

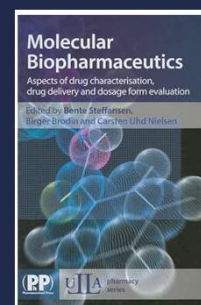


UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE

METODI PER LA MISURAZIONE DELLA PERMEABILITA' APPARENTE IN VITRO

Ass. Prof. Massimiliano Pio di Cagno

27/10/2025



pharmaceutics



Review

Commercially Available Cell-Free Permeability Tests for Industrial Drug Development: Increased Sustainability through Reduction of In Vivo Studies

Ann-Christin Jacobsen ¹, Sonja Visentin ², Cosmin Butnaru ^{2,3}, Paul C. Stein ¹ and Massimiliano Pio di Cagno ^{3,4}

¹ Department of Physics, Chemistry and Pharmacy, University of Southern Denmark, 5230 Odense, Denmark
² Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, University of Turin, 10124 Turin, Italy
³ Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo, Sem Sæviards Vei 3, 0371 Oslo, Norway
⁴ Correspondence: m.p.d.cagno@farmacia.unife.it

Pharmaceutics 2023, 15(2), 592; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020592>

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UNIFE

OBBIETTIVI FORMATIVI DELLA LEZIONE

Al termine della lezione, lo studente deve essere in grado di:

- Definire cosa si intende con il termine *correlazione in vitro-in vivo (IVIVC)*;
- Contestualizzare il concetto di barriera di permeazione nel contesto degli studi di permeabilità in vitro;
- Discriminare tra vantaggi e svantaggi dei metodi in vitro cellulari, biologici ex-vivo e artificiali per misurare la permeabilità apparente (P_{app});
- Ragionare sul concetto di flusso di assorbimento o di ingresso («influx») e flusso di escrezione («efflux») nel contesto degli esperimenti con culture cellulari monostrato per misurare la P_{app} (es. Caco-2);
- Descrivere la geometria e la struttura generale dei più comuni sistemi di diffusione per la misura della P_{app} ;
- Ragionare sulle differenze funzionali e strutturali dei sistemi di permeazione denominati PAMPA e PermeaPad®;
- Ragionare su vantaggi e svantaggi dei sistemi di permeazione denominati PAMPA e PermeaPad®;
- Descrivere i sistemi di diffusione/permeazione e giustificare il loro vantaggio rispetto ai classici sistemi di dissoluzione secondo Ph.Eur;

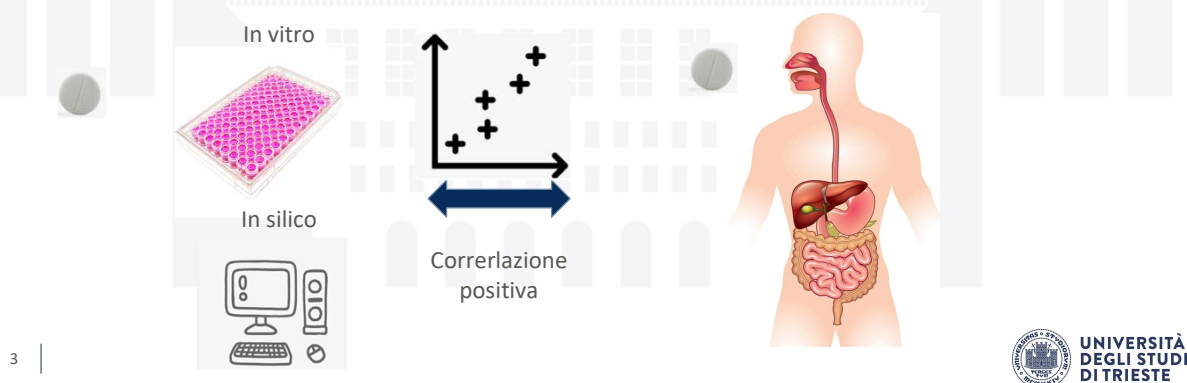


UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UNIFE

CORRELAZIONE IN VITRO-IN VIVO (IVIVC)

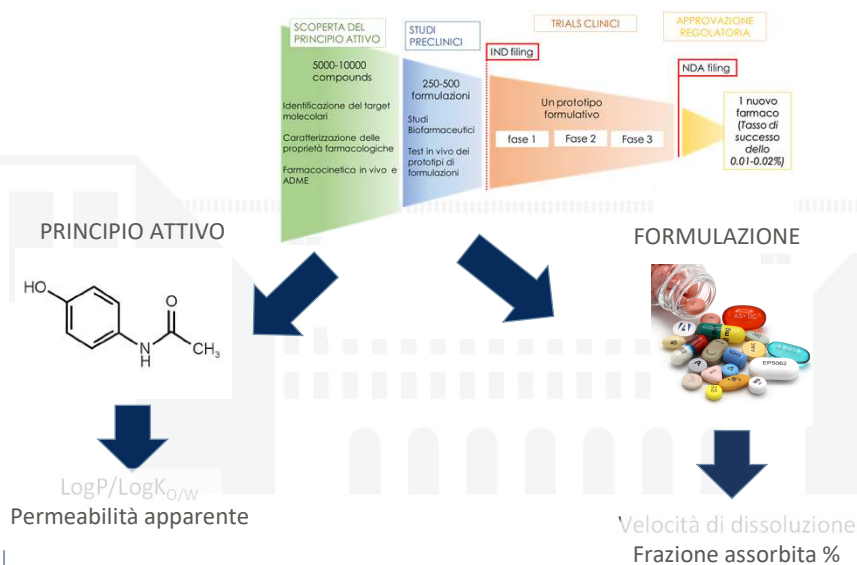
La Farmacopea degli Stati Uniti (USP) definisce l'IVIVC come "l'istituzione di una relazione tra una proprietà biologica, o un parametro derivato da una proprietà biologica prodotta da una forma di dosaggio, e una proprietà fisico-chimica della stessa forma di dosaggio.



