



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Fernandes Eires

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Oral delivery of siRNA-containing lipid-based nanocarriers: challenges and recent advances*” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. Filipe Oliveira, da Dra. Cláudia Mota e do Professor Doutor Sérgio Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Fernandes Eires

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Oral delivery of siRNA-containing lipid-based nanocarriers: challenges and recent advances*” referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação do Dr. Filipe Oliveira, da Dra. Cláudia Mota e do Professor Doutor Sérgio Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2021

Eu, Inês Fernandes Eires, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016229871, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Oral delivery of siRNA-containing lipid-based nanocarriers: challenges and recent advances*” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2021.

Inês Fernandes Eires

(Inês Fernandes Eires)

Agradecimentos

Gostaria de exprimir o meu profundo e sincero agradecimento a todos aqueles que, nos últimos cinco anos, acompanharam e contribuíram para o meu percurso académico. Em particular, gostaria de agradecer aos meus pais, pelo apoio e incentivo incondicionais; sem eles este percurso não teria sido possível.

Gostaria, também, de dirigir uma palavra de agradecimento a todos os que contribuíram, em especial, para esta última etapa do percurso e para o trabalho que neste documento apresento. Assim, agradeço:

Ao Dr. Filipe Oliveira e a toda a equipa técnica da Farmácia Santa Ana Jardim, pelo carinho, a disponibilidade e atenção que sempre me demonstraram e pelos ensinamentos transmitidos.

À equipa de estudos de estabilidade dos Laboratórios Basi – Indústria Farmacêutica, S.A., pela amizade com a qual fui recebida.

Por último, mas não menos importante, ao Professor Doutor Sérgio Simões, pela simpatia e pela sua orientação e ajuda na elaboração da monografia.

Resumo do Documento

O presente documento é o fruto do trabalho teórico e prático desenvolvido no âmbito da unidade curricular “Estágio”, integrada, no 2º semestre do 5º ano, no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). A apresentação, discussão pública e aprovação deste trabalho são condições necessárias para a conclusão do curso e consequente obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

O documento encontra-se dividido em três capítulos. No Capítulo I e no Capítulo II são apresentados, respetivamente, o Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária e o Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica. Após uma breve contextualização sobre os locais de estágio e as principais atividades realizadas enquanto estagiária, ambos os relatórios tomam a forma de uma análise SWOT (do inglês, *Strengths* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades), *Threats* (Ameaças)), sendo feita a apreciação crítica dos estágios. Ademais, no Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária é apresentada, ainda, a descrição de três casos práticos ocorridos durante o estágio. Por último, o Capítulo III corresponde à Monografia, intitulada “*Oral delivery of siRNA-containing lipid-based nanocarriers: challenges and recent advances*”. Na monografia, são discutidas estratégias e abordagens recentemente publicadas na literatura relativas a sistemas nanocarregadores à base de lípidos para a administração oral de pequenas moléculas de RNA de interferência (*siRNAs*, do inglês *small interfering RNAs*).

Palavras-chave: farmácia comunitária; indústria farmacêutica; *siRNAs*; administração oral; sistemas nanocarregadores à base de lípidos.

Abstract of the Document

The present document is the result of the practical and theoretical work developed within the context of the curricular unit “Internship”, included, in the 2nd semester of the 5th year, in the study plan of the Integrated Master’s Degree in Pharmaceutical Sciences (*MICF*, from the Portuguese *Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas*) of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra (*FFUC*, from the Portuguese *Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra*). The presentation, public discussion and approval of this work are required conditions for the completion of the course and consequent obtention of the Master’s degree in Pharmaceutical Sciences.

The document is divided in three chapters. In Chapter I and Chapter II, the Community Pharmacy Internship Report and the Pharmaceutical Industry Internship Report are presented, respectively. Following a brief contextualization of the places where the internships took place and of the main activities developed as an intern, both reports take the form of a SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats) analysis and a critical appreciation of the internships is made. Additionally, in the Community Pharmacy Internship Report, a description of three case studies which occurred during the internship is also presented. Lastly, Chapter III corresponds to the Monograph, entitled “Oral delivery of siRNA-containing lipid-based nanocarriers: challenges and recent advances”. In the monograph, strategies and approaches recently published in the literature in the field of lipid-based nanocarrier systems for the oral delivery of small interfering RNAs (siRNAs) are discussed.

Keywords: community pharmacy; pharmaceutical industry; siRNAs; oral delivery; lipid-based nanocarrier systems.

Índice

Resumo do Documento.....	4
Abstract of the Document	5

Capítulo I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	9
1. Introdução.....	10
2. Estágio na FSAJ.....	10
3. Análise SWOT.....	11
3.1. Pontos Fortes.....	11
3.1.1. Grande contacto com o atendimento ao público.....	11
3.1.2. Preparação e concretização do mês de “maio, mês do coração”.....	12
3.2. Pontos Fracos.....	12
3.2.1. A não preparação de medicamentos manipulados	12
3.3. Oportunidades	13
3.3.1. Contacto com o Sifarma®	13
3.3.2. Posição das farmácias no sistema de saúde – Ex. da pandemia de COVID-19.....	13
3.4. Ameaças.....	14
3.4.1. Obras na zona envolvente à FSAJ.....	14
3.4.2. Receitas médicas manuais.....	15
4. Casos Práticos.....	16
Caso Prático I: Obstipação	16
Caso Prático II: Secura ocular	16
Caso Prático III: Dismenorreia.....	17
5. Considerações Finais.....	17
Referências Bibliográficas.....	19
Anexos	20

Capítulo II: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	23
1. Introdução.....	24
2. Estágio na equipa de estudos de estabilidade	24
3. Análise SWOT.....	25
3.1. Pontos Fortes.....	26
3.1.1. Integração na equipa de estudos de estabilidade	26
3.1.2. Elevada execução laboratorial	26
3.2. Pontos Fracos.....	26
3.2.1. Ausência de um plano de estágio e fluxo de trabalho irregular.....	26
3.2.2. Impossibilidade de contactar com a HPLC	27
3.3. Oportunidades	27
3.3.1. Competências laboratoriais proporcionadas pelo MICF.....	27
3.3.2. Contacto com outras equipas e secções do laboratório de CQ	27
3.4. Ameaças.....	28
3.4.1. Entrada de uma nova colaboradora na equipa de estudos de estabilidade	28
4. Considerações Finais	29

Referências Bibliográficas	30
Anexos	31
Capítulo III: Monografia	
Abstract	34
Resumo	35
Abbreviations.....	36
1. Introduction.....	38
2. siRNA-based drugs	39
2.1. Structural characteristics of siRNAs and basic mechanism as mediators of the RNAi gene silencing process	39
2.2. Therapeutic potential of siRNA-based drugs and barriers to their widespread clinical application	41
2.2.1. The main strategy to overcome the delivery challenges of siRNAs: carrier systems.....	42
3. Oral delivery of siRNA-based drugs.....	43
3.1. Obstacles to the oral delivery of siRNA-based drug formulations.....	44
3.2. Advantages of the oral route of delivery	47
4. Nonviral delivery nanocarrier systems for siRNA-based drugs	48
4.1. General overview	48
4.2. Nanocarriers for the oral delivery of siRNA-based drugs.....	48
4.2.1. Lipid-based nanocarriers for the oral delivery of siRNA-based drugs	49
4.2.1.1. New studies and approaches	50
4.2.1.1.1. Elucidation of the fate in the GIT of orally delivered siRNA-containing lipid-based nanocarriers	51
4.2.1.1.2. Oral delivery of siRNA-containing naturally-derived lipid-based nanocarriers.....	52
4.2.1.1.2.1. Exosomes.....	52
4.2.1.1.2.1.1. mExos.....	54
4.2.1.1.2.2. PDNPs	56
4.2.1.1.2.2.1. GDNPs and GDLVs.....	56
4.2.1.1.3. Lyophilization and compression of siRNA-containing lipid-based nanocarriers into tablets for oral administration	58
5. Conclusions and future perspectives.....	60
References.....	62

Capítulo I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Santa Ana Jardim

Lista de Abreviaturas

AINE: anti-inflamatório não esteroide

COVID-19: *Coronavirus disease 2019*

cp.: comprimido

CV: cardiovascular

DM: dispositivo médico

FEFO: *first expired, first out*

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FSAJ: Farmácia Santa Ana Jardim

IMC: índice de massa corporal

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM: medicamento não sujeito a receita médica

MSRM: medicamento sujeito a receita médica

MUV: medicamento de uso veterinário

PA: pressão arterial

PSBE: produto de saúde e bem-estar

PV: prazo de validade

PVP: preço de venda ao público

SWOT: *Strengths* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades), *Threats* (Ameaças)

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), lecionado em várias instituições de ensino superior, de entre as quais a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), é o único curso académico que habilita os estudantes para o exercício da profissão farmacêutica. No âmbito do estágio curricular do curso, o qual dá cumprimento à Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro 2013¹, é obrigatória a realização de um estágio em farmácia comunitária. O objetivo deste estágio obrigatório é promover o contacto dos estudantes, em contexto simulado de trabalho, com aquela que é, indiscutivelmente, a face mais visível da profissão.

O presente relatório diz respeito ao estágio por mim realizado em farmácia comunitária. O estágio foi realizado, mais precisamente, na Farmácia Santa Ana Jardim (FSAJ), de 12 de abril a 30 de julho de 2021, sob a orientação do Dr. Filipe Oliveira, o diretor técnico da farmácia, e sob a supervisão da restante equipa técnica.

O relatório compreende fundamentalmente três partes. Numa primeira parte, figura uma breve contextualização da FSAJ, da sua equipa técnica e das tarefas e responsabilidades nas quais tive oportunidade de participar ao longo do estágio. Numa segunda parte, o relatório toma a forma de uma análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) e é apresentada uma reflexão crítica sobre as forças, fraquezas, oportunidades e ameaças do estágio. Por fim, na terceira e última parte, é feita a descrição de três casos práticos com os quais me deparei na farmácia.

2. Estágio na FSAJ

A FSAJ é uma pequena farmácia situada na rua Cândido dos Reis, n.º 1, na Figueira da Foz. A sua localização privilegiada, junto ao Bairro Novo da cidade, na proximidade de vários estabelecimentos de restauração e outros, como o Tribunal Judicial ou o Mercado Municipal, faz com que seja procurada por utentes diversos (residentes, utentes fidelizados, turistas e veraneantes). A principal atividade da farmácia é, indiscutivelmente, a dispensa de medicamentos e de outros produtos de saúde e bem-estar (PSBE). Não obstante, a atividade da FSAJ vai além disso; com o seu foco no utente, a FSAJ oferece uma série de serviços, que fazem dela um espaço de promoção para a saúde e prevenção da doença. A equipa técnica da FSAJ é composta pelo Dr. Filipe Oliveira, o diretor técnico, e por outros quatro elementos,

de entre os quais dois farmacêuticos. Todos trabalham, diariamente, no sentido de assegurar a óptima atividade da farmácia e serviços de qualidade e excelência aos utentes que a procuram.

Na FSAJ, ao longo dos quatro meses do meu estágio, tive a oportunidade de acompanhar e de realizar, de uma forma geral, todo o trabalho efetuado pela equipa técnica. Assim, durante o estágio, tive, de igual modo, oportunidade de seguir o circuito dos medicamentos e PSBE na farmácia comunitária, e pude adquirir uma visão global da mesma. A título exemplificativo, encontra-se em Anexo^A uma lista de algumas das tarefas e responsabilidades que pude acompanhar e realizar ao longo do meu estágio na farmácia.

3. Análise SWOT

A análise SWOT^B que se segue visa apresentar e discutir os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que senti e identifiquei ao longo do estágio. Os pontos fortes e os pontos fracos dizem respeito a aspetos vantajosos e menos vantajosos do estágio, respetivamente. Por sua vez, as oportunidades e ameaças correspondem a fatores que, de certo modo, não estando diretamente relacionados com o estágio, o afetaram de forma positiva ou negativa e que, por isso, não devem ser ignorados.

