate și analizate rezultatele studiilor identificate printr-un proces de căutare sistematică, cu scopul evaluării potențiatorilor de permeabilitate în vederea selectării acestora pentru următoarele etape de cercetare. Pentru stabilirea stadiului actual al cunoașterii privind utilizarea potențiatorilor de permeabilitate pentru creșterea absorbției gastrice a calcitoninei de somon, am realizat o căutare sistematică în baza de date MEDLINE, utilizând interfața PubMed. În cadrul analizei, au fost incluse atât studii *in vitro*, cât și studii *in vivo*, care au investigat eficacitatea și siguranța potențiatorilor de permeabilitate privind creșterea fracției de calcitonină de somon absorbite la nivelul diferitelor zone ale membranelor intestinale, în contextul unor co-formulări specifice. Studiile identificate în urma procesului de căutare sistematică au fost supuse unei analize critice, având ca obiectiv principal extragerea și sintetizarea datelor relevante privind eficacitatea și profilul de siguranță al potențiatorilor de permeabilitate investigați.

Procesul de selecție a ținut cont atât de evidențele științifice privind eficacitatea și siguranța potențiatorilor de permeabilitate, precum și de fezabilitatea acestora în contextul cercetării planificate. Contribuțiile personale au constat în stabilirea și aplicarea criteriilor de selecție a potențiatorilor de permeabilitate identificați în literatura de specialitate și se regăsesc în cadrul tezei de doctorat la paginile 32- 34, respectiv la paginile 42 – 46. Fezabilitatea a fost evaluată în funcție de costurile implicate, disponibilitatea resurselor materiale, complexitatea procesului de preparare și accesibilitatea echipamentului necesar. Astfel, au fost stabilite trei categorii:

- Fezabilitate ridicată: costuri reduse, metode de preparare simple și echipamente disponibile, context favorabil continuării și extinderii cercetării.
- Fezabilitate moderată: costuri mai ridicate, dar procesele și echipamentele rămân accesibile, necesitând ajustări bugetare și prioritizare.
- Fezabilitate redusă: constrângeri semnificative precum costuri prohibitive, complexitate tehnică ridicată și lipsa echipamentelor specifice, limitând potențialul de realizare al cercetării.

Scopul evaluării a fost identificarea și anticiparea obstacolelor tehnice și logistice care ar putea influența implementarea practică a metodologiei propuse, asigurând echilibrul între rigoarea științifică și sustenabilitatea practică a experimentelor ulterioare.

În urma acestui proces au fost selectați patru potențiatori de permeabilitate în vederea includerii în etapele ulterioare de cercetare:

- S-nitrozo-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP), donor de oxid nitric
- Taurodeoxicolatul de sodiu (TDC), sare biliară
- Dimetil-palmitoil-amonio-propansulfonatul (PPS), surfactant zwitterionic
- Tetradecil-maltozida (TDM), surfactant neionic

3. Contribuții privind evaluarea *in vitro* a celor patru potențiatori de permeabilitate selectați în cadrul etapei anterioare, din perspectiva eficacității și siguranței efectului de creștere a transportului calcitoninei de somon pe liniile celulare Caco-2 [16]

Această secțiune a tezei descrie contribuțiile personale, concretizate prin realizarea primului studiu care a investigat în mod direct efectele SNAP, TDC, PPS și TDM (selectați în etapa anterioară) asupra permeabilității calcitoninei de somon la nivelul liniilor celulare Caco-2. Acest demers de cercetare a permis ierarhizarea potențiatorilor de permeabilitate, în funcție de efectul lor asupra valorilor coeficientului de permeabilitate aparentă a calcitoninei de somon la două ore după expunere (Papp; parametrul de eficacitate) și asupra rezistenței electrice transepiteliale a liniilor celulare (parametrul de siguranță). Studiul este descris în amănunt în teza de doctorat (de la pagina 49, la pagina 73), iar rezultatele au fost publicate în revista Farmacia [16].

Analiza datelor furnizate de acest studiu a arătat că TDM (0,2 mg/mL) a fost singurul potențiator de permeabilitate care a avut un efect semnificativ statistic de creștere a coeficientului de permeabilitate aparentă a sCT *versus* control, *versus* SNAP (0,002 mg/mL) și *versus* TDC (0,1 mg/mL). Mai exact, TDM (0,2 mg/mL) a crescut valoarea Papp a sCT cu 282% *versus* control ($p = 0,017$), cu 240% față de SNAP (0,002 mg/mL) ($p = 0,01$) și cu 149% față de TDC (0,1 mg/mL) ($p = 0,036$).

Nu au existat alte diferențe semnificative statistic între potențiatorii de permeabilitate în ceea ce privește efectul asupra valorii Papp a sCT. Cu toate acestea, am observat valori numerice mai mari ale Papp sCT, obținute în cazul soluțiilor în care au fost incluși potențiatorii de permeabilitate *versus* control, fapt care indică o tendință de creștere a permeabilității sCT asociată efectelor induse de toți potențiatorii de permeabilitate investigați, așa cum se poate observa în figura 3.1.