U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) September 1997 BP 2 <https://www.fda.gov/media/70933/download>

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UnitTs

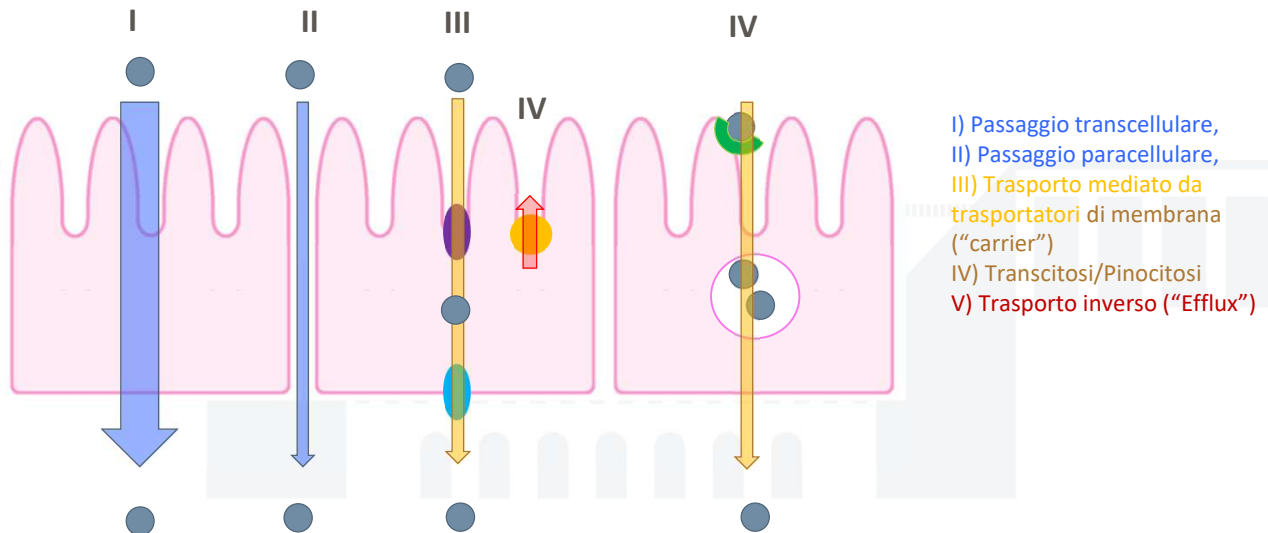
PARAMETRI IN VITRO PER CORRELAZIONE IN VIVO (IVIVC)



U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) September 1997 BP 2 <https://www.fda.gov/media/70933/download>

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UnitTs

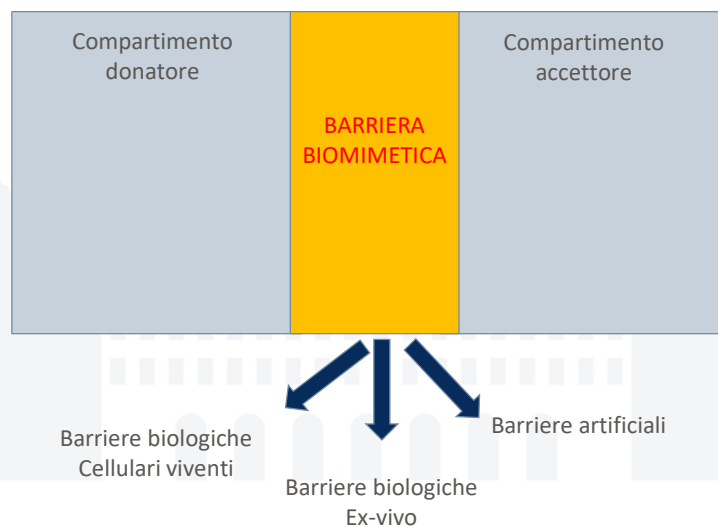
MECCANISMI DI ACCUMULO DEI PRINCIPI ATTIVI



5

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

SCHEMA GENERALE STUDI DI PERMEAZIONE IN VITRIVO

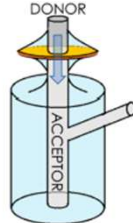


6

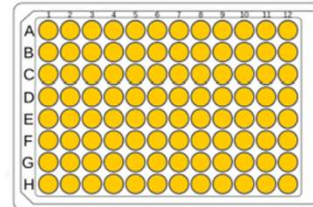
Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