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Grande contacto com o atendimento ao público

Ao longo do meu estágio na FSAJ, tive sempre um grande contacto com o atendimento ao público. Numa fase inicial do estágio, esse contacto foi maioritariamente observacional; ou seja, numa fase inicial, assistia, apenas, aos atendimentos realizados pelos elementos da equipa técnica da farmácia. No entanto, com o decurso do estágio, esta postura observacional inicial foi progressivamente substituída por uma postura mais ativa e, por fim, autónoma nos atendimentos. A grande disponibilidade da equipa técnica da FSAJ para, durante ou após os atendimentos, esclarecer todas as dúvidas que colocava foi crucial para que assim fosse.

O contacto com os utentes na farmácia, durante o atendimento, é um aspeto inevitável da profissão de farmacêutico comunitário. Pela sua natureza, este é um aspeto para a qual o MICEF pouca, ou nenhuma, preparação confere. Apenas em contexto prático de trabalho, perante diversas situações, é possível, na minha opinião, adquirir as competências necessárias para o contacto com os utentes e o atendimento ao público em farmácia comunitária. Assim,

^A Anexo A: Lista das tarefas e responsabilidades principais/mais frequentes ao longo do estágio na FSAJ.

^B Anexo B: Figura I. Representação esquemática da análise SWOT relativa ao estágio em farmácia comunitária.

considero que o grande contacto que tive com o atendimento ao público durante o meu estágio na FSAJ foi extremamente vantajoso e, por isso, relevo-o como um dos pontos fortes desta etapa do estágio curricular.

3.1.2. Preparação e concretização do mês de “maio, mês do coração”

No mês de maio celebra-se, por iniciativa da Fundação Portuguesa de Cardiologia, o “mês do coração”, por forma a alertar a população para a problemática das doenças cardiovasculares (CV).² Com o objetivo de celebrar este mês também na FSAJ, os elementos da equipa técnica sugeriram que eu e a outra estagiária da farmácia preparássemos e concretizássemos algo neste âmbito. Assim, ao longo do mês de maio, decidimos realizar rastreios CV gratuitos. Uma vez que a hipertensão, a obesidade e as dislipidemias são fatores de risco importantes para o desenvolvimento de doenças CV, decidimos que os rastreios consistiriam na medição da pressão arterial (PA) e na determinação do índice de massa corporal (IMC) e do colesterol total.

Na minha opinião, é importante que o farmacêutico, enquanto agente de saúde pública, desenvolva atividades que contribuam para a promoção e educação para a saúde dos utentes. Penso que a atividade desenvolvida no “mês do coração” o fez e, por isso, estou bastante satisfeita com a minha participação na sua preparação e concretização. Para mais, os rastreios do “mês do coração” permitiram que me familiarizasse com a balança e com os aparelhos de medição da PA e colesterol da farmácia, o que também considero vantajoso. Considero, então, que a preparação e concretização do mês de “maio, mês do coração” foi um dos pontos fortes do meu estágio.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. A não preparação de medicamentos manipulados

Entende-se por “medicamento manipulado” qualquer medicamento preparado, em farmácia comunitária ou nos serviços farmacêuticos hospitalares, segundo receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina (fórmula magistral) ou, então, segundo indicações compendiais de uma farmacopeia ou formulário (preparado oficial).³

Atualmente, devido ao setor da indústria farmacêutica, este tipo de medicamentos não tem a expressão que outrora teve em farmácia comunitária. Na FSAJ, em concreto, a procura por medicamentos manipulados é praticamente nula. Por esse motivo, a FSAJ considera que não se justifica a manutenção das condições necessárias para garantir a preparação com qualidade destes medicamentos e, quando é procurada para o efeito, opta por pedir o

medicamento manipulado em questão a outra farmácia. Consequentemente, ao longo do meu estágio, não tive oportunidade de preparar qualquer medicamento manipulado, o que considero ter sido um ponto fraco.

Gostaria de ter tido a oportunidade de preparar um medicamento manipulado, não tanto pela preparação laboratorial propriamente dita, mas sim pelos procedimentos que, legalmente, lhe estão subjacentes. Isto é, gostaria de ter tido oportunidade de contactar com os procedimentos de receção de material de embalagem e matérias-primas, de preenchimento da ficha de preparação do manipulado e de cálculo do preço de venda ao público (PVP).

3.3. Oportunidades

3.3.1. Contacto com o Sifarma®

O Sifarma® é um *software* concebido, pela Glintt®, para funcionar como o “alicerce” informático da farmácia comunitária e para melhorar o desempenho da atividade farmacêutica. Este *software* permite desempenhar, informaticamente, quer processos associados à logística da farmácia (p. ex. gestão de *stocks* e gestão de encomendas), quer o processo de atendimento ao público.⁴ Permite, também, desse modo, a gestão dos medicamentos e PSBE, desde a sua entrada na farmácia até à sua saída.

Na FSAJ é utilizado, como sistema informático, o Sifarma®. Aliás, são utilizadas, em simultâneo, as duas versões atualmente existentes do sistema: o Sifarma 2000® e o novo módulo do Sifarma®, que ainda se encontra em desenvolvimento. Ao longo do meu estágio, pude, portanto, contactar diariamente com este *software* e com as suas duas versões. E pude explorar as suas funcionalidades na execução das várias tarefas e atividades que desempenhei. Devo acrescentar que tive, também, ao longo do estágio, a possibilidade de contactar, por algumas vezes, com ferramentas complementares do Sifarma®, como o SifarmaGest®.

Uma vez que o Sifarma® desempenha um papel preponderante no funcionamento das farmácias que o utilizam, e uma vez que é o sistema informático mais utilizado pelas farmácias comunitárias em Portugal⁴, penso que o contacto que tive com este *software* durante o estágio curricular poderá ser uma mais-valia no meu futuro profissional. Assim, destaco o contacto com o Sifarma® como uma das oportunidades que identifiquei no estágio.

3.3.2. Posição das farmácias no sistema de saúde – Ex. da pandemia de COVID-19

Atualmente, devido à proximidade, ao fácil e gratuito acesso e à sua credibilidade, as farmácias comunitárias são os locais do sistema de saúde aos quais a população mais recorre. Fá-lo em diversas situações, seja à procura de aconselhamento, seja para colocar questões

sobre a medicação, as doenças ou outros assuntos, ou mesmo em casos de maior urgência. Com a pandemia de *COVID-19* (do inglês, *Coronavirus disease 2019*), esta tornou-se uma verdade ainda maior e mais visível. Ao longo do meu estágio na FSAJ, por exemplo, pude constatar que vários utentes e cidadãos procuravam esclarecer junto da equipa técnica da farmácia as suas dúvidas sobre a vacinação, as medidas de combate à pandemia, a realização de autotestes, etc. Além disso, pude constatar, também, que, na pandemia, alguns utentes passaram a recorrer à FSAJ por forma a terem um maior acompanhamento das suas doenças crónicas; destaca-se o caso de alguns utentes hipertensos, que passaram a recorrer ao serviço de medição da PA da farmácia de forma regular.

A meu ver, esta posição que as farmácias têm, atualmente, no sistema de saúde é uma oportunidade para o próprio exercício da profissão farmacêutica, na medida em que permite ao farmacêutico comunitário diferenciar-se e afirmar-se como agente de saúde pública.

Por sentir que, ao longo do meu estágio, eu própria tive um papel importante na transmissão de informação aos utentes e no esclarecimento das suas dúvidas em diferentes ocasiões, como, por exemplo, a propósito da pandemia, penso que esta posição das farmácias acabou por constituir uma oportunidade também para mim, enquanto estagiária.

3.4. Ameaças

3.4.1. Obras na zona envolvente à FSAJ

Ao longo do último ano, têm decorrido no Jardim Municipal da Figueira da Foz e na zona envolvente, na qual se encontra a FSAJ, obras de remodelação e beneficiação. Devido às obras, nos quatro meses do meu estágio, foram várias as ruas e estradas próximas da farmácia nas quais a circulação e o estacionamento ficaram condicionados, ou mesmo interditos.

Na FSAJ, esta situação refletiu-se num menor número de utentes. Refletiu-se, também, muitas vezes, numa barreira adicional ao atendimento dos utentes existentes; porque, para além das máscaras, acrílicos e da maior distância física, adotadas como medidas de segurança devido à pandemia, o ruído das máquinas das obras tornava a comunicação com os utentes ainda mais difícil e limitada.

Na minha opinião, a situação refletiu-se, também, de forma negativa no meu estágio. Por um lado, quando iniciei o atendimento ao público de forma mais autónoma, senti que os utentes se mostravam, frequentemente, impacientes com a demora do mesmo, por terem as viaturas mal estacionadas devido aos condicionamentos e interdições resultantes das obras. Por outro lado, o número e a diversidade de casos de atendimento com os quais tive

oportunidade de contactar durante o estágio foi, necessariamente, menor, dada a menor afluência de utentes à farmácia.

Assim, considero que as obras na zona da FSAJ constituíram uma ameaça, não só para a normal atividade da farmácia nos últimos tempos, mas também para o meu estágio.

3.4.2. Receitas médicas manuais

Relativamente às receitas médicas manuais, senti e identifiquei, ao longo do meu estágio em farmácia comunitária, duas ameaças: a inadequada abordagem que é feita a esta temática no MICF e o contacto com um número reduzido deste tipo de receitas durante o período de estágio. Em seguida, abordo cada uma destas ameaças, separadamente, com maior detalhe.

Inadequação da abordagem feita no MICF

No 2º semestre do 2º ano, na unidade curricular de farmacologia geral, foram abordadas as temáticas da receita/prescrição médica e da dispensa de medicamentos em farmácia comunitária.

Em primeiro lugar, na minha opinião, a abordagem feita é prematura. Penso que seria pertinente abordar estes temas mais tarde, próximo do estágio curricular e da conclusão do curso. Em segundo lugar, penso, também, que a abordagem feita deveria ser mais prática e deveria contemplar aspetos relativos aos sistemas e subsistemas de participação e à gestão, fecho e faturação de lotes de receitas no Sifarma®. Em suma, considero que a abordagem feita no MICF à receita/prescrição médica e à dispensa de medicamentos não é a mais adequada e, conseqüentemente, não prepara os estudantes, de forma satisfatória, para a realidade subjacente a estas temáticas em farmácia comunitária. Por este motivo, considero-a uma ameaça.

Contacto com um número reduzido de receitas manuais durante o estágio

Nos últimos anos tem sido fortemente promovida a desmaterialização de todo o circuito do receituário. As receitas médicas manuais são aceites, desde que devidamente justificadas, mas, por este motivo, atualmente, o número de atendimentos feitos em farmácia comunitária mediante este tipo de receitas é reduzido.

Fruto do reduzido número de receitas médicas manuais com as quais contactei durante o meu estágio na FSAJ, sinto que não me foi possível, ao longo do mesmo, desenvolver a prática e confiança necessárias para, de forma 100 % autónoma, proceder à dispensa deste tipo de receitas. Senti, com frequência, a necessidade de confirmar junto dos elementos da equipa técnica se estava a proceder de forma correta à validação técnico-científica deste tipo

de receitas. Também com frequência, surgiam dúvidas e questões aquando da dispensa de receitas médicas manuais abrangidas por subsistemas de saúde. Pelas razões referidas, indico o contacto com um número reduzido de receitas médicas manuais durante o meu estágio como uma das suas ameaças.

4. Casos Práticos

Segue-se a apresentação, sucinta, de três casos práticos com os quais me deparei ao longo do meu estágio na FSAJ, bem como a descrição da forma como procedi face aos mesmos, aplicando os conhecimentos técnico-científicos adquiridos ao longo do MICF.