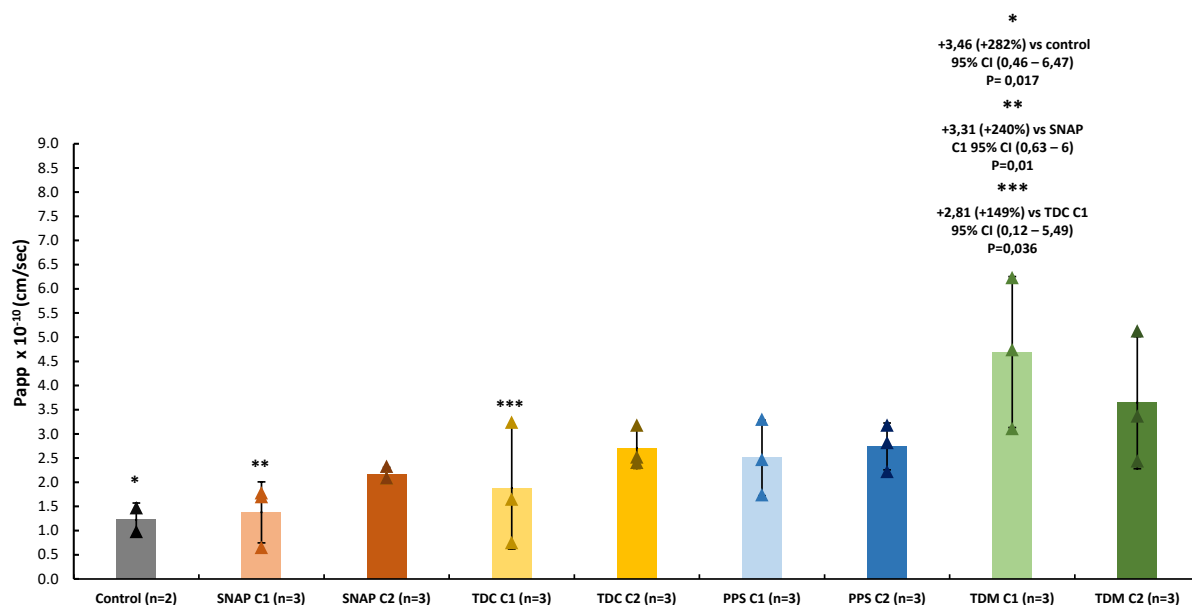


Figura 3.1. Efectele SNAP (C1 = 0,002 mg/mL; C2 = 0,22 mg/mL), TDC (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,25 mg/mL), PPS (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,2 mg/mL) și TDM (C1 = 0,2 mg/mL; C2 = 1 mg/mL) asupra permeabilității sCT la nivelul liniilor celulare Caco-2.

Rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard) din trei sau două determinări. Fiecare triunghi reprezintă o determinare individuală. (*) $P < 0,05$ *versus* control; (**) $P < 0,05$ pentru TDM C1 *versus* SNAP C1; (***) $P < 0,05$ pentru TDM C1 *versus* TDC C1.

Făță de soluțiile control, toți potențiatorii de permeabilitate investigați au avut un efect semnificativ statistic asupra valorilor RET ale liniilor celulare Caco-2, măsurate la două ore după expunere. Nu au fost observate diferențe semnificative între potențiatorii de permeabilitate, din perspectiva efectelor acestora asupra RET, măsurată la doua ore după

expunere. Efectul tuturor potențiatorilor de permeabilitate a fost dependent de concentrația acestora. Concentrațiile mai mari ale fiecărui potențiator au determinat scăderi numeric mai mari ale valorilor RET. La 15 minute, 60 de minute și 120 de minute după expunere, TDM mg/mL) a avut cel mai pronunțat efect de reducere a RET, în timp ce SNAP (0,002 mg/mL) a avut cel mai slab efect (figura 3.2.).