TIPOLOGIE DI SISTEMI DI CELLE A DIFFUSIONE

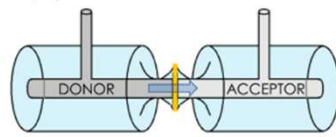
(a) Vertical diffusion cells



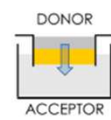
(b) Multiwell diffusion cells



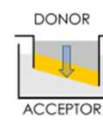
(c) Horizontal diffusion cells



(b-I)



(b-II)



7

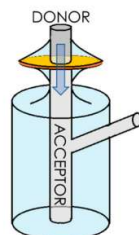
Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

ESEMPI DI SISTEMI PER MISURA DI P_{APP} IN VITRO IN COMMERCIO

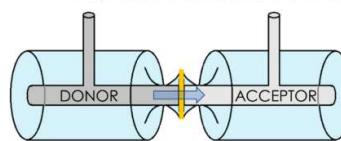
<https://permeagear.com/side-bi-side-cells/>



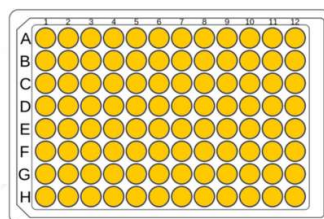
Vertical diffusion cells



Horizontal diffusion cells



Multiwell diffusion cells

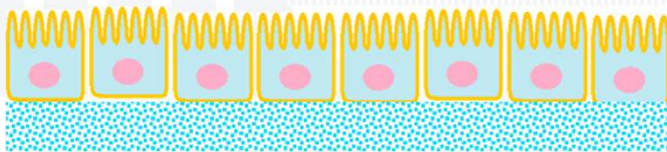


8

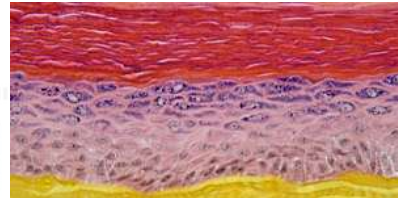
Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

ESEMPI DI BARRIERE BIOLOGICHE CELLULARI VIVENTI

Linea cellulare umana immobilizzata proveniente da campioni di carcinoma colon-rettale ("*human colorectal adenocarcinoma cells*") Caco-2



EpiSkin™



<https://www.episkin.com/Episkin>

9

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

ESEMPI DI BARRIERE BIOLOGICHE EX-VIVO

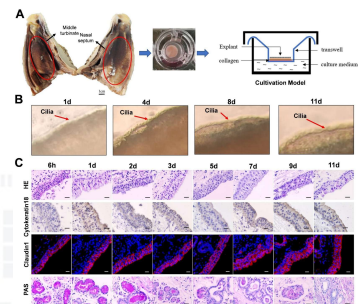
Orecchie di maiale



https://www.alibaba.com/product-detail/Good-Price-Poland-Pig-Ears-Pork_50036878083.html

Studi di assorbimento
transdermico

Mucosa nasale della pecora



Zheng, J., et al. Microbiol., 15 May 2023 Sec. Virology Volume 14 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1124936>

Studi di assorbimento
mucosa (nasale/orale)

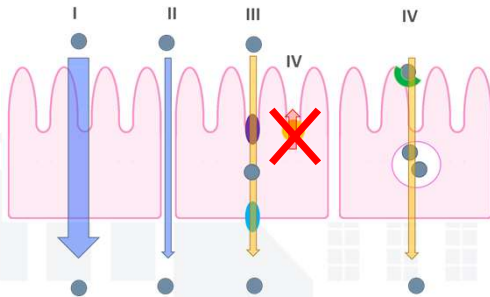
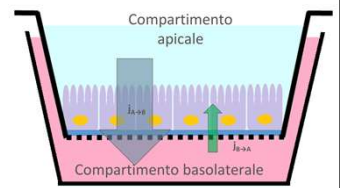
10

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

CACO-2: $P_{(A \rightarrow B)}$

$$j = \frac{Q}{A * t}$$

J: Flusso di massa
Q: Quantità attivo permeata
t: tempo
A: Area barriera



- I) Passaggio transcellulare,
- II) Passaggio paracellulare,
- III) Trasporto mediato da trasportatori di membrana ("carrier")
- IV) Transcitosi/Pinocitosi

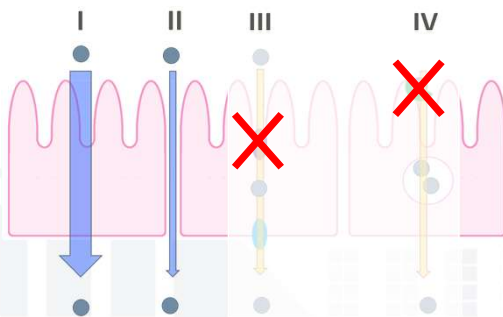
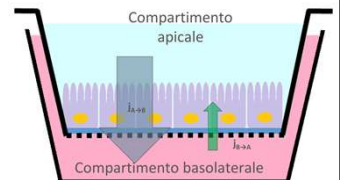
I metodi basati su culture cellulari permettono di valutare tutti i meccanismi di trasporto (attivi e passivi) cellulari

$$j_{(A \rightarrow B)} = j_I + j_{II} + j_{III} + j_{IV}$$

$$j_{(A \rightarrow B)} = \frac{(Q_I + Q_{II} + Q_{III} + Q_{IV})}{A * t}$$

13

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

CACO-2: $P_{(A \rightarrow B)}$ 

Esempi di trasportatori cellulari inibitori selettivi includono gli inibitori SGLT2 per il diabete di tipo 2, come la canagliflozin, che blocca selettivamente il co-trasportatore sodio-glucosio 2 nel rene

$$j_{(A \rightarrow B)} = j_I + j_{II} + j_{III} + j_{IV}$$

$$j_{(B \rightarrow A)} = \frac{(Q_I + Q_{II} + \cancel{Q_{III}} + \cancel{Q_{IV}})}{A * t}$$