Caso Prático I: Obstipação

Uma senhora, com cerca de 50 anos, dirige-se à farmácia à procura de aconselhamento farmacêutico. Refere que está de férias na cidade e que, desde que chegou, há 3 dias, ainda não foi à casa de banho, o que refere também ser estranho, atendendo à sua frequência normal, diária, de dejeções. Quando questionada, nega outros problemas de saúde ou estar a fazer qualquer tipo de medicação.

Aconselhamento farmacêutico: Comecei por aconselhar a adoção de algumas medidas preventivas, de natureza não farmacológica: a ingestão de 1 L a 2 L de água por dia, a ingestão de alimentos ricos em fibras (frutas, vegetais, cereais integrais, etc.) ou a prática regular de exercício físico, por exemplo. Aconselhei, depois, Dulcolax[®] (bisacodilo) 5 mg, comprimido revestido, um laxante de contacto. Indiquei à senhora que tomasse 1 comprimido (cp.) ao deitar, para que o efeito do mesmo se produzisse na manhã seguinte.⁵ Além do mais, adverti a senhora para a “agressividade” do laxante dispensado, referindo que este deve ser tomado apenas em situações pontuais, como era o caso, e não de forma recorrente.

Caso Prático II: Secura ocular

Uma jovem, com cerca de 20 anos, dirige-se à farmácia, acompanhada da mãe, queixando-se de ter os olhos “muito vermelhos” nos últimos dias. Após algumas questões, a jovem refere que os sintomas afetam os dois olhos e que, além da vermelhidão, sente algum ardor e os olhos cansados, sobretudo ao final do dia. Não apresenta sintomas nasais concomitantes ou secreções oculares, nem sofre de condições alérgicas (p. ex. asma, rinite alérgica ou eczema). Refere, ainda, que não usa óculos ou lentes de contacto. A mãe acrescenta que a rapariga é estudante universitária em engenharia informática e que, por se encontrar em época de exames, tem passado muito tempo ao computador recentemente.

Aconselhamento farmacêutico: Conclui que, provavelmente, se tratava apenas de um caso de secura ocular. Aconselhei Hyabak[®] (hialuronato de sódio 0,15 %), gotas oftálmicas, um lubrificante e hidratante ocular. Expliquei que poderia aplicar 1 gota em cada olho, várias vezes ao dia, no canto do saco lacrimal inferior, puxando ligeiramente a pálpebra inferior para baixo e dirigindo o olhar para cima⁶. Expliquei, também, que, antes de proceder à aplicação, deveria lavar as mãos e que deveria evitar tocar com o conta-gotas no olho ou nas pálpebras. Alertei, ainda, a jovem para a importância de descansar os olhos enquanto trabalha no computador, dizendo-lhe que deveria desviar o olhar do computador com regularidade, focando-o em objetos mais distantes, e que deveria tentar pestanejar mais vezes.^{7:8}

Caso Prático III: Dismenorreia

Uma utente dirige-se à farmácia. Procura aconselhamento para a filha, pois a rapariga, de 12 anos de idade, sente algumas dores nos primeiros dias da menstruação. Após algumas questões, inclusive questões relacionadas com eventuais contraindicações (p. ex. “A sua filha tem problemas de estômago, asma ou qualquer outra doença?”), a utente refere que a filha é asmática.

Aconselhamento farmacêutico: Perante a informação que me foi transmitida, optei por dispensar um analgésico não-AINE (anti-inflamatório não esteroide); os AINEs podem provocar broncoconstrição e induzir agudizações em doentes asmáticos. Assim, dispensei Ben-U-Ron[®] (paracetamol) 500 mg, comprimidos. Indiquei à utente que a filha poderia tomar 1 cp. de 8 em 8 h ou de 6 em 6 h, se necessário, não devendo ultrapassar a toma de 4 cps. por dia.⁹ Indiquei, também, que para ajudar a reduzir a dor, como medida não farmacológica adicional, a filha poderia experimentar aplicar calor, com um saco de água quente, sobre a região pélvica/abdominal.

5. Considerações Finais

O presente relatório tinha por principal objetivo apresentar uma reflexão crítica, sob a forma de uma análise SWOT, da minha experiência de estágio em farmácia comunitária, a qual decorreu, mais precisamente, na FSAJ. Fruto da reflexão apresentada, concluo que o balanço final do meu estágio, e de tudo aquilo que este me proporcionou, é bastante positivo.

Este período de estágio proporcionou-me um contacto ímpar com a farmácia comunitária e com esta vertente tão importante e visível da profissão, que é a de farmacêutico comunitário. Com a realização do estágio curricular em farmácia comunitária, não só adquiri

uma visão mais global da farmácia, da sua atividade e do seu importante papel no sistema de saúde, como também adquiri uma maior percepção da importância que o farmacêutico tem na promoção e educação para o uso racional dos medicamentos e para a saúde dos seus utentes, em particular, e dos cidadãos, de forma geral.

O estágio proporcionou-me, de igual modo, a possibilidade de aplicar e de consolidar os conhecimentos obtidos ao longo do MICF e de adquirir novos conhecimentos e competências; destaco competências sociais e de comunicação que, pela sua natureza, são difíceis de adquirir de outra forma que não em contexto real ou simulado de trabalho, e que tive a oportunidade de adquirir durante o estágio, devido ao grande contacto que tive com os utentes e com o atendimento ao público.

Posto isto, concluo que esta etapa do estágio curricular, a qual foi uma etapa de constante aprendizagem e desenvolvimento académico, profissional e pessoal, me dotou de ferramentas valiosas para, num futuro próximo, estar mais apta a exercer a profissão farmacêutica, atuando como especialista do medicamento e agente de saúde pública.

Referências Bibliográficas

1. EUROPEAN COMMISSION - Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro de 2013. Jornal Oficial da União Europeia. (2013).
2. SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE - Maio – Mês do Coração – SNS, atual. 2016. [Consult. 29 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/05/02/maio-mes-do-coracao/>
3. INFARMED I.P. - Medicamentos manipulados - INFARMED, I.P. [Consult. 29 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>
4. Sifarma [Consult. 30 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
5. INFARMED I.P. - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - Dulcolax 5 mg comprimido revestido [Consult. 2 set. 2021]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
6. Hyabak | Laboratoires Théa [Consult. 2 set. 2021]. Disponível em: <https://thea.pt/produtos/hyabak>
7. Olho seco | Laboratoires Théa [Consult. 2 set. 2021]. Disponível em: <https://thea.pt/patologias/olho-seco>
8. INSTITUTO PHARMACARE - Protocolo de Indicação Farmacêutica no Olho Seco. Farmácia Distribuição. 343 (2021).
9. INFARMED I.P. - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - ben-u-ron 500 mg comprimidos [Consult. 2 set. 2021]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

Anexos

Anexo A

Lista das tarefas e responsabilidades principais/mais frequentes ao longo do estágio na FSAJ.

- Receção e verificação de diversos tipos de encomendas (diárias, instantâneas, reforço, manuais, etc.), de diferentes fornecedores;
- Realização de encomendas (sobretudo, encomendas instantâneas e diárias);
- Armazenamento de medicamentos e de PSBE de acordo com as suas características e segundo a regra *FEFO* (do inglês, *first expired, first out*);
- Exposição e organização de produtos em lineares;
- Verificação periódica de discrepâncias entre *stock* físico e *stock* informático;
- Controlo mensal dos prazos de validade (PV) dos produtos em inventário;
- Dispensa de medicamentos, dispositivos médicos (DM) e PSBE:
 - Dispensa de diferentes tipos de medicamentos (medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), psicotrópicos e estupefacientes, medicamentos de uso veterinário (MUV), etc.);
 - Dispensa de preparações extemporâneas (p. ex. Cipamox[®] ou Clavamox DT[®]) após reconstituição das mesmas;
 - Dispensa de diferentes DM e PSBE (suplementos alimentares, produtos de dermofarmácia e cosméticos, etc.);
 - Dispensa mediante diferentes tipos de receita médica (receita eletrónica desmaterializada, receita eletrónica materializada e receita manual);
 - Dispensa de medicamentos hospitalares;
 - Transmissão ao utente, aquando da dispensa, e quando pertinente, de informação relativa à forma de administração/utilização, posologia e modo de conservação e armazenamento dos medicamentos, DM ou PSBE;
 - Avaliação, aquando da dispensa de medicamentos, DM e PSBE, da possibilidade de ocorrência de interações medicamentosas e/ou reações adversas;
 - Transmissão ao utente, quando pertinente, de possíveis medidas não farmacológicas a adotar;
- Fecho mensal do receituário e faturação às diferentes entidades;
- Medição PA e determinação de parâmetros bioquímicos (nomeadamente, glicémia e colesterol total).

Anexo B

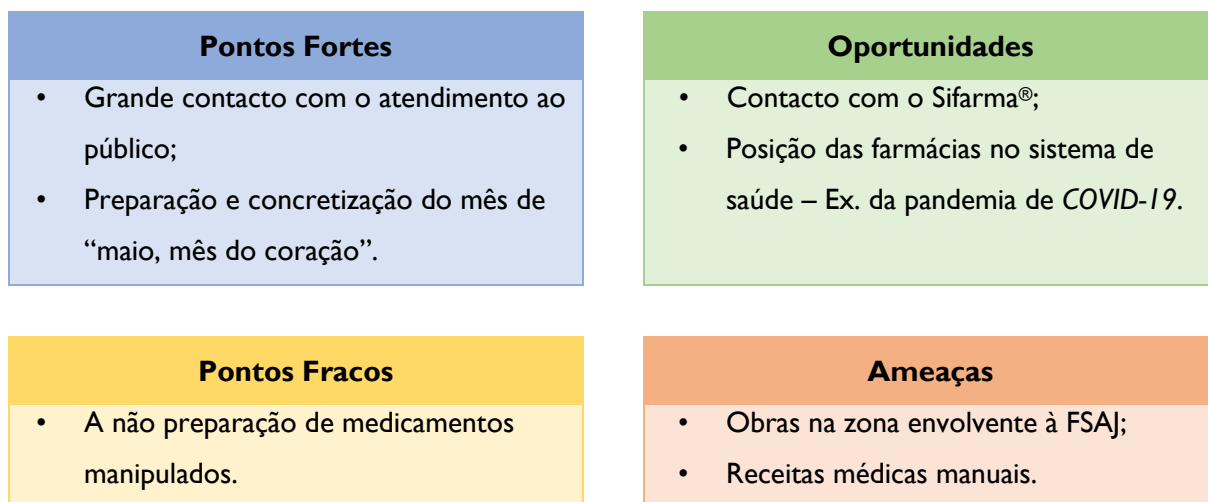


Figura 1. Representação esquemática da análise *SWOT* relativa ao Estágio em Farmácia Comunitária.

Abreviaturas: *COVID-19*: Coronavirus disease 2019; FSAJ: Farmácia Santa Ana Jardim.

Capítulo II: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Laboratórios Basi – Indústria Farmacêutica, S.A.

Lista de Abreviaturas

CQ: Controlo de qualidade

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

HPLC: high performance liquid chromatography

IJM: injectable manufacturing

LSM: liquid and semisolid manufacturing

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SOP: standard operating procedure

SWOT: Strengths (Forças), Weaknesses (Fraquezas), Opportunities (Oportunidades), Threats (Ameaças)

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) inclui no seu plano de estudos, no 2º semestre do 5º ano, a unidade curricular “estágio”. No âmbito desta unidade, e em cumprimento com a Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro 2013¹, é obrigatória a realização de um estágio em farmácia comunitária. Ademais, a FFUC dá, aos estudantes que estejam interessados, a possibilidade de realizar também um estágio numa outra área ligada ao medicamento, ao doente e à saúde pública.