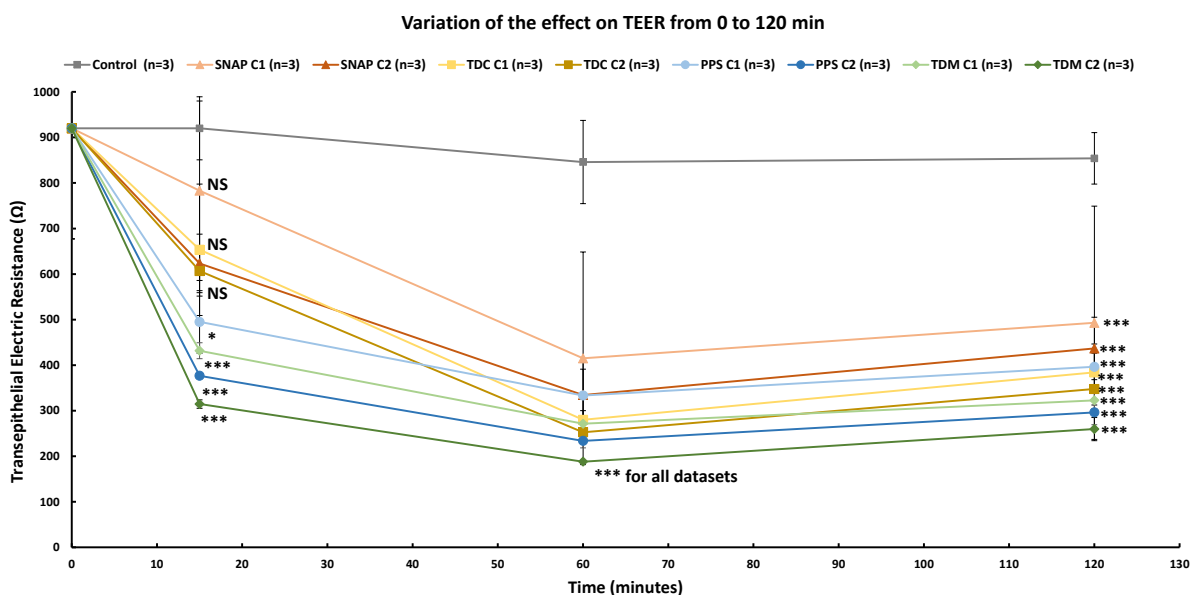


Figura 3.2. Efectele SNAP (C1 = 0,002 mg/mL; C2 = 0,22 mg/mL), TDC (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,25 mg/mL), PPS (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,2 mg/mL), TDM (C1 = 0,2 mg/mL; C2 = 1 mg/mL) asupra rezistenței electrice transepiteliale a liniilor celulare Caco-2, determinate la 15 minute, 60 de minute și 120 de minute după expunere.

Rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard) din trei sau două determinări. (NS): $p > 0,05$ *versus* control; (*): $p < 0,05$ *versus* control; (***): $p < 0,0001$ *versus* control.

Prin corelarea acestor două seturi de date (Papp și RET), studiul oferă o înțelegere aprofundată asupra raportului dintre eficacitatea și siguranța potențiatorilor de absorbție analizați, contribuind astfel la fundamentarea criteriilor de selecție a acestora, pentru dezvoltarea viitoarelor formulări farmaceutice orale. Studiul a arătat că tetradecil-matozida prezintă o eficacitate semnificativ mai mare de creștere a transportului calcitoninei de somon

față de S-nitrozo-N-acetil-DL-penicilamină și taurodeoxicolatul de sodiu și o eficacitate similară cu dimetil-palmitoil-amonio-propansulfonatul. Impactul asupra valorilor rezistenței electrice transepiteliale a fost observat pentru toți potențiatorii de permeabilitate evaluați, în concordanță cu efectul de clasă cunoscut al acestor excipienți activi. Pe baza rezultatelor acestui studiu de screening, tetradecil-matozida și dimetil-palmitoil-amonio-propansulfonatul au fost selectați pentru a fi investigați ulterior. Așa cum este prezentat în figura 3.3., TDM C1 a avut cel mai mare efect asupra creșterii valorii Papp a sCT, urmat de TDM C2, PPS C2, TDC C2, PPS C1, SNAP C2, TDC C1 și SNAP C1.

Un aspect important care necesită investigații suplimentare este determinarea intervalului de timp necesar pentru revenirea valorilor rezistenței electrice transepiteliale la nivelul de referință, după expunerea la fiecare potențiator de permeabilitate, deoarece acest aspect este esențial pentru evaluarea toxicității.

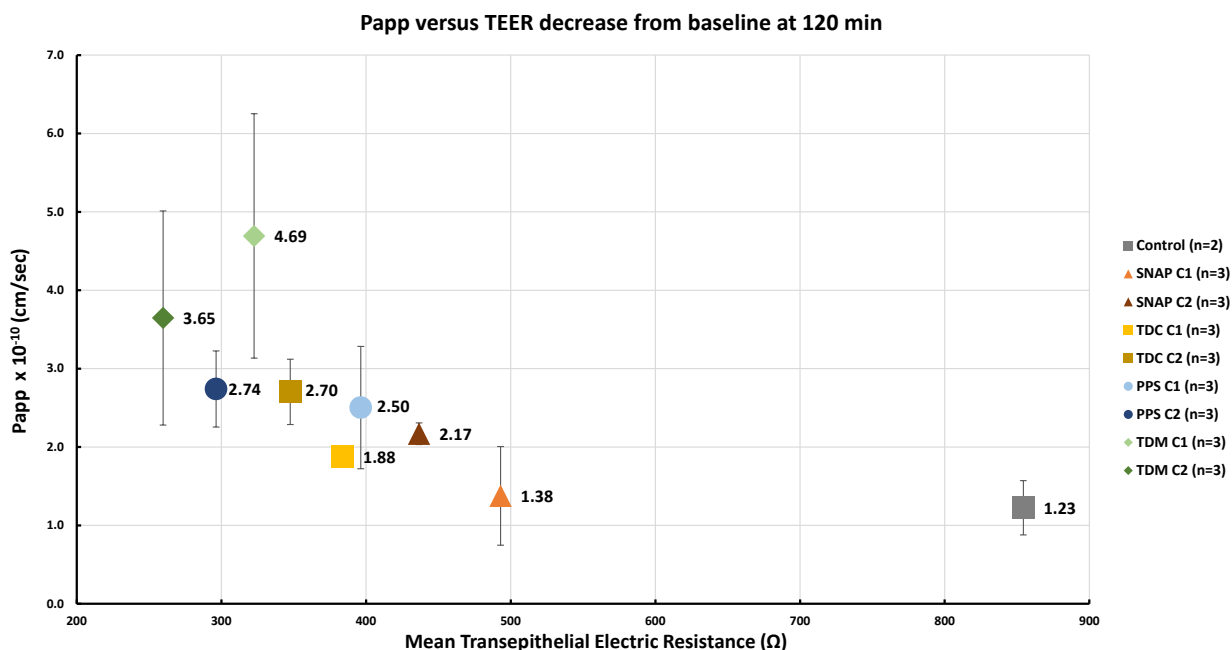


Figura 3.3. Efectele SNAP (C1 = 0,002 mg/mL; C2 = 0,22 mg/mL), TDC (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,25 mg/mL), PPS (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,2 mg/mL), TDM (C1 = 0,2 mg/mL; C2 = 1 mg/mL) asupra permeabilității sCT la nivelul liniilor celulare Caco-2 (axa verticală) și asupra valorilor RET la 120 de minute (axa orizontală).