Valutazione esclusiva del trasporto passivo

Inibendo selettivamente i trasportatori di membrana si può identificare il meccanismo di trasporto preponderante

14

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs



ESEMPI DI P_{app} : ESEMPIO DEL METODO CACO-2

P_{app} espressa in 10^{-6} (cm/sec)

Drug	P_{app} ^a	LogP	Abs. ^c	M.W.	Net charge ^d
Corticosterone	54.5	1.89	100	346	0
Testosterone	51.8	3.31	100	288	0
Propranolol	41.9	1.54	90	259	+
Alprenolol	40.5	1.00	93	249	+
Warfarin	38.3	0.12	98	308	-
Metoprolol	27.0	0.07	95	267	+
Felodipine	22.7	3.48	100	384	0
Hydrocortisone	21.5	1.53	89	362	0
Dexamethasone	12.5	1.74	100	392	0
Salicylic acid	11.9	-2.14	100	138	-
Acetylsalicylic acid	2.4	-2.57	100	180	-
Practolol	0.90	-1.4	100	266	+
Terbutaline	0.38	-1.4	73	225	+
Atenolol	0.20	-2.14	50	266	+
Mannitol	0.18	-3.10	16	182	0
AVP	0.14	-2.73	0	1084	+
Sulphasalazine	0.13	-0.13	13	398	-
dDAVP	0.13	-1.95	1	1071	+
Olsalazine	0.11	-4.5	2	302	-
PEG	0.052	-5.1	0	4000	0

I farmaci con logP medio-alto e che non sono ionizzati hanno un'elevata permeabilità.

I farmaci con basso logP e che sono ionizzati hanno una bassa permeabilità.

15

Artursson, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Com. 175:880-885 (1991) DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-295X\(91\)91647-U](https://doi.org/10.1016/0006-295X(91)91647-U)

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs



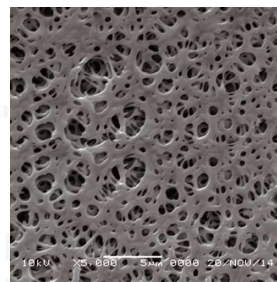
MEMBRANE BIOMIMETICHE ARTIFICIALI «FIBROSE»

Cellulosa rigenerata



<https://www.fishersci.se/shop/products/sartorius-regenerated-cellulose-membrane-filters-9/10673131>

Trans-M®



<http://www.gvs.com/product-family/170/819/>

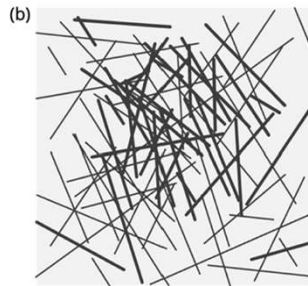
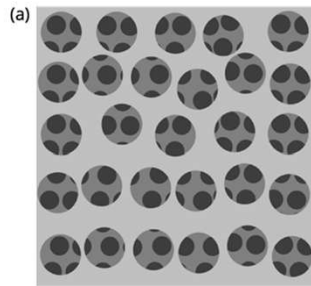
16

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs



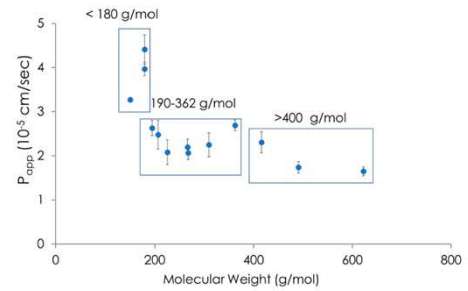
MEMBRANE BIOMIMETICHE ARTIFICIALI

Membrane porose vs membrane fibrose



Preciso cut-off dimensionale
(e.g. 0.22 µm diametro)

Range dimensionale dimensionale (e.g.
15 kDa)



Gli attivi sono classificati
unicamente a seconda della loro
dimensione, non sono barriere
biomimetiche

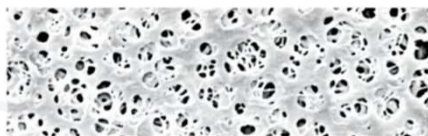
17

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - Unit's

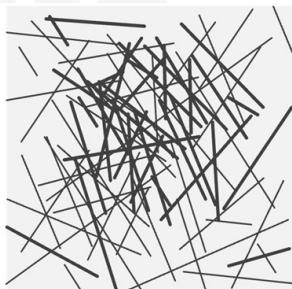


BARRIERE A ESCLUSIONE DIMENSIONALE (I.E., NON BIOMIMETICHE)