Posto isto, o presente relatório diz respeito ao estágio por mim realizado nos Laboratórios Basi – Indústria Farmacêutica, S.A. (doravante designados apenas por Basi), de 11 de janeiro a 9 de abril de 2021, sob a supervisão da equipa de estudos de estabilidade, onde fui integrada, e sob a orientação da Dra. Cláudia Mota, responsável pela equipa. Optei por realizar parte do estágio curricular em indústria farmacêutica, não só porque, ao longo do curso, esta área sempre me despertou particular interesse, mas também por considerar que um primeiro contacto com a área ainda nesta etapa seria um fator diferenciador na minha formação académica.

O relatório compreende fundamentalmente duas partes. Numa primeira parte, é feita uma breve contextualização do espaço físico e da equipa onde fui integrada durante o estágio, das suas tarefas e responsabilidades, bem como das tarefas e responsabilidades nas quais eu própria tive oportunidade de participar enquanto estagiária. Em seguida, o relatório toma a forma de uma análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Assim, é feita uma reflexão crítica do estágio, apresentando e discutindo as suas forças, fraquezas, oportunidades e ameaças.

2. Estágio na equipa de estudos de estabilidade

O estágio por mim realizado nos Basi decorreu no laboratório de controlo de qualidade (CQ), que se encontra organizado em diferentes grupos de trabalho e equipas^A. Após uma primeira semana de carácter formativo, durante a qual assisti a diferentes sessões de formação e pude ler vários SOPs (do inglês, *standard operating procedures*), fui integrada na equipa de estudos de estabilidade do laboratório.

^A Anexo A: Figura 1. Organograma dos Laboratórios Basi, com destaque para os grupos de trabalho e equipas do CQ.

A equipa de estudos de estabilidade é responsável pela elaboração de estudos de estabilidade de acordo com as *guidelines* respetivas, bem como pela elaboração de protocolos e planos mensais de estabilidade. É responsável pela subsequente concretização laboratorial dos mesmos, pela análise dos resultados obtidos e, ainda, pela elaboração de tabelas e relatórios de estabilidade. Importa referir que o objetivo dos estudos de estabilidade é avaliar o impacto de fatores ambientais, como a temperatura e humidade, nas propriedades físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas do medicamento, ao longo do tempo. A informação obtida a partir deste tipo de estudos permite compreender de que forma os referidos fatores podem afetar a qualidade, eficácia e segurança do produto. Permite, também, estabelecer o prazo de validade e as condições de armazenamento e conservação.² Assim, os estudos de estabilidade (e, por conseguinte, a equipa que os concretiza) revestem-se de grande importância.

Ao integrar a equipa de estudos de estabilidade, tive a oportunidade de acompanhar e de participar na realização das suas tarefas diárias, nomeadamente tarefas laboratoriais. Realizei inúmeros ensaios, necessários para a concretização dos estudos de estabilidade de diversos medicamentos, sob diversas formas farmacêuticas – tais como, xaropes, soluções e suspensões orais, soluções cutâneas, geles, cremes, pomadas e enemas (*LSM, liquid and semisolid manufacturing*); injetáveis de pequeno e de grande volume (*IJM, injectable manufacturing*). Os ensaios variam, precisamente, consoante o produto e forma farmacêutica. A título de exemplo, em seguida, refiro alguns dos ensaios que tive oportunidade de realizar ao longo do estágio – ensaios de identificação, controlo de características organolépticas (como aparência, cor, odor e textura), pH, densidade, viscosidade, doseamento de substância ativa, etc.

3. Análise SWOT

A análise *SWOT*^B que se segue visa apresentar e discutir os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que senti e identifiquei ao longo do estágio. Os pontos fortes e os pontos fracos dizem respeito a aspetos vantajosos e menos vantajosos do estágio, respetivamente. Por sua vez, as oportunidades e ameaças correspondem a fatores que, de certo modo, não estando diretamente relacionados com o estágio, o afetaram de forma positiva ou negativa e que, por isso, não devem ser ignorados.

^B Anexo B: Figura 2. Representação esquemática da análise *SWOT* relativa ao estágio em indústria farmacêutica.

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Integração na equipa de estudos de estabilidade

A equipa de estudos de estabilidade, na qual decorreu o meu estágio no laboratório de CQ dos Basi, é uma equipa na qual são evidentes uma boa disposição e um grande sentido de companheirismo e entreaajuda. Estes, e a forma como, desde o primeiro dia, fui bem acolhida, foram fatores fundamentais para que rapidamente me sentisse totalmente integrada na equipa e, diria até, na empresa. Em retrospectiva, penso que esta boa integração permitiu que me sentisse mais à vontade para colocar dúvidas e questões; dúvidas e questões essas às quais as analistas da equipa, dentro da sua disponibilidade, sempre se mostraram prontas a responder, devo acrescentar. Dito isto, por considerar que a forma como fui integrada na equipa de estudos de estabilidade contribuiu para tornar a minha experiência de estágio mais agradável e proveitosa, inclusive a nível formativo, saliento-a com um dos pontos fortes.

3.1.2. Elevada execução laboratorial

O MICF da FFUC tem uma forte componente prática e, por conseguinte, proporciona aos seus estudantes capacidades e competências laboratoriais importantes e variadas, conforme, aliás, irei elaborar mais à frente, na secção 3.3. Oportunidades. Não obstante, sinto que a execução diária e, praticamente, exclusiva de tarefas de laboratório, ao longo do estágio, me permitiu, não só consolidar e expandir os conhecimentos e competências adquiridos no curso, mas também desenvolver, de forma excecional, novas competências técnicas e prático-laboratoriais. Mais acrescento: após o meu estágio nos Basi, sinto que, se a minha futura atividade profissional o exigir, estarei mais apta a realizar, de forma eficaz e eficiente, atividades laboratoriais. Pelos motivos anteriormente referidos, destaco, então, a elevada execução laboratorial do estágio como um dos pontos fortes do mesmo.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Ausência de um plano de estágio e fluxo de trabalho irregular

Considero que um dos pontos fracos do meu estágio nos Basi foi a inexistência de um plano que delineasse as várias tarefas a executar ao longo do mesmo. Na minha perspetiva, um plano estruturado de atividades poderia ter ajudado a colmatar o fluxo de trabalho irregular que caracterizou o período de estágio. Se, por um lado, houve dias bastante preenchidos, em que me foram atribuídas várias tarefas, por outro lado, houve também dias de estágio caracterizados pela existência de vários “tempos mortos”, o que, de igual modo, considero ter sido um ponto fraco. Durante os “tempos mortos” criados devido ao fluxo

irregular de trabalho, senti que não estava a ser retirado o máximo partido do meu estágio na equipa de estudos de estabilidade, nem por mim, nem por parte da empresa.

3.2.2. Impossibilidade de contactar com a HPLC

A HPLC (do inglês, *high performance liquid chromatography*) é uma técnica analítica rotineiramente utilizada no CQ na indústria farmacêutica, dada a sua grande versatilidade e precisão. Durante o meu período de estágio, em razão da excessiva carga de trabalho do(s) analista(s) da equipa de estudos de estabilidade alocados especificamente à HPLC, foram poucas as ocasiões em que tive oportunidade de os acompanhar. Além disso, quando o fiz, estive envolvida, sobretudo, na preparação de solventes e no preenchimento informático de tabelas de estabilidade; estive, portanto, pouco em contacto com a HPLC propriamente dita.

Ao longo do MICF, apesar de nos ser dada a oportunidade de contactar com este tipo de cromatografia, esse contacto é mínimo também. Por esse motivo, considero que a possibilidade de me familiarizar com o equipamento e técnica subjacentes à HPLC no estágio seria uma mais-valia. A meu ver, tal contribuiria para tornar a minha formação académica mais ampla e robusta. Em contrapartida, considero que o facto dessa possibilidade não se ter verificado foi um dos pontos fracos do estágio.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Competências laboratoriais proporcionadas pelo MICF

O MICF da FFUC contempla, no seu plano de estudos, várias unidades curriculares cuja forte componente prática permite dotar os estudantes de capacidades e competências laboratoriais importantes e variadas. No decorrer do meu estágio nos Basi, pude constatar que a “bagagem” prático-laboratorial conferida por unidades curriculares do curso – das quais destaco as unidades de química analítica, química orgânica, química farmacêutica, métodos instrumentais de análise e tecnologia farmacêutica – é adequada ao exercício de funções num laboratório de CQ em indústria farmacêutica. A sua adequação refletiu-se positivamente no meu dia-a-dia enquanto estagiária e permitiu-me executar, sem grandes dificuldades, as tarefas laboratoriais que me eram atribuídas. Assim sendo, vejo as capacidades e competências laboratoriais conferidas pelo MICF como uma oportunidade, não só para a realização deste estágio em concreto, mas também numa perspetiva profissional futura.

3.3.2. Contacto com outras equipas e secções do laboratório de CQ

Não obstante o que foi anteriormente dito, na subsecção 3.2.1., devo admitir que a existência de “tempos mortos” no meu estágio na equipa de estudos de estabilidade acabou

por possibilitar o meu contacto com outras equipas e secções. Por mais do que uma vez, fui chamada a colaborar com a equipa das matérias-primas e com a equipa dos produtos de *IJM* na realização de vários ensaios. Pude, também, ao longo do estágio, contactar com o trabalho das secções de higienização e limpeza e de receção de amostra do laboratório de CQ. Ainda que estas secções não estejam diretamente envolvidas nos procedimentos de análise de CQ dos produtos, o seu trabalho é fundamental para o normal funcionamento do laboratório e, por isso, não deve ser subvalorizado.

O contacto com as equipas e secções de trabalho supramencionadas não estava inicialmente previsto no meu estágio. Todavia, na minha opinião, foi bastante vantajoso, proporcionando-me a oportunidade de adquirir uma perspetiva mais holística do laboratório de CQ dos Basi, em particular, e da indústria farmacêutica, de uma forma geral.

3.4. Ameaças

3.4.1. Entrada de uma nova colaboradora na equipa de estudos de estabilidade

Aquando da minha inserção na equipa de estudos de estabilidade, no final da primeira semana de estágio, entrou, também, para a equipa uma nova colaboradora. Após reflexão, considero que a sua entrada acabou por condicionar de forma negativa o meu estágio, sobretudo numa fase inicial, pelos motivos que abaixo refiro; assim, destaco-a como uma ameaça.

Após a entrada da nova colaboradora, a sua formação e qualificação eram prioritárias, por forma a que ficasse apta a desempenhar as suas funções enquanto analista o mais rapidamente possível. Isto fez com que os restantes membros da equipa de estudos de estabilidade, os quais ficaram responsáveis pela formação e qualificação, tivessem menor disponibilidade para acompanhar o meu estágio na fase inicial do mesmo. Uma vez que ainda não me tinha sido possível desenvolver qualquer autonomia no laboratório, com a entrada da nova colaboradora, surgiram vários “tempos mortos” no estágio. Além do mais, sinto que o desenvolvimento da autonomia anteriormente referida também foi mais difícil e demorado.

4. Considerações Finais

O presente relatório tinha por principal objetivo apresentar uma reflexão crítica, sob a forma de uma análise *SWOT*, da minha experiência de estágio em indústria farmacêutica, mais precisamente, na equipa de estudos de estabilidade do laboratório de CQ dos Basi. Fruto da reflexão apresentada, faço um balanço final positivo da experiência e de tudo aquilo que me proporcionou.

Em primeiro lugar, o estágio nos Basi deu-me a possibilidade de contactar com a área da indústria farmacêutica ainda enquanto estudante e constitui, por isso, um fator diferenciador na minha formação académica. Na minha opinião, o facto desse contacto ter ocorrido no laboratório de CQ da empresa foi uma mais-valia; porque, sendo o CQ um setor transversal a toda a atividade da mesma, o estágio proporcionou-me uma visão mais holística da indústria.