Valorile Papp au fost exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard), obținute din trei sau două determinări, în timp ce pentru RET au fost raportate doar mediile aritmetice.

Pe baza rezultatelor acestui studiu de screening, tetradecil-matozida și dimetil-palmitoil-amonio-propansulfonatul au fost selectați pentru a fi investigați ulterior.

4. Contribuții privind evaluarea *in vitro* a eficacității și siguranței tetradecil-maltozidei și dimetil-palmitoil-amoniu-propansulfonatului asupra creșterii transportului calcitoninei de somon și a pramlintidei pe liniile celulare Caco-2 și realizarea unui model matematic de extrapolare a rezultatelor la om. [17]

Contribuțiile personale decripte în cadrul acestui capitol au constat în realizarea studiului care a evaluat efectele tetradecil-maltozidei și dimetil-palmitoil-amoniu-propansulfonatului asupra calcitoninei de somon și pramlintidei, utilizând metode analitice cu un grad ridicat de precizie (cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă în tandem) și condiții de incubație diferite față de cele utilizate în primul studiu. Studiul este descris în amănunt în cadrul tezei de doctorat (de la pagina 74, la pagina 102), iar rezultatele acestuia au fost publicate în revista Farmacia [17].

Având în vedere similaritățile structurale dintre Pram (37 de aminoacizi, 3949,9 Da) [13] și sCT (32 de aminoacizi, 3432 Da) [11], acest studiu a comparat eficacitatea și siguranța TDM și PPS (în două concentrații diferite, selectate pe baza rezultatelor obținute în cadrul studiului anterior: 0,2 mg/mL (C1) și 1 mg/mL (C2) pentru TDM, 0,1 mg/mL (C1) și 0,2 mg/mL (C2) pentru PPS) [16] privind creșterea permeabilității sCT în raport cu Pram, *in vitro*, folosind linii celulare Caco-2. Eficacitatea a fost evaluată prin măsurarea coeficientului de permeabilitate aparentă (Papp), iar siguranța a fost evaluată prin măsurarea efectului celor doi potențiatori asupra rezistenței electrice transepiteliale (RET) a liniilor celulare. În plus, folosind date și metodologii publicate [18-20], am dezvoltat un model matematic pentru estimarea modului în care valorile Papp observate *in vitro* s-ar putea extinde și la om.

După 120 de minute de la expunerea liniilor celulare la TDM și PPS (ambele concentrații) au fost observate creșteri semnificative ale valorilor Papp pentru sCT, fapt care indică existența unui efect substanțial de creștere a permeabilității. În contrast, doar TDM C1, PPS C1 și PPS C2 au determinat creșterea valorilor Papp pentru Pram *versus* control, în timp ce TDM C2 a

avut un efect nesemnificativ asupra Papp pentru Pram. De remarcat, valorile Papp pentru soluțiile control (sCT și Pram fără potențiatori de permeabilitate) nu au putut fi cuantificate, acestea fiind sub limita de detecție a metodei analitice utilizate. Atât TDM cât și PPS au demonstrat o creștere semnificativă a permeabilității sCT comparativ cu Pram, evidențiată prin valorile mai mari ale Papp pentru sCT în prezența ambilor potențiatori ($p < 0,0001$ pentru toate comparațiile), conform figurii 4.1.