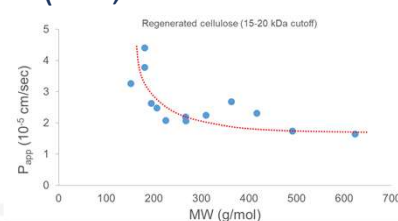
Regenerated cellulose



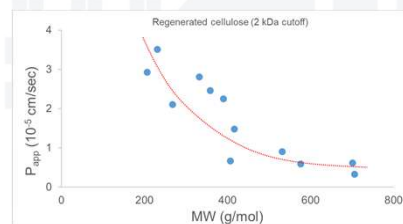
<https://www.fishersci.se/shop/products/sartorius-regenerated-cellulose-rs-membrane-filters-9/10673131>



$$P_{app} \propto \frac{1}{mw}$$



Di Cagno, M. et al. Eur. J. Pharm. Sci. 73:29-34(2015).
doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.019>



Berben, P. et al. J Pharm Sci. 107:250-256(2018).
doi: <https://doi.org/10.1016/j.xjps.2017.08.002>

18

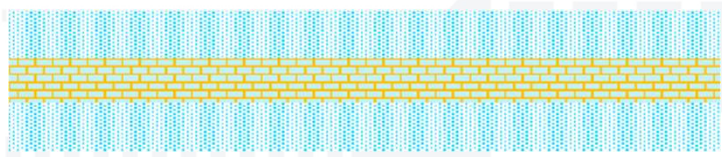
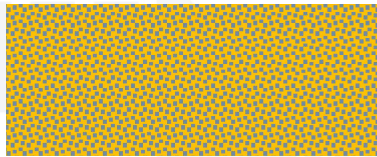
Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - Unit's



BARRIERE BIOMIMETICHE COMMERCIALMENTE DISPONIBILI

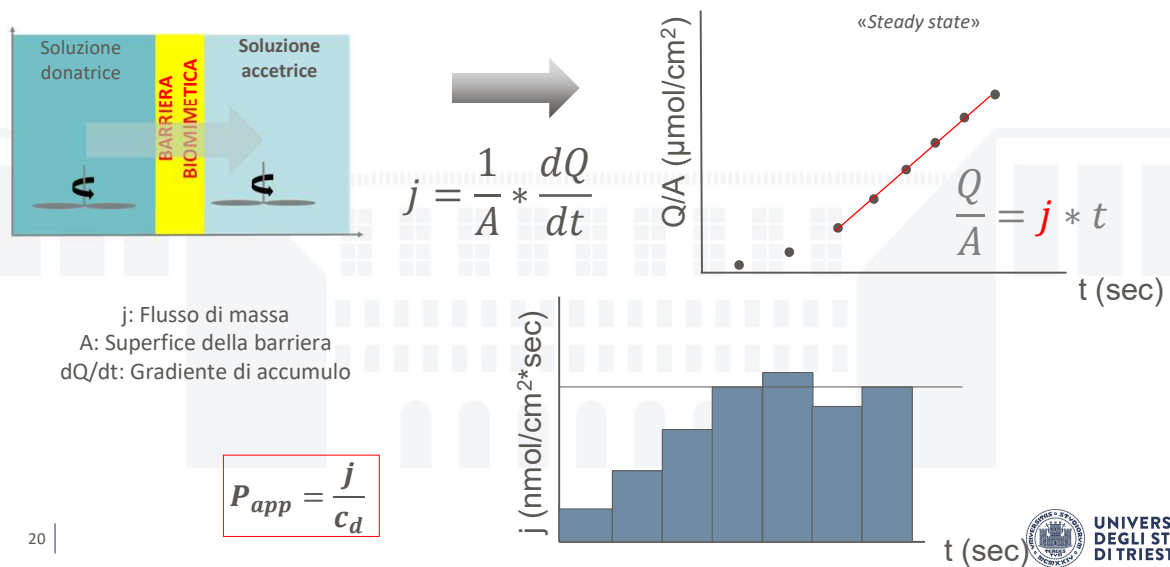
Parallel Artificial
Membrane
Permeability Assay
(PAMPA)

PermeaPad®



19

MISURAZIONE EMPIRICA IN VITRO DELLA P_{app}



20

PARALLEL ARTIFICIAL MEMBRANE PERMEABILITY ASSAY (PAMPA)

Il PAMPA originale è stato progettato in un formato di piastra a 96 pozzetti (schematizzato nella Figura 5b), in cui il materiale filtrante idrofobico, ovvero Durapore/Millipore con una dimensione dei pori di 0,22–0,45 μm , è stato immerso in una soluzione di lecitina all'1–20% in un solvente organico

- Phosphatidylcholine (0.8%),
- L- α -phosphatidylethanolamine (0.8%),
- L- α -phosphatidylserine (0.2%),
- L- α -phosphatidylinositol (0.2%),
- cholesterol (1.0%) 1,7-octadiene (97.0%)