Além do mais, o estágio nos Basi permitiu-me consolidar e expandir competências e conhecimentos adquiridos no MICE. Permitiu-me, de igual modo, desenvolver novas competências técnicas, prático-laboratoriais e outras, às quais hoje se chama vulgarmente *soft skills*, como a capacidade de organização, o trabalho em equipa ou a flexibilidade, por exemplo. Considero, portanto, que o estágio representou uma excelente oportunidade de desenvolvimento, não só a nível formativo e profissional, como também a nível pessoal.

Em conclusão, levo do meu tempo enquanto estagiária nos Basi uma experiência bastante gratificante, que certamente será uma mais-valia para a minha vida futura, nomeadamente para a sua vertente profissional, seja ela desenvolvida na área da indústria farmacêutica ou não.

Referências Bibliográficas

1. EUROPEAN COMMISSION - Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro de 2013. Jornal Oficial da União Europeia. (2013).
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms (Annex 5). World Health Organization Technical Report Series. 863:863 (1996) 65–80.
3. LABORATÓRIOS BASI - INDÚSTRIA FARMACÊUTICA S.A. - Relatório e Contas 2020. Mortágua [Consult. 16 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.basi.pt/wp-content/uploads/2021/02/2020.pdf>

Anexo A

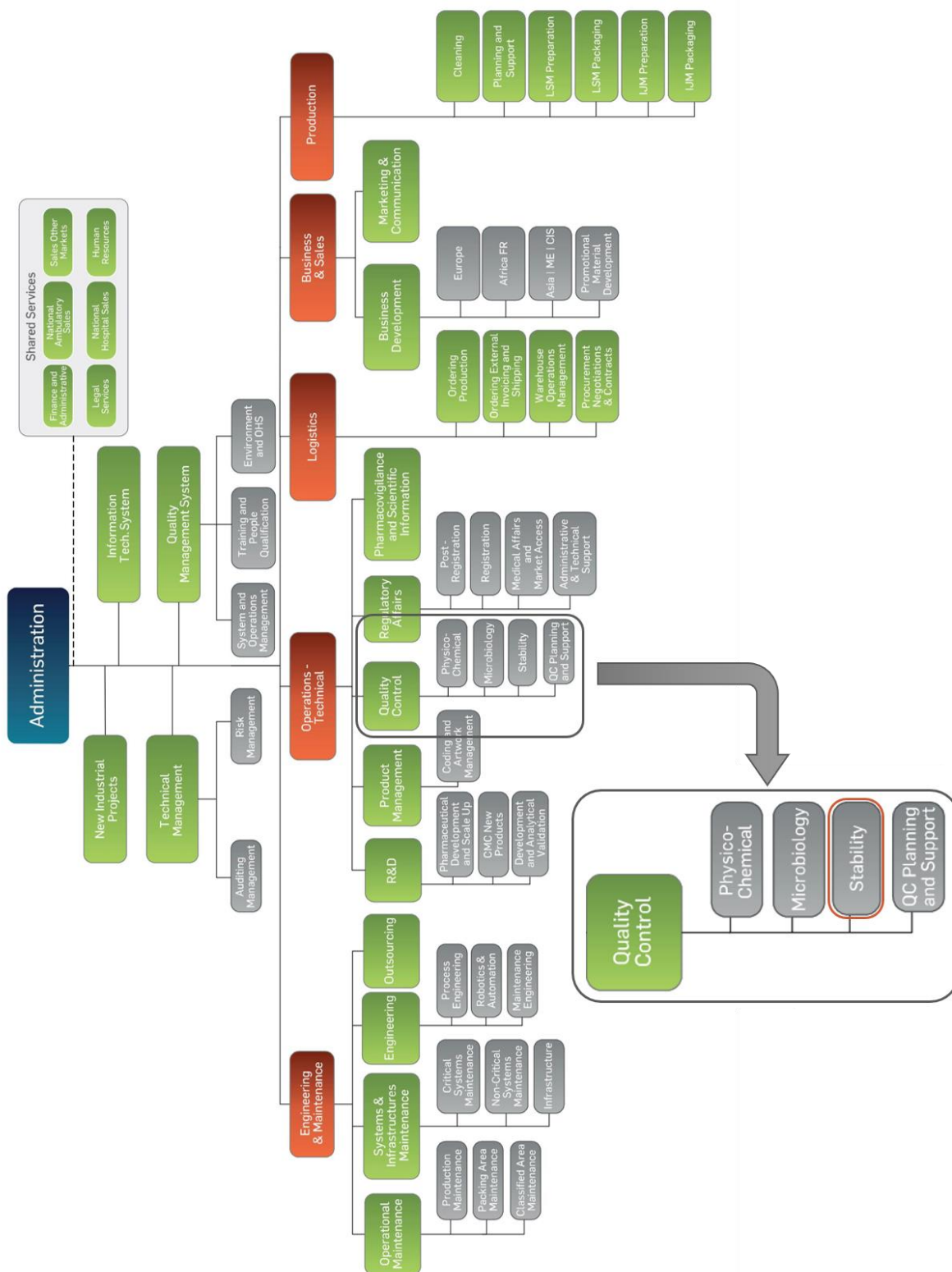


Figura I. Organograma dos Laboratórios Basi, com destaque para os grupos de trabalho e equipas do CQ. Adaptado de ³.
Abreviaturas: CQ: Controlo de qualidade.

Anexo B

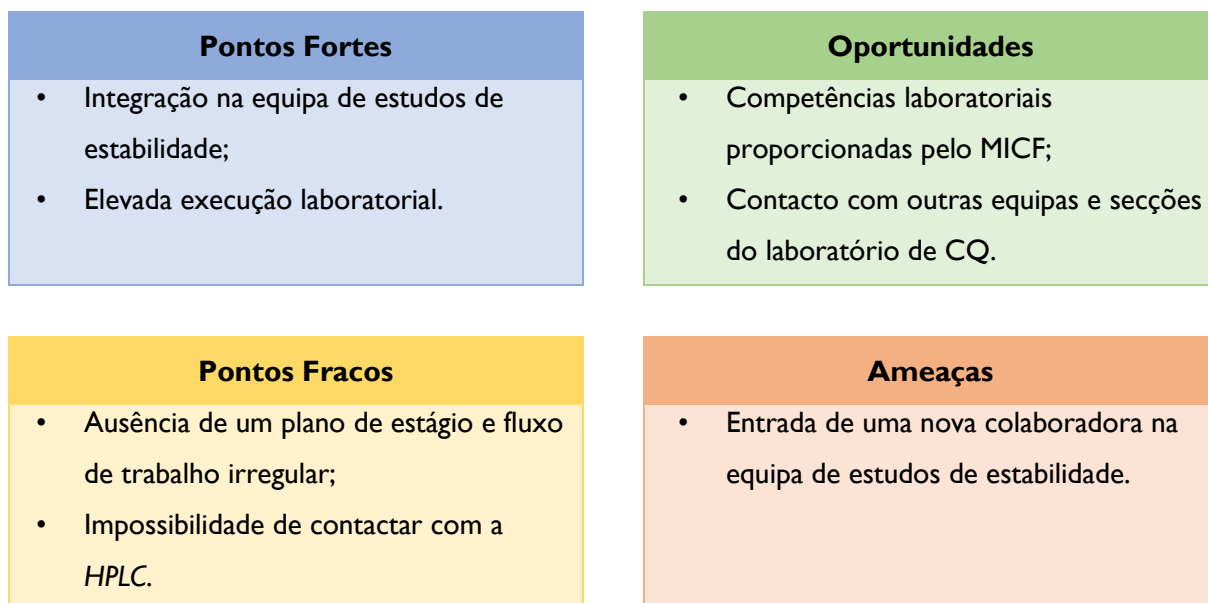


Figura 2. Representação esquemática da análise SWOT relativa ao Estágio em Indústria Farmacêutica.
Abreviaturas: CQ: Controlo de qualidade; *HPLC*: *high performance liquid chromatography*; MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Capítulo III: Monografía

*“Oral delivery of siRNA-containing lipid-based nanocarriers:
challenges and recent advances”*

Abstract

The successful oral delivery of small interfering RNA (siRNA)-based drugs would undoubtedly be an important milestone in therapeutics. However, although not impossible, achieving it has proven to be especially difficult. The development of nonviral delivery nanocarrier formulations for oral delivery applications of siRNA-based drugs is challenged by characteristics of the gastrointestinal tract (GIT). In view of these characteristics, lipidic materials, for instance, show an inherent instability in the gut. Therefore, despite the fact that lipid-based nanocarriers are generally considered the most widely used and clinically advanced nonviral formulation strategies for the delivery of siRNAs, their use for the oral delivery of these molecules has been limited. Nonetheless, in recent years, some studies have exploited novel strategies and approaches which can fit this category of nanocarriers to reach this purpose. In this monograph, some of those studies, together with their promises and limitations, will be discussed. Although, in this context, a solid body of data is still lacking, the existing preclinical results seem interesting. Moreover, the strategies and approaches reported may have the potential to help overcome some of the limitations common to other existing synthetic lipid-based nanocarriers.

Keywords: RNAi; siRNAs; oral delivery; nonviral delivery nanocarrier systems; lipid-based nanocarrier systems.

Resumo

A bem-sucedida administração por via oral de medicamentos à base de pequenas moléculas de RNA de interferência (*siRNAs*, do inglês *small interfering RNAs*) seria, sem dúvida, um marco importante na área da terapêutica. Contudo, apesar de não ser impossível, esta tarefa tem demonstrado ser particularmente difícil. As características do trato gastrointestinal (TGI) dificultam o desenvolvimento de formulações não-virais de nanocarregadores de entrega, por via oral, de medicamentos à base de *siRNAs*. Materiais lipídicos, por exemplo, são inerentemente instáveis no TGI. Por esse motivo, apesar dos nanocarregadores à base de lípidos constituírem, no geral, as estratégias de formulação não-virais mais comuns e clinicamente mais avançadas para a administração de *siRNAs*, para a via oral o seu uso tem sido limitado. No entanto, recentemente, alguns estudos com vista à administração via oral de *siRNAs* têm explorado novas estratégias e abordagens que se podem enquadrar nesta categoria de nanocarregadores. Nesta monografia, são discutidos alguns desses estudos, bem como o seu potencial e limitações. Embora, neste contexto, os dados existentes ainda sejam escassos, os resultados pré-clínicos obtidos parecem interessantes. Além do mais, as estratégias e abordagens em questão tem potencial para ajudar a ultrapassar algumas das limitações de outros nanocarregadores sintéticos à base de lípidos existentes.

Palavras-chave: RNAi; *siRNAs*; administração oral; sistemas nanocarregadores não-virais de entrega; sistemas nanocarregadores à base de lípidos.