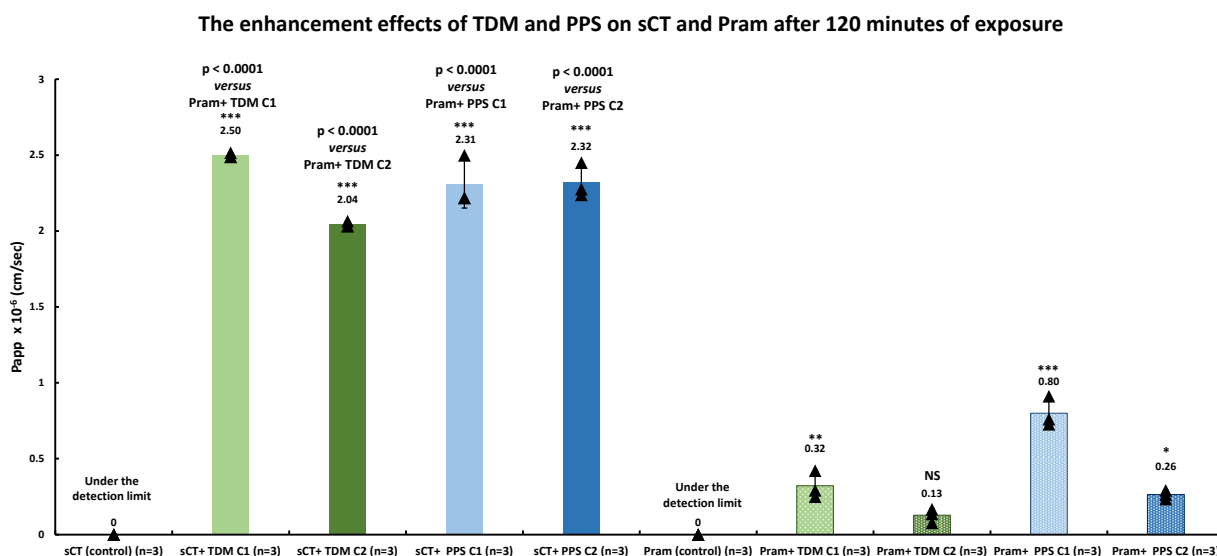


Figura 4.1. Efectele TDM (C1= 0,2 mg/mL; C2= 1 mg/mL) și PPS (C1= 0,1 mg/mL; C2= 0,2 mg/mL) asupra permeabilității sCT și Pram la nivelul liniilor celulare Caco-2.

Rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard) din trei determinări. Fiecare triunghi reprezintă o măsurătoare individuală. (NS): $p > 0,05$ versus control; (*): $p < 0,05$ versus control; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,0001$ versus control.

Comparativ cu valorile obținute pentru soluțiile control, TDM și PPS la toate concentrațiile testate au indus o scădere semnificativă statistic a valorilor RET, la 120 de minute după expunere (figura 4.2. A pentru sCT și figura 4.3. A pentru Pram), fără a fi observate diferențe semnificative între potențiatorii de permeabilitate studiați. Această observație este în concordanță cu efectele cunoscute ale acestor potențiatori de permeabilitate asupra RET, ca parte a mecanismului lor de acțiune (creșterea valorilor Papp este asociată cu scăderea valorilor

RET). Așa cum este ilustrat în figura 4.2. B pentru sCT și figura 4.3. B pentru Pram, valorile RET au rămas scăzute la 6 ore după expunere, observație care sugerează faptul că efectul nu a fost reversibil în acest interval de timp.

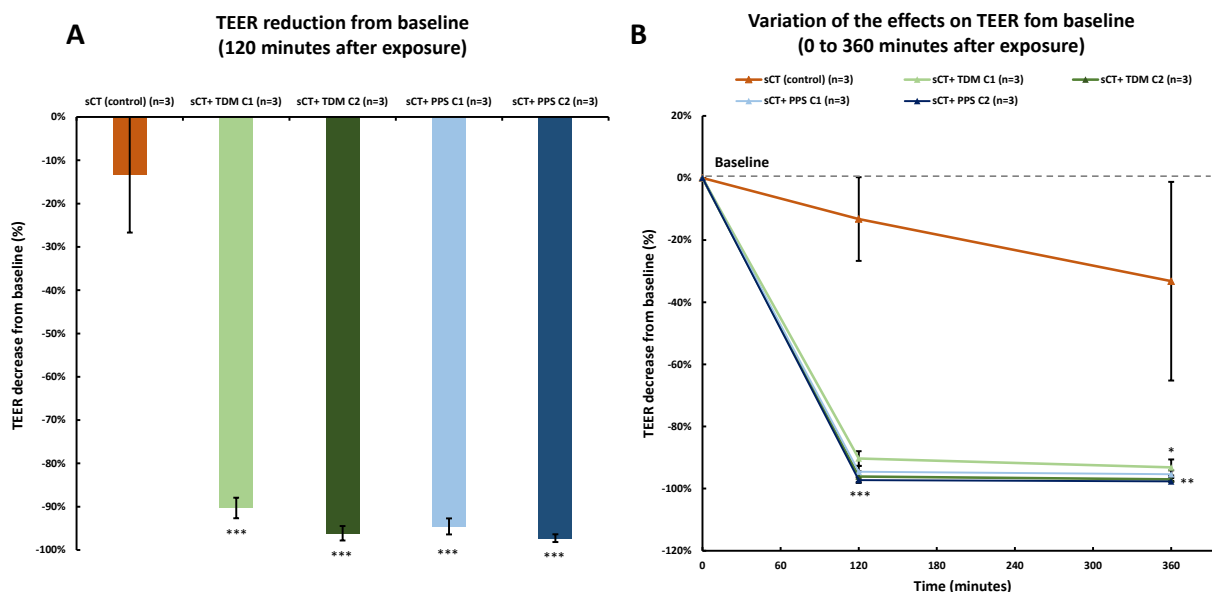


Figura 4.2. Efectele sCT în combinație cu TDM (C1 = 0,2 mg/mL; C2 = 1 mg/mL) și PPS (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,2 mg/mL) asupra valorilor RET la 120 de minute după expunere (A) și variația efectelor asupra RET de la momentul inițial până la 360 de minute după expunere (B).

(A) Rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard) din trei determinări. (***) : $p < 0,0001$ *versus* control.

(B) Rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard) din trei determinări. (***) : $p < 0,0001$ *versus* control.