21

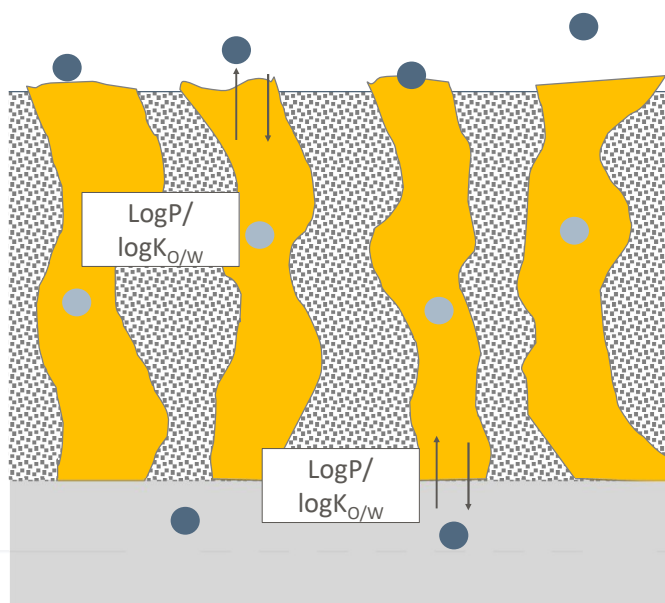
Kenny, M. ET al. J. Med. Chem. 1998, 41, 1007–1010

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs



PARALLEL ARTIFICIAL MEMBRANE PERMEABILITY ASSAY (PAMPA)

Donatore



Il meccanismo principale e la
partizione
acqua/lipide/acqua

Accettore

22

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs



IL TRASPORTO PARACELLULARE NEL PERMEAPAD®

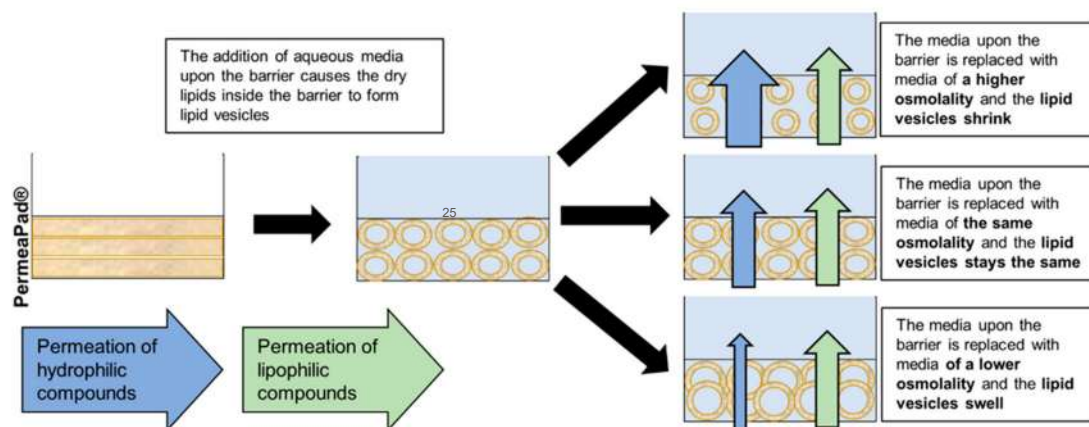


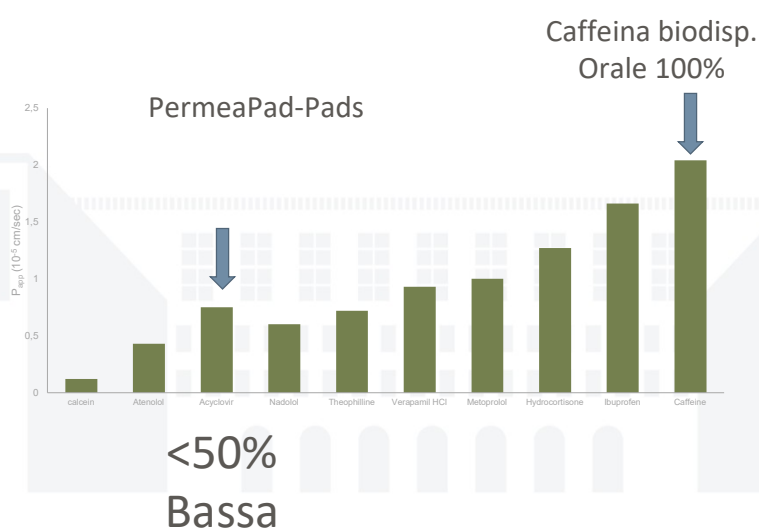
Figure 2. Schematic illustration of lipid vesicles shrinking due to the pretreatment of PermeaPad® with a hypo-osmotic solution.

25

Eriksen, J.B. et al. *Pharmaceutics*, 14(4): 721 (2022); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040721>

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

CORRELAZIONE TRA PAPP PERMEAPAD® E BIODISP.



26

di Cagno M. et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* 73:29–34 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.019>