Abbreviations

Ago2: argonaute 2

CD: Crohn's disease

DMAPAP: 2-{3-[bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecylcarbamoyl methyl-acetamide

Dmt1: divalent metal-ion transporter 1

DOPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DOTAP: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane

DSPC: distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine

DSPE-PEG(2000)-azide: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[azido(polyethylene glycol)-2000]

dsRNA: double-stranded RNA

EMA: European Medicines Agency

FA: folic acid

FDA: U.S. Food and Drugs Administration

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GDLV: ginger-derived lipid vehicle/vector

GDNP: ginger derived-nanoparticle

GDNV: ginger derived-nanovector

GeRPs: β 1,3-D-glucan-encapsulated siRNA particles

GFP: green fluorescent protein

GIT: gastrointestinal tract

hATTR: hereditary transthyretin-mediated

IBD: inflammatory bowel disease

IEC: intestinal epithelial cell

IV: intravenous

LNP: lipid nanoparticle

mExo: milk exosome

miRNA: microRNA

MLN: mesenteric lymph node

mRNA: messenger RNA

ncRNA: non-coding RNA

NP: nanoparticle

nt: nucleotide

p: phosphate

PDNP: plant-derived edible nanoparticle

PEG: polyethylene glycol

PEI: polyethylenimine

PPADT: poly-(1,4-phenyleneacetone dimethylene thioketal)

RISC: RNA-induced silencing complex

RNAi: RNA interference

RNAse: ribonuclease

ROS: reactive oxygen species

SC: subcutaneous

siRNA: small interfering RNA

TJ: tight junction

TKNs: thioketal nanoparticles

TNF: tumor necrosis factor

TTR: transthyretin

UC: ulcerative colitis

I. Introduction

RNA interference (RNAi) is a cellular process of gene silencing which occurs at the post-transcriptional level, with specific messenger RNAs (mRNAs) being targeted by complementary RNA molecules for enzymatic degradation.^{1;2;3} Since the discovery of RNAi⁴ and the subsequent demonstration that exogenous, chemically synthesized small interfering RNAs (siRNAs) could act as mediators of this process when delivered into the cytoplasm of cells^{5;6}, a lot of efforts have been made to exploit these RNA molecules for therapeutic purposes.⁷

Due to unfavorable physicochemical characteristics, however, siRNAs have very low membrane permeability and their intracellular delivery has proven challenging.^{7;8} In fact, it has been the most prominent challenge to the development and clinical application of siRNA-based drugs.⁹ Therefore, the development of siRNA-based drugs has been strongly dependent on the development of formulation strategies that make use of delivery carrier systems. Viral and nonviral carriers can be employed for the delivery of siRNAs. Among nonviral carriers, nanocarriers in particular have been extensively investigated and used.^{10;11;12;13} In this monograph, focus is placed primarily on this type of systems.

To date, the number of nonviral delivery nanocarriers developed for oral delivery applications of siRNA-based drugs remains scarce when compared to the number of those developed for other routes, notably for parenteral routes. This can possibly be explained by the additional barriers imposed on delivery by characteristics of the gastrointestinal tract (GIT). For instance, the low pH in the stomach, the abundance of enzymes, the mucus layer and the very own design of the intestinal epithelium are all characteristics that seriously limit the bioavailability of siRNA-based drugs delivered orally.^{3;8;14} Nonetheless, achieving successful oral delivery for siRNAs would undoubtedly be an important milestone and would revolutionize treatments by giving patients powerful therapeutics in a convenient and accessible way.¹⁵

Whereas, in general, lipid-based nanocarrier systems can be considered the most widely used and clinically advanced nonviral formulation strategies for the delivery of siRNAs^{16;17;18}, for the oral route in particular, they have found limited applicability in past years, as a direct consequence of the inherent instability of lipidic materials in the gut.¹⁹ But, interest in using lipid-based nanocarrier systems in the oral delivery of siRNA-based drugs seems to be renewed and progressively growing, since recently new strategies and approaches were reported in studies in this field of research. While there are several reviews on the existing

nonviral nanocarrier strategies for the oral delivery of siRNAs^{8;16;20;21}, few, even among the most recent, discuss the previously mentioned reports.

This monograph aims at discussing some of the recently published studies in the field of lipid-based nanocarrier systems in the oral delivery of siRNA-based drugs.

To this aim, first, in order to provide some context, a brief description of the structural characteristics of siRNAs and of their mechanism as mediators of RNAi is presented. Furthermore, after summarizing the promise of siRNA-based drugs, barriers to their development and clinical application, as well as possible strategies to circumvent them, are also presented. Then, an overview of the obstacles encountered in oral administration and of the advantages of the oral route is provided. Finally, attention is placed on lipid-based nanocarriers for the oral delivery of siRNAs; recently published studies in the literature are reviewed. At last, identified limitations and opportunities for future work related with the described studies and approaches are also discussed.

2. siRNA-based drugs

2.1. Structural characteristics of siRNAs and basic mechanism as mediators of the RNAi gene silencing process

RNAi is a cellular process of gene silencing which occurs at the post-transcriptional level with the degradation of specific mRNA molecules.^{1;2} This process, widespread and conserved across a large number of organisms¹³, can be mediated by different species of non-coding (nc) double-stranded (ds) RNAs in a homology-dependent fashion.^{1;22} In mammalian cells, siRNAs are some of its most important effectors¹³; moreover, in mammalian cells, RNAi can be induced by exogenous, chemically synthesized siRNAs.^{5;6}

siRNAs are dsRNA molecules of approx. 21 – 23 nucleotides (nt), with 5' phosphate groups and characteristic 2-nt overhangs at the 3' end of each strand.^{13;22} (Figure 1.)

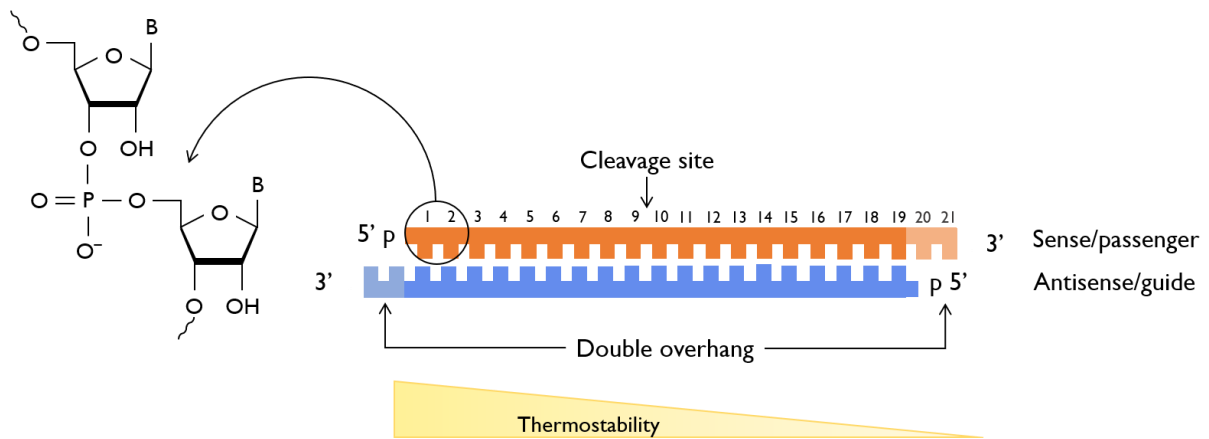


Figure 1. Schematic representation of the structure of siRNAs. Adapted from ¹³.
Abbreviations: p: phosphate; siRNA: small interfering RNA.

In the natural endogenous pathway of RNAi, siRNAs are obtained from the cleavage of longer dsRNA precursors by a cytoplasmic enzyme, member of the ribonuclease (RNase) III family, named Dicer.²³ These siRNAs are then loaded into the RNA-induced silencing complex (RISC). Exogenous synthetic siRNAs, on the other hand, enter the RNAi pathway downstream of Dicer and directly bind to this multiprotein complex.^{13;24} (Figure 2.) The RISC is initially inactive; its activation happens upon recognition and degradation of the sense strand of the siRNA. This process is mediated by the endonuclease Argonaute 2 (Ago2), one of the RISC proteins, and is based on thermodynamic differences between the two ends of the duplex. Subsequently, the antisense strand, which remains incorporated into the now activated RISC, acts as a guide, directing it towards mRNA molecules with a nucleotide sequence fully complementary to its own.^{1;5;9;25} Ago2 then cleaves the target mRNA between nucleotides 10 and 11 relative to the 5' end of the guide strand.²³ Target mRNA degradation leads to a decrease in its translation, and therefore, the production of the protein it encodes is inhibited; as a result, there is a silencing effect in the expression of the corresponding gene.^{1;2;21} Finally, the activated RISC can be recycled, to bind and destroy additional target mRNA molecules, thus prolonging the gene silencing effect.^{5;9}

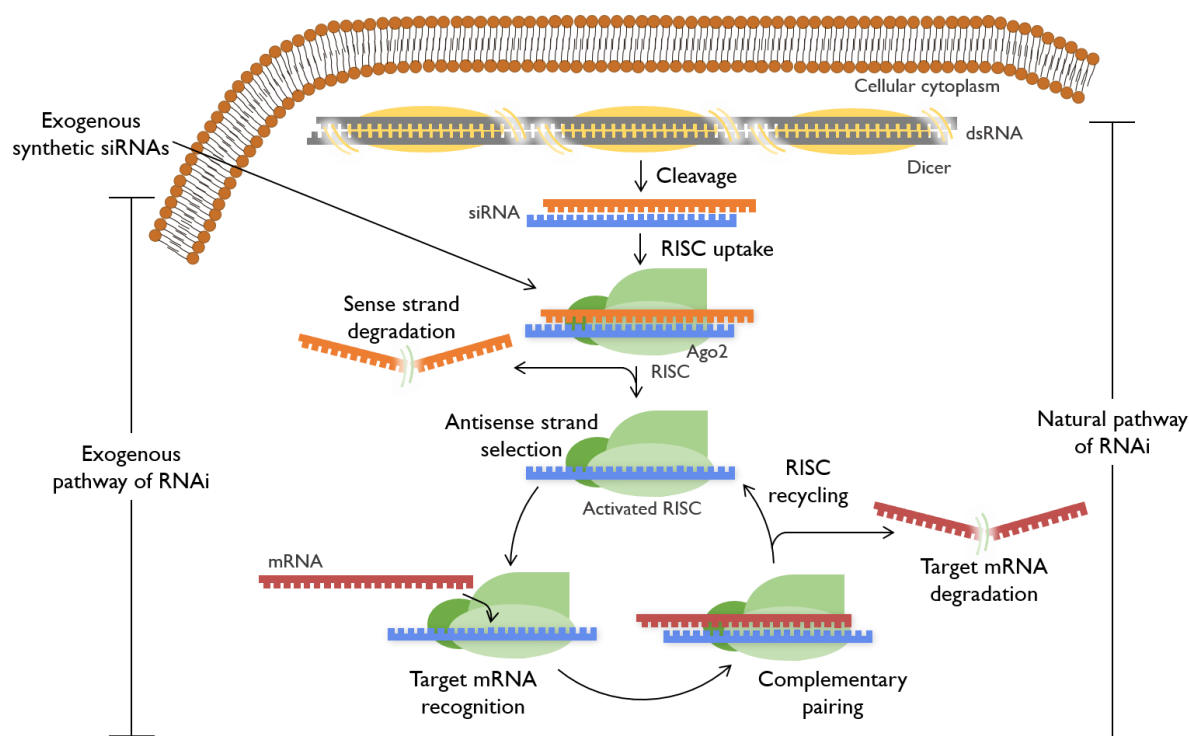


Figure 2. RNAi gene silencing process mediated by siRNAs. Adapted from ^{5,9}.

Abbreviations: Ago2: Argonaute 2; dsRNA: double-stranded RNA; mRNA: messenger RNA; RISC: RNA-induced silencing complex; RNAi: RNA interference; siRNA: small interfering RNA.

2.2. Therapeutic potential of siRNA-based drugs and barriers to their widespread clinical application

Following the discovery of RNAi, in 1998,⁴ and later, in 2001, the first report of the ability of exogenous synthetically produced siRNAs to mediate this gene silencing process in mammalian cells⁶, the scientific community was quick to realize the tremendous potential of these molecules in therapeutics.² Indeed, siRNAs can, in theory, be designed to silence any gene in the body.⁵ Therefore, diseases such as cancers, autoimmune diseases and genetic disorders, for example, are amenable to be treated by siRNA-based drugs.²³ Moreover, after knowing the sequence of the corresponding target mRNA, siRNAs can be designed in a rational and rapid manner, making their manufacture relatively easy.⁵

However, despite all their potential, and contrary to what the initially high expectations they sparked may have led to believe, siRNA-based drugs are not yet a widespread reality. As a matter of fact, only recently they are starting to be approved by regulatory agencies and used in the clinical setting.²⁶ (Table I.)