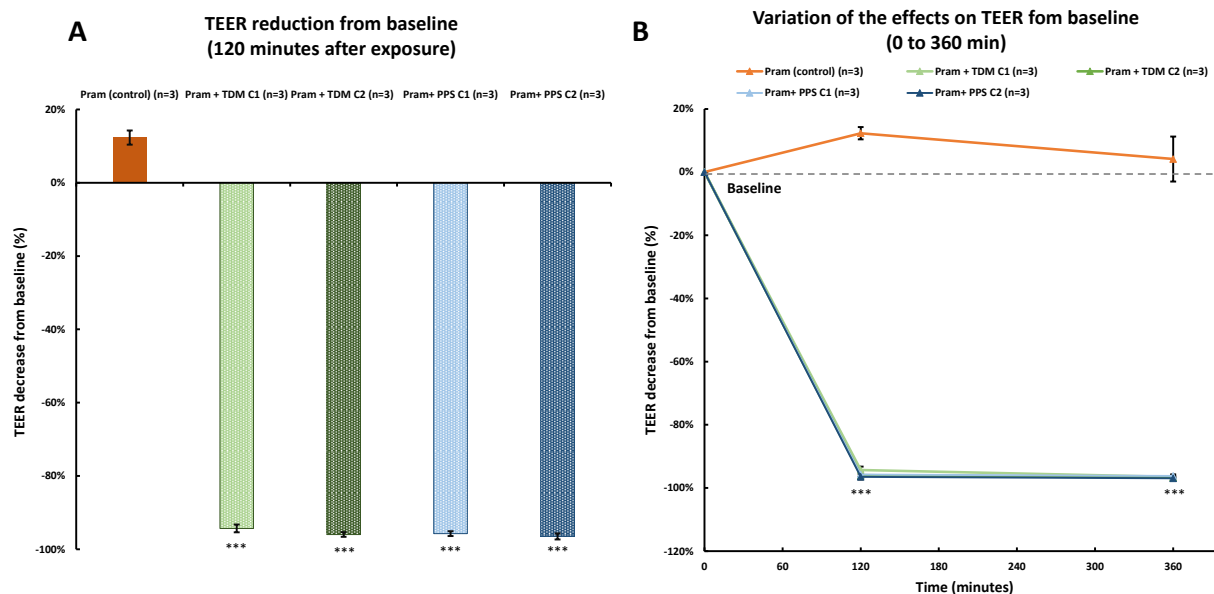


Figura 4.3. Efectele Pram în combinație cu TDM (C1 = 0,2 mg/mL; C2 = 1 mg/mL) și PPS (C1 = 0,1 mg/mL; C2 = 0,2 mg/mL) asupra valorilor RET la 120 de minute după expunere (A) și variația efectelor asupra RET de la momentul inițial până la 360 de minute după expunere (B).

(A) Rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard) din trei determinări. (***) $p < 0,0001$ *versus* control.

(B) Rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică ($\pm$ deviația standard) din trei determinări. (***) $p < 0,0001$ *versus* control.

Studiul a arătat că dimetil-palmitoil-amoniu-propansulfonatul este un potențiator de permeabilitate optim pentru ambele peptide active și a întărit concluzia primului studiu, demonstrând că tetradecil-matozida prezintă o eficacitate ridicată de creștere a permeabilității liniiei celulare pentru calcitonina de somon. Pe baza modelului predictiv al absorbției la om, s-a observat că TDM și PPS influențează semnificativ absorbția jejunală a sCT, cu rate de absorbție care depășesc 70%. Pentru Pram, absorbția jejunală estimată variază de la 52% cu TDM C2, până la 68% cu PPS C1 (figura 4.4).