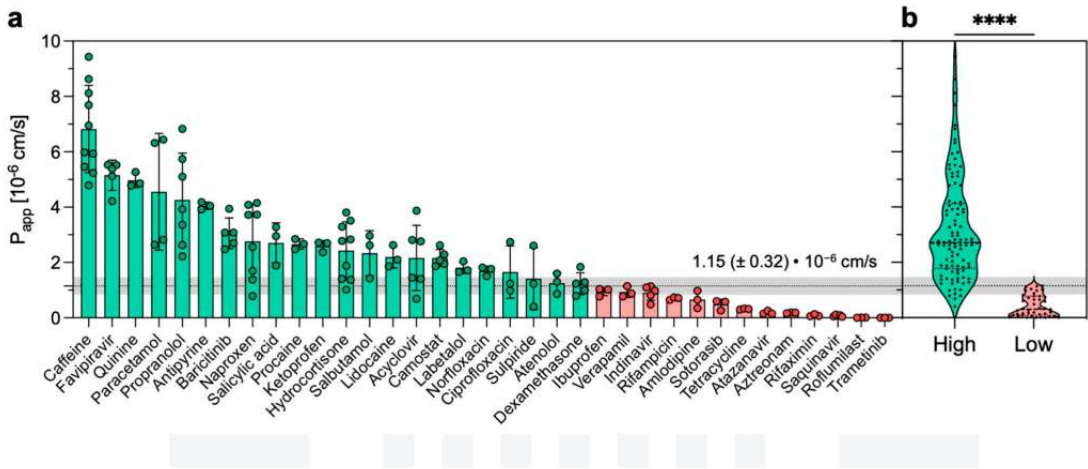
Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

CONFRONTO TRA PEMREAPAD® E PAMPA

	PERMEAPAD ®	PAMPA	REG. CELLULOSE
ROBUSTEZZA			
PR. BIOMIMETICHE			
RIPRODUCIBILITÀ			
TEMPO SPERIMENTALE			
COSTO			
TEST FORMULAZIONI			

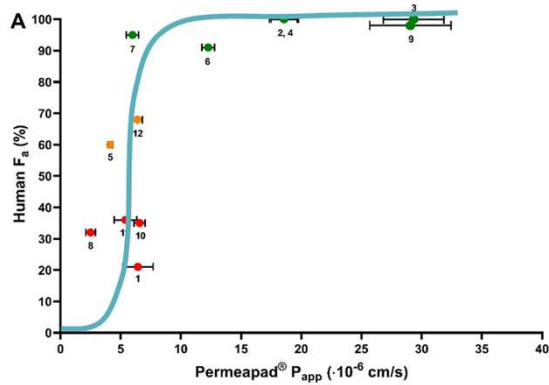
27

PERMEAPAD® DATA SET

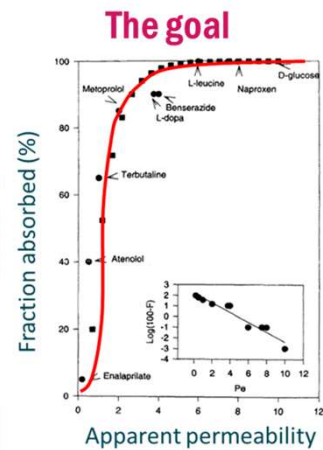


28

PERMEAPAD®: CORRELAZIONE *IN VITRO-IN VIVO* (IVIVC)



Jacobsen, A. et al. Pharm. Res. (2020) 37: 93 <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02807-x>



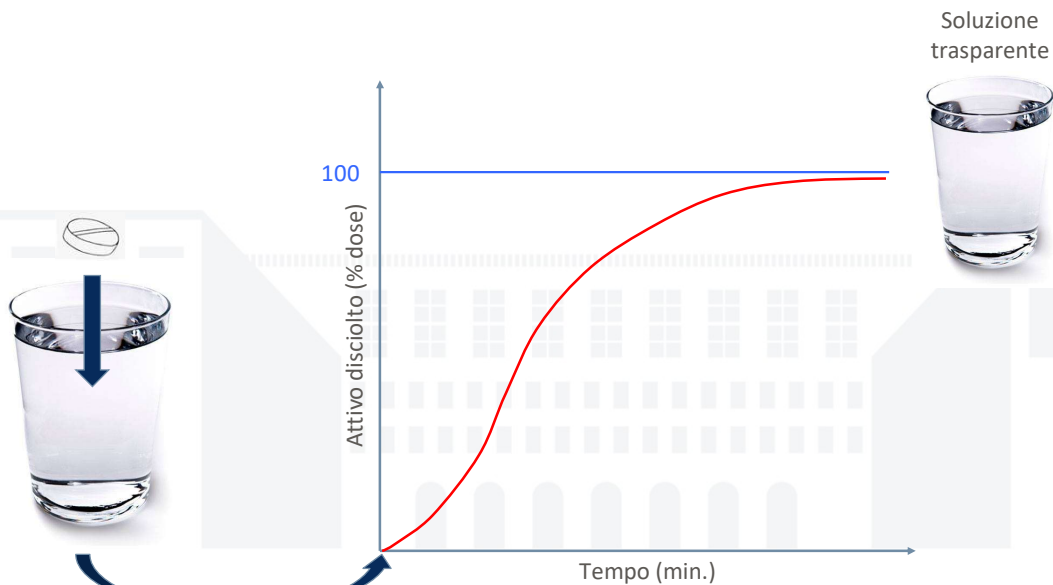
Adapted from Amidon G.L. et al. Pharm. Res. 12:413-420(1995)

LEZIONE B5.1-QUESITO 1

INDICARE QUALE DELLE SEGUENTI AFFERMAZIONI È QUELLA CORRETTA:

- a) I sistemi ex-vivo possono misurare il trasporto attivo degli attivi
- b) I sistemi cellulari possono misurare solo il trasporto passivo degli attivi
- c) I sistemi con barriere artificiali misurano solo il trasporto passivo
- d) La P_{app} è un valore assoluto che per il determinato attivo risulta costante indipendentemente dal metodo usato per studiarlo