Table I. Overview of the approved siRNA-based drugs. Adapted from ²⁶.

Drug	Brand name	Company	Therapeutic indication	Agency/year	Ref
Patisiran	Onpattro®	Alnylam	hATTR amyloidosis	FDA/2018 EMA/2018	27;28 29
Givosiran	Givlaari®	Alnylam	Acute hepatic porphyria	FDA/2019 EMA/2020	30;31 32
Lumasiran	Oxlumo®	Alnylam	Primary hyperoxaluria type I	FDA/2020 EMA/2020	33 34
Inclisiran	Leqvio®	Novartis	Hypercholesterolaemia or mixed dyslipidaemia	EMA/2020	35

Abbreviations: EMA: European Medicines Agency; FDA: U.S. Food and Drugs Administration; hATTR: hereditary transthyretin-mediated; siRNA: small interference RNA.

Several barriers have held back the development of siRNA-based drugs. Among those are off-target effects, stimulation of immune and inflammatory pathways^{5;9;13} and the intrinsic instability of siRNAs *in vivo*, upon both enteral and parenteral administration.¹⁹ For instance, upon parenteral administration by the intravenous (IV) route, siRNAs are rapidly cleared from the bloodstream, not only because of their rapid renal excretion, but also because of their high susceptibility to degradation, particularly by nucleases.^{5;9} Though not the focus of this monograph, it is worth mentioning that a variety of chemical modifications has been investigated and used in siRNA molecules in order to try and alleviate the abovementioned obstacles.^{13;19;22}

The most prominent obstacle to the development of siRNA-based drugs and their widespread clinical application, however, has undoubtedly been the intracellular delivery of these molecules.⁹ As previously described, siRNAs exert their mechanism of action in the cytoplasm of cells, where they are recognized by the RNAi machinery. But, thanks to their relatively large molecular weight (approx. 13 kDa) and their hydrophilic and polyanionic nature (approx. 40 negative charges due to the phosphate backbone), siRNAs have very low membrane permeability. They are basically incapable of crossing the cellular membrane, into the cytoplasm, on their own and need assistance in the process.^{1;2;8}

2.2.1. The main strategy to overcome the delivery challenges of siRNAs: carrier systems

Viral and nonviral carriers can be used for the delivery of siRNAs, and nucleic acids in general. Viral approaches are more efficient in terms of transfection, but their inherent risk of immunogenic reactions and oncogenicity plagues their real clinical utility.^{10;11} Nonviral carriers,

on the other hand, although not completely exempt from toxicity either, raise less safety concerns, and thus have been used in alternative. Nanocarrier systems in particular, such as, for example, liposomes, lipid nanoparticles (LNPs) or polymeric nanoparticles (NPs), have been pivotal approaches to overcome the challenges associated with the delivery of these therapeutic molecules.^{12;13;36}

Nanocarriers not only can facilitate and even promote the cellular uptake of siRNAs, but since they physically protect their payloads by complexation/encapsulation, they can also reduce their premature degradation, and reduce toxicity compared to free siRNA molecules. Moreover, depending on their chemical composition and surface modification with specific ligands, nanocarriers can enable controlled release and targeted delivery. In other words, nanocarriers can help increase the stability of siRNAs and confer a certain degree of specificity to their delivery, reducing toxicity and improving the pharmacokinetic profile.^{2;14;37;38;39;40}

Concerning cellular uptake, siRNA-containing nanocarriers are usually internalized via endocytosis. The resulting endocytic vesicles can, however, 1) be recycled back to the membrane and ejected to the lumen; or 2) be transferred to lysosomes for degradation.^{8;16;22} In both cases, siRNA loading onto the RISC is prevented and, consequently, the desired therapeutic effect is reduced or even abolished. Therefore, in addition to the abilities and functions mentioned in the previous paragraph, it is important that nanocarrier systems can help evade the endo-lysosomal pathway as well. Their chemical composition is the factor that most strongly influences their ability to aid in endosomal escape and cytoplasmic release. For this reason, lipid-based nanocarriers, for example, are usually specially designed, with lipids being carefully selected in order to enhance this function and, as such, further increase the overall effectiveness of siRNA-based drugs.^{12;38;41}

3. Oral delivery of siRNA-based drugs

To date, most efforts to develop siRNAs as therapeutic agents have focused on parenteral administration or on site-specific delivery, either way being strongly dependent on the use of injectable formulations. IV injections have been the main approach used for the delivery of siRNA-based drugs, but injectable formulations have also been exploited for other administration routes, such as the subcutaneous (SC) or intravitreal route.^{8;15}

Conversely, oral delivery of siRNA-based drugs is lagging behind.¹⁹ It is true that, in the past decade, there has been an increasing interest in using oral administration and GIT for the delivery of siRNAs.^{19;20} Nonetheless, the progress made in this area, though undeniable, is still

comparatively minor. Indeed, to date, delivery of siRNA-based drugs through oral administration has been limited to preclinical research.^{8;10;16} And the number of delivery carrier systems developed for this purpose remains scarce when compared to the number of those developed for other routes of delivery, notably for parenteral routes.

This relative lack of progress is mainly explained by the fact that, in addition to the barriers described in the previous section, which hamper their intracellular delivery, siRNAs administered by the oral route, as well as their delivery carriers, must overcome several other challenges, posed by characteristics of the GIT itself.^{3;8;16}

The present section aims at discussing the obstacles encountered by siRNA-based drug formulations following oral administration (Figure 3.). These obstacles, faced by siRNAs, but also by therapeutic nucleic acids in general, have already been thoroughly addressed in reference review papers^{8;16;20} and, for that reason, will only be discussed briefly here; for a more detailed discussion the reader is referred to those reviews. Additionally, in this section, positive aspects of the oral route will also be presented, so as to prove that, despite all the challenges associated with the GIT, oral delivery of siRNAs is not totally inaccessible and even encompasses advantages.¹⁶

3.1. Obstacles to the oral delivery of siRNA-based drug formulations

When siRNA-based drugs are delivered via oral administration, the first major challenge is their passage through the stomach. Exposed to the harsh acidic environment of this organ, where pH values can be as low as 1.5, siRNAs can suffer denaturation and depurination, which negatively impacts their efficiency as therapeutic agents. Additionally, pepsin in the stomach can affect the stability of delivery carrier systems and can contribute to the enzymatic degradation of the loaded therapeutic siRNAs.^{8;14;19;20}

Oral formulations then proceed to the intestines, where enzymatic activity is also present and enzymes such as trypsin, amylases, lipases, proteases and nucleases can further amplify the abovementioned problems. pH, on the other hand, is not as extreme as in the stomach; in the intestinal lumen, pH is higher, ranging from about 5.0 – 8.0. Since pH values across the intestines are variable, and also significantly different from those observed in the stomach, stability over a wide pH range is an important point to consider when thinking about the oral delivery of siRNAs and the development of delivery carrier systems for that purpose.^{8;19;20;37}

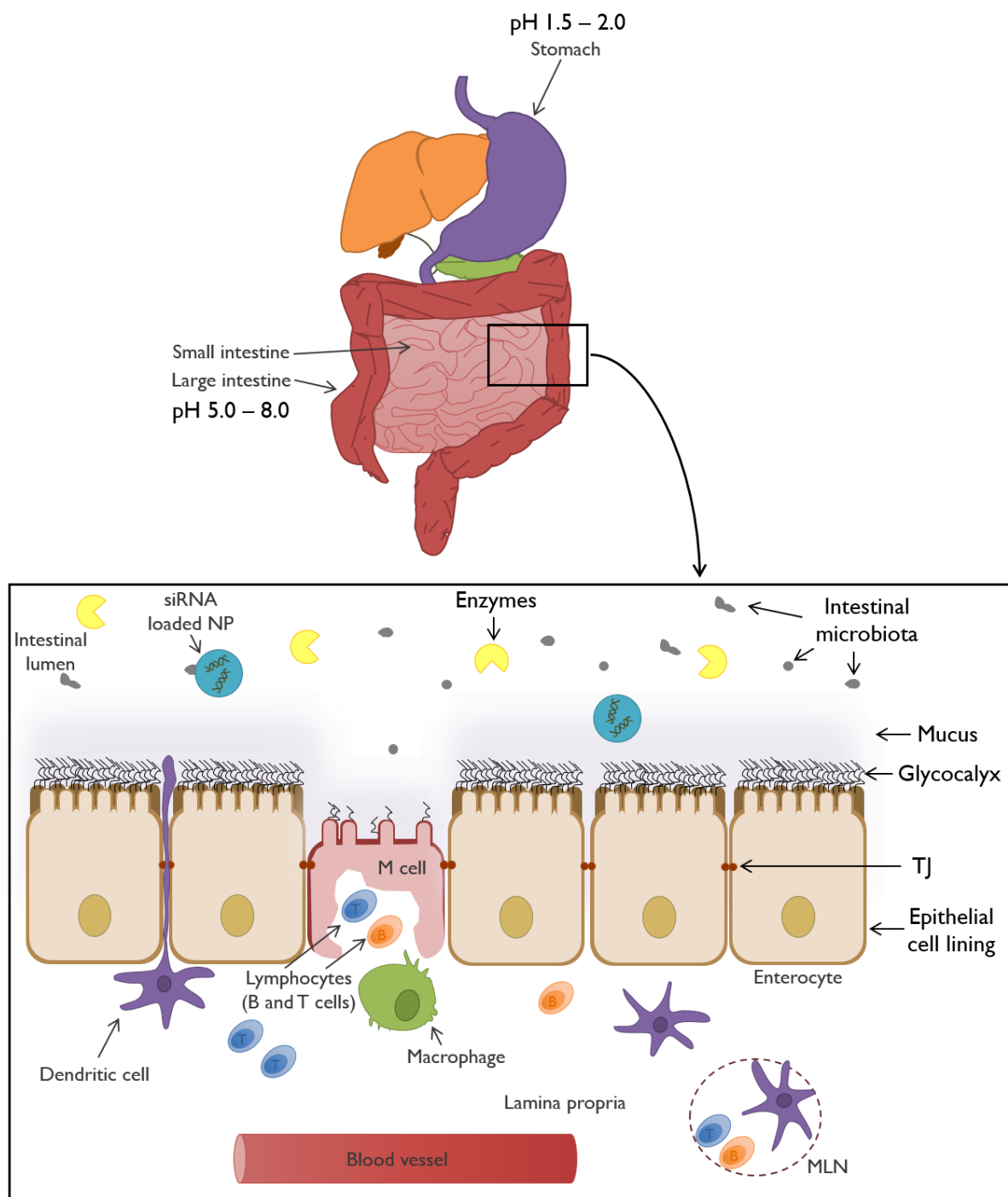


Figure 3. Major obstacles to the oral delivery of siRNA-based drug formulations: the acidic pH of the stomach and the varying pH across the GIT, the abundance of enzymes, the intestinal microbiota, the mucus layer, the glycocalyx and the epithelium. Adapted from ^{15;20}.

Abbreviations: GIT: gastrointestinal tract; MLN: mesenteric lymph node; NP: nanoparticle; siRNA: small interfering RNA; TJ: tight junction.

Another point to consider is the intestinal microbiota, i.e. the collection of commensal microorganisms, including bacteria, fungi and viruses, that can be found in the GIT, especially in the colon. In this regard, it is important to consider that some enzymes produced by these microorganisms might interact with the delivery carriers. On one hand, these interactions may

affect the stability and delivery efficiency of siRNA-containing nanocarrier formulations. On the other hand, however, they can be exploited as tools to promote site-specific delivery to certain regions of the GIT, such as the colon.^{19;20;37}

On top of the previously described obstacles, oral delivery of siRNA-based drug formulations still faces considerable barriers of anatomical and physical nature, related, more specifically, to the intestinal epithelial tissue, the glycocalyx and mucus layer.