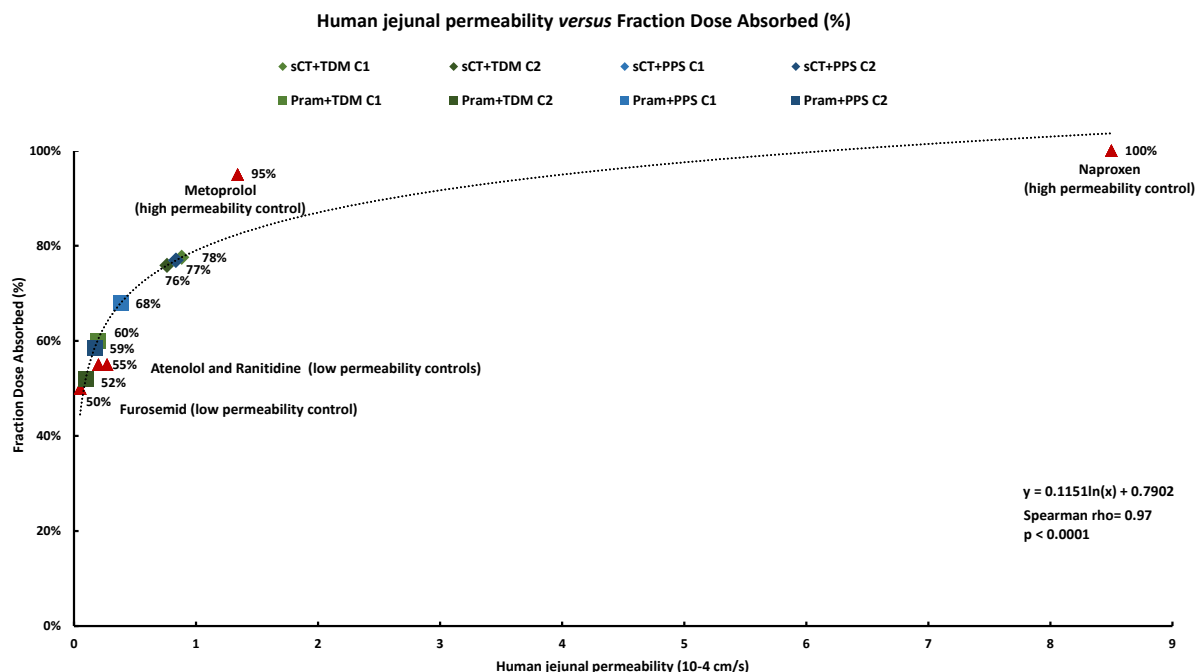


Figura 4.4. Relația dintre valorile hPeff și fracțiile corespunzătoare ale dozei absorbite raportate în literatură [88].

Pentru moleculele testate, rezultatele sunt exprimate ca media aritmetică din trei determinări.

Acest studiu *in vitro* a demonstrat că TDM și PPS îmbunătățesc semnificativ permeabilitatea sCT și Pram la nivelul liniilor celulare Caco-2. Deși între sCT și Pram există anumite asemănări structurale și funcționale, potențiatorii de permeabilitate investigați au arătat efecte distincte asupra fiecărei peptide în parte. Rezultatele studiului indică faptul că PPS este potențiatorul de permeabilitate cel mai adecvat pentru utilizarea în co-formulare cu ambele peptide investigate, în timp ce TDM este în mod deosebit eficace pentru creșterea permeabilității sCT.

5. Concluzii generale

Obiectivul principal al proiectului de cercetare a constat în identificarea potențiatorilor de permeabilitate cu efectul cel mai pronunțat de creștere a transportului calcitoninei de somon și realizarea unei comparații directe a efectelor acestora (*in vitro*, utilizând liniile celulare Caco-2), atât asupra calcitoninei de somon, cât și asupra pramlintidei. Într-o primă etapă, potențiatorii de permeabilitate (SNAP, TDC, TDM și PPS) au fost selectați pe baza datelor de eficacitate și

siguranță raportate în literatura de specialitate și în funcție de fezabilitatea acestora în contextul cercetării planificate. Apoi au fost evaluați într-un studiu *in vitro* de screening, în vederea ierarhizării acestora din perspectiva eficacității și siguranței efectului de creștere a transportului calcitoninei de somon din compartimentul apical, în compartimentul bazolateral al liniilor celulare Caco-2. Acesta reprezintă primul studiu care evaluează direct efectele SNAP, TDC, PPS și TDM asupra permeabilității sCT. Pe baza datelor furnizate de acest studiu, au fost selectați doar TDM și PPS pentru următoarea etapă a cercetării, pentru a investiga efectele acestora, atât asupra calcitoninei de somon, cât și asupra pramlintidei. Deși au existat diferențe între efectele asupra sCT și Pram, rezultatele acestui studiu arată că PPS a reușit să demonstreze o eficacitate semnificativă privind creșterea permeabilității liniilor celulare Caco-2, pentru sCT și pentru Pram, ceea ce îl recomandă drept un potențiator comun viabil. Pentru evaluarea relevanței datelor obținute, a fost elaborat și un model matematic bazat pe metode și date disponibile în literatura de specialitate, cu scopul de a estima în ce măsură valorile coeficienților de permeabilitate aparentă, determinate *in vitro*, pot fi extrapolate la om. Rezultatele modelării au indicat că TDM și PPS pot determina rate de absorbție de peste 77% pentru sCT și peste 52% pentru Pram, susținând astfel potențialul acestor potențiatori de a facilita absorbția intestinală și în condiții fiziologice umane. În ansamblu, rezultatele acestui proiect de cercetare, obținute prin utilizarea liniilor celulare Caco-2 standardizate (un model fundamental pentru înțelegerea și prezicerea absorbției intestinale a substanțelor active), reprezintă un început promițător în direcția dezvoltării unei tehnologii care să permită administrarea orală a calcitoninei de somon și a pramlintidei. De asemenea, aceste descoperiri pot oferi o bază importantă pentru studii ulterioare asupra altor derivați de calcitonină sau de amilină, aflați în dezvoltare pentru tratamentul diabetului, obezității și al altor boli metabolice. Acest proiect de cercetare reprezintă doar un demers incipient pentru dezvoltarea unei tehnologii care să permită administrarea orală a peptidelor active, de aceea sunt necesare numeroase studii suplimentare pentru a valida aceste rezultate și a continua eforturile de cercetare. Evaluarea suplimentară a efectelor acestor potențiatori asupra unui spectru mai larg de peptide ar putea accelera dezvoltarea unor terapii orale inovatoare, cu impact direct asupra aderenței pacienților la tratament și eficacității terapeutice pe termen lung.