SAGGIO DI DISSOLUZIONE -FORME FARMACEUTICHE SOLIDE (2.9.3)



31

Analisi di concentrazione del farmaco molecularmente disciolto

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

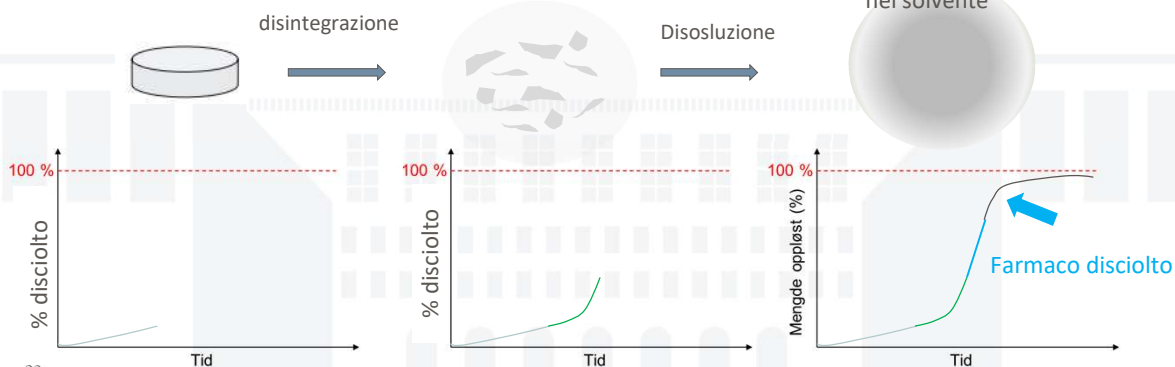
LEGGE DI NOYES-WHITNEY

$$V_d = \frac{dQ}{dt} = A * D \frac{dC}{dx} = A * D \frac{(C_s - C_b)}{x}$$

V_d: velocità di dissoluzioneD_a

A: Area di contatto solido/liquido

D: Coefficiente di diffusione del farmaco nel solvente

C_b: concentrazione dell'attivo nel vessel («bulk»)C_s: Solubilità termodinamica dell'attivo nel solvente

32

L'area superficiale cambia nel tempo, nel caso delle compresse convenzionali, aumenta man mano che la disintegrazione procede. Poi il calo di gradiente riduce la velocità dissolutiva

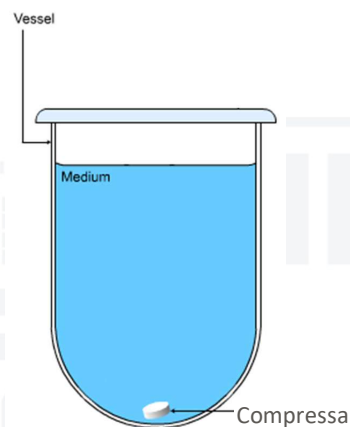
32

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE

Copyright © Massimiliano Pio di Cagno - UniTs

APPARATO DI DISSOLUZIONE PH.EUR.

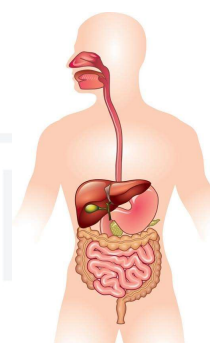
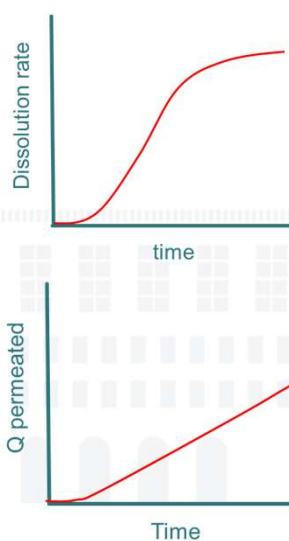
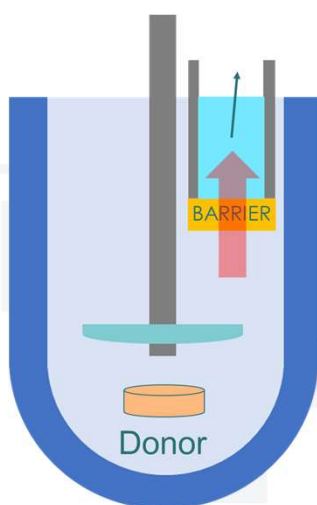
- Il recipiente di dissoluzione, chiamato «vessel», è cilindrico, con fondo emisferico e capacità di 1 L. La sua altezza è di 160-210 mm e il suo diametro interno è di 98-106 mm.



<https://www.collegeofpharmacy.com/callearningcentre/demonstrations/ALPackagers/DisolutionDemo/2Introduction/page/7.html>

33

METODI DI DISSOLUZIONE/PERMEAZIONE



Miglioramento
Dell'IVIVC

34

DISSOLUTION/PERMEATION TEST

MacroFLUX (Pion Inc.)



MicroFLUX (Pion Inc.)



PAMPA barrier

3
5

Dissoflux (Electrolab)



PERMETRO (Logan Instruments)



PermeaPad-GIT

35

«TAKE HOME MESSAGES»

- _____
- _____
- _____
- _____
- _____

36