Lista lucrărilor științifice elaborate în legătură cu tema de cercetare

1. **Hamza A**, Șaramet G, Actualities In Endocrine Pharmacology: Advances In The Development Of Oral Formulations For Calcitonin And Semaglutide. *Acta Endocrinol (Buchar).*, 2020; 16(3): 383-387. (Capitolul 1)
DOI: <https://doi.org/10.4183/aeb.2020.383>
Link: <https://acta-endo.ro/Archive/Abstract?doi=2020.383>
Indexed PubMed (PMID: [33363667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33363667/))
ISSN: 1843 - 066X (online) și 1841 – 0987 (print)
Impact Factor 2020: 0.877
2. **Hamza A**, Șaramet G, A comparative study of four permeation enhancers for increasing the transport of salmon calcitonin on Caco-2 cell lines. *Farmacia*. 2024; 72(6): 1342-1352. (Capitolul 3)
DOI: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.6.13>
Link: <https://farmaciajournal.com/issue-articles/a-comparative-study-of-four-permeation-enhancers-for-increasing-the-transport-of-salmon-calcitonin-on-caco-2-cell-lines/>
ISSN: 2065-0019 (online) și 0014-8237 (print)
Impact Factor: 1,6 (2022)
3. **Hamza A**, Prisada RM, Șaramet G. Tetradecyl maltoside and dimethyl-palmitoyl-ammonio-propane-sulfonate as effective permeation enhancers for salmon calcitonin and pramlintide: a comparative in vitro study on Caco-2 cell lines. *Farmacia*. 2025;73(2):338–49. (Capitolul 4)
DOI: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2025.2.9>
Link: <https://farmaciajournal.com/issue-articles/tetradecyl-maltoside-and-dimethyl-palmitoyl-ammonio-propane-sulfonate-as-effective-permeation-enhancers-for-salmon-calcitonin-and-pramlintide-a-comparative-in-vitro-study-on-caco-2-cell-lines/>
ISSN: 2065-0019 (online) și 0014-8237 (print)
Impact Factor: 1,6 (2022)

Bibliografie selectată

1. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 2015 Jan;20(1):122–8.
2. Zhu Q, Chen Z, Paul PK, Lu Y, Wu W, Qi J. Oral delivery of proteins and peptides: Challenges, status quo and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021 Aug;11(8):2416–48.
3. Biologics Market Size, Share, Trends & Growth Report, 2033 [Internet]. [cited 2025 Apr 27]. Available from: <https://www.novaoneadvisor.com/report/biologics-market>
4. Parida P, Prusty AK, Patro SK, Jena BR. Current Advancements on Oral Protein and Peptide Drug Delivery Approaches to Bioavailability: Extensive Review on Patents. *RADDF*. 2024 Dec;18(4):227–46.
6. Mansfield C, Sikirica MV, Pugh A, Poulos CM, Unmuessig V, Morano R, et al. Patient Preferences for Attributes of Type 2 Diabetes Mellitus Medications in Germany and Spain: An Online Discrete-Choice Experiment Survey. *Diabetes Ther*. 2017 Dec;8(6):1365–78.
7. Edelman SV, Polonsky WH. Type 2 Diabetes in the Real World: The Elusive Nature of Glycemic Control. *Diabetes Care*. 2017 Nov 1;40(11):1425–32.
8. Maher S, Geoghegan C, Brayden DJ. Intestinal permeation enhancers to improve oral bioavailability of macromolecules: reasons for low efficacy in humans. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021 Feb 1;18(2):273–300.
9. Maher S, Mersny RJ, Brayden DJ. Intestinal permeation enhancers for oral peptide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016 Nov;106:277–319.
10. Hay DL, Garelja ML, Poyner DR, Walker CS. Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. *British J Pharmacology*. 2018 Jan;175(1):3–17.
11. **Hamza A**, Şaramet G. Actualities in Endocrine Pharmacology: Advances in the Development of Oral Formulations for Calcitonin and Semaglutide. *Acta Endo (Buc)*. 2020;16(3):383–7.
12. McLaughlin MB, Awosika AO, Jialal I. *Calcitonin*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Apr 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537269/>

13. McQueen J. Pramlintide acetate. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2005 Nov 15;62(22):2363–72.
14. Chung SW, Hil-lal TA, Byun Y. Strategies for non-invasive delivery of biologics. *Journal of Drug Targeting*. 2012 Jul;20(6):481–501.
15. Horii T, Masudo C, Takayanagi Y, Oikawa Y, Shimada A, Mihara K. Adherence and treatment discontinuation of oral semaglutide and once-weekly semaglutide injection at 12 month follow-up: Japanese real-world data. *J of Diabetes Invest*. 2024 Nov;15(11):1578–84.
16. **Hamza A**, Şaramet G. A Comparative Study of Four Permeation Enhancers for Increasing the Transport of Salmon Calcitonin on Caco-2 Cell Lines. *Farmacia*. 2024; Dec 27;72(6):1342–52.
17. **Hamza A**, Prisada RM, Şaramet G. Tetradecyl maltoside and dimethyl-palmitoyl-ammonio-propane-sulfonate as effective permeation enhancers for salmon calcitonin and pramlintide: a comparative in vitro study on Caco-2 cell lines. *Farmacia*. 2025;73(2):338–49.
18. Peng Y, Yadava P, Heikkinen AT, Parrott N, Railkar A. Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014 Jun;56:120–30.
19. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991 Mar;175(3):880–5.
20. Lennernäs H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica*. 2007 Nov;37(10–11):1015–51.