The gut epithelium consists of a monolayer of different, specialized cells, connected to each other by tight junctions (TJs). Enterocytes are by far its major cell type, representing approx. 90 % of whole tissue, but intestinal epithelial cells (IECs) also include goblet cells, M-cells and others.^{8;20;37} Depending on the therapeutic strategy, it might be desirable for orally delivered siRNA-based drug formulations to target these cells. Alternatively, the goal might be to access the numerous immune cells in the underlying lamina propria, such as macrophages, for example, that can make for attractive targets in some therapeutic strategies as well. Moreover, the lamina propria itself can constitute a promising target, seeing as it is highly vascularized and siRNAs could potentially enter the systemic circulation. If gaining access to the lamina propria and its cells is the goal, ultimately the epithelial tissue portrays just another barrier.^{8;19;20} TJs seriously hinder the passage of most delivery carriers between IECs (i.e. by the paracellular route) and translocation into the lamina propria through these cells directly (i.e. by the transcellular route) is not straightforward as well.^{8;21}

The glycocalyx is a filament-like structure of glycoproteins/proteoglycans and glycolipids that acts as a size-selective diffusional barrier for pathogens and other particulate matter, including drug delivery carrier systems. Though it is present on the apical surface of all IECs, forming a protective layer that lines the entire lumen of the GIT, the glycocalyx is particularly thick on enterocytes and significantly reduces access to their apical membrane.^{8;20;42;43} Considering that enterocytes, being the most common cells of the epithelium, are the largest cell population available for the uptake of siRNA-containing systems, then their glycocalyx is at least a limiting factor to the translocation of orally delivered siRNA-based drugs across the epithelial cell lining via the transcellular route.

Lastly, another great barrier to the use of the GIT for the delivery of siRNAs using carrier systems is its mucus. The GIT is covered by a layer of mucus, or in other words a layer of a viscous and adhesive gel, of varying thickness, composed primarily of water and large glycoproteins secreted by goblet cells, named mucins. Its role is to prevent contact of external and potentially harmful particles with the underlying tissues of the intestinal wall. Owing to its

adhesiveness, as well as to its net negative charge and its short turnover time of about 1 h – 4.5 h, the mucus layer is capable of efficiently trapping foreign particles and quickly clearing them. Unfortunately, however, those “foreign particles” might include particle-based siRNA-containing delivery carriers. Hence, the mucus layer might decrease the residence time of siRNA-containing systems in the gut and, similarly to the glycocalyx, it might decrease their contact with IECs, thereby limiting the opportunities for siRNA uptake.^{16;19;20;44;45}

3.2. Advantages of the oral route of delivery

As has been previously mentioned, parenteral delivery via injections is currently the main approach used for the delivery of siRNA-based drug formulations. However, compared to this drug delivery route, oral delivery offers several advantages.¹⁴ Besides its non-invasive nature, and the obvious advantage of avoiding needle-associated pain, drug delivery through oral administration is easy and self-manageable; it does not require specialized personnel or devices. These patient-friendly features result in an increased patient compliance, which, in turn, can be associated with a reduction of overall healthcare costs.^{8;14;46} Furthermore, since the GIT is not a sterile environment, from the perspective of the pharmaceutical industry, production of oral formulations is convenient, because it does not require specific sterile manufacturing conditions.^{19;21;46;47}

In addition to these more general advantages, another feature adds to the appeal of oral administration as a delivery route for siRNAs: the possibility of delivering these therapeutic agents not only locally, for the treatment of diseases involving the GIT, but also to distant sites of action, for systemic treatment applications, after transport across the intestinal epithelium and entry into the systemic circulation.^{8;19} However, as a rule, the results obtained so far in terms of the systemic bioavailability of orally delivered nucleic acids are very low and are still far from being considered acceptable – even in spite of all the efforts made to develop and use optimized carriers.¹⁶ For this reason, oral delivery of siRNAs has mainly focused on therapeutic applications related with the treatment of diseases that affect the GIT. Indeed, most of the work done so far in this regard has focus on inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn’s disease (CD) and ulcerative colitis (UC).^{16;47;48}

To ensure the delivery of therapeutic siRNAs to the GIT for the treatment of IBD, disease/colon-targeted nanocarriers have been widely employed; the obtained results explain why, illustrating the potential of targeted drug delivery approaches.^{16;47}

An example worthy of note are the nanocarrier systems named thioketal nanoparticles (TKNs), developed by Wilson *et al.*⁴⁹. These systems are prepared by first complexing siRNAs with the cationic lipid 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), and then encapsulating the resulting complexes into NPs of poly-(1,4-phenyleneacetone dimethylene thioketal) (PPADT). Because PPADT is a reactive oxygen species (ROS)-sensitive polymer, TKNs are capable of exploiting abnormally high levels of ROS that are associated with intestinal inflammation (one of the defining traits of IBD)⁴⁸ as a way of achieving targeted, selective release/delivery of their payloads.^{20:49} These nanocarrier systems with PPADT have yielded positive results in studies *in vitro* and *in vivo*. The oral gavage of TKNs containing tumor necrosis factor (TNF)- α siRNAs to an UC mouse model, for instance, resulted in a localized delivery, with a decrease in TNF- α mRNA levels in the colon, and alleviated clinical signs of the disease.^{16:21;47;49}

4. Nonviral delivery nanocarrier systems for siRNA-based drugs

4.1. General overview

Lipid-based nanocarriers, such as liposomes and LNPs, can be considered the most widely used and clinically advanced nonviral formulation strategies for the delivery of siRNAs.^{16;17;18}

What is more, interest in using these systems for the delivery of siRNA-based drugs has only increased in the past years; one of the main reasons being the approval of Patisiran (Onpattro[®]).⁴¹ As shown in Table I., in 2018, Patisiran became the first ever siRNA-based drug approved for the treatment of hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis, a disease characterized by a mutation in the gene encoding the protein transthyretin (TTR). This drug is formulated as a suspension of LNPs for IV injection and its therapeutic effect is dependent on these carriers capacity to mediate targeted delivery to hepatocytes, where TTR is predominantly synthesized.^{7:50;51} As such, the approval of Patisiran (Onpattro[®]) emphasized the suitability and potential for clinical translation of lipid-based nanocarriers as delivery systems for siRNA therapeutics.^{41;52}

4.2. Nanocarriers for the oral delivery of siRNA-based drugs

The first study reporting on the successful oral delivery of siRNAs was put forth by Aouadi *et al.*⁵³.^{15:21;54} In this study, nanoparticles synthesized by absorbing yeast tRNA, the cationic polymer polyethylenimine (PEI) and siRNAs in a layer-by-layer format were further

encapsulated in micrometric sized β 1,3-D-glucan shells purified from baker's yeast. Subsequently, using the resulting delivery systems, which were called β 1,3-D-glucan-encapsulated siRNA particles (GeRPs), significant, targeted, siRNA-mediated gene silencing was observed in mouse macrophages *in vitro* and *in vivo*, after oral administration.^{20,53} Since this initial account, in 2009, several other studies (all preclinical) reported on the oral delivery of siRNAs.

Contrary to the general tendency towards the preferred use of lipid-based nanocarriers for the delivery of siRNAs, for the oral route in particular, polymer-based approaches, like the GeRPs, have been more popular.²⁰

Moreover, it is curious to note that, even among formulations for the oral delivery of siRNAs that report the use of lipidic materials, there are strategies that owe part (if not most) of their success to the use of polymers as well. An illustrative example are the previously described TKNs⁴⁹. In these NPs, the pre-complexation of siRNA molecules with the cationic lipid DOTAP provides two great advantages: the electrostatic interactions established between the two help protect siRNAs from degradation⁸; and, because of DOTAP, the NPs surface acquires an overall positive charge, which can help increase mucosal adhesion and transport, cellular internalization and endosomal escape.^{55,56} Nonetheless, these NPs owe a major part of their success to the polymer PPADT and its chemistry. PPADT is composed of thioketal linkages, which are stable to acid-, base- and protease-induced degradation, but are ROS-sensitive. It is this characteristic that ensures TKNs remain stable during transit through the GIT, protecting their siRNA payloads, and releasing them only at intestinal sites of inflammation, where high levels of ROS are produced and induce selective PPADT degradation.^{8,49}

NPs produced with polymeric materials present several features that make them attractive as nanocarriers for drug delivery: polymers can be easily synthesized and fabricated; their versatility in terms of physicochemical properties allows the development of customized nanocarrier formulations, with sustained or stimuli-responsive release mechanisms, for example; and polymeric nanocarriers can also be surface modified for targeted delivery.^{10,14,19}

4.2.1. Lipid-based nanocarriers for the oral delivery of siRNA-based drugs

Before focusing on lipid-based nanocarriers, perhaps a small "parenthesis" is in need, to highlight the following. Despite their advantages and important contribution to the progress of siRNA therapeutics, and despite all the efforts made in their development and optimization, nonviral nanocarriers in general (the lipid-based ones included) still show many limitations to

their clinical application. This is evident when all the scientific research already made in this area is confronted with the actual number of drug products on the market. In fact, there are still issues relating, not only with their economic large-scale production and stability, namely because nanocarrier formulations usually take the form of aqueous suspensions⁵¹, but also with their potential toxicity.^{57;58;59} Although nonviral strategies surpass the safety concerns associated with viral delivery systems, there is evidence suggesting that almost all synthesized nanocarriers might have some degree of toxicity as a result of the physicochemical properties of their components.^{36;59;60} Synthetic liposomes and LNPs composed of cationic lipids, for instance, might provoke cellular harm due to the electrostatic interaction of their positively-charged surface with the negatively-charged cell membrane.^{12;39}

With that being said, one limitation that afflicts lipid-based nanocarriers especially is the intrinsic instability of lipidic materials in the GIT. This explains why lipid-based systems have found limited applicability for the oral delivery of siRNA-based drugs so far.¹⁹ And why, on the other hand, polymer-based approaches, which, in comparison, are more stable in the GIT and have a better ability to protect their payloads against extreme pH- and enzyme-induced degradation¹⁰, have been more commonly reported, having a dominant presence in the literature.²⁰

But, even so, interest in simultaneously using lipid-based nanocarrier systems and the oral route for the delivery of siRNA-based drugs seems to be renewed and progressively growing. Over the recent years, some, very interesting, studies and new strategies and approaches were published in this field.^{51;61;62;63;64}

While there are several in-depth reviews describing and analyzing nonviral nanocarrier strategies for the oral delivery of siRNAs in particular, or nucleic acid therapeutics in general,^{8;16;20;21} few, even among the most recent, report on the previously referred studies and approaches. Therefore, in the next subsection, the content and contribution of these papers will be further discussed, as they represent advances in this field of research. Interestingly, as it will be explored in the next subsection as well, these approaches can also be interpreted, in a way, as responses to the limitations of the existing synthetic lipid-based carriers.

4.2.1.1. New studies and approaches

The recently published studies and approaches in the field of lipid-based nanocarrier formulations for the oral delivery of siRNA-based drugs can be broadly divided into three

themes: 1) elucidation of the fate in the GIT of orally delivered siRNA-containing lipid-based nanocarriers⁶¹; 2) oral delivery of siRNA-containing naturally-derived lipid-based nanocarriers^{62;63;64}; 3) lyophilization and compression of siRNA-containing lipid-based nanocarriers into tablets for oral administration⁵¹.

4.2.1.1.1. Elucidation of the fate in the GIT of orally delivered siRNA-containing lipid-based nanocarriers

In a recent study, Ball *et al.*⁶¹ set out to investigate the stability and transport properties of orally delivered siRNA-containing lipid-based nanocarriers, with the final objective of further expanding the knowledge on the fate of this type of delivery systems in the GIT.

Lipidoid NPs were used as lipid-based nanocarriers (Figure 4A.). As the name suggests, their active delivery component was a lipidoid, more precisely lipidoid 306O₁₃, i.e. an amphiphilic lipid-like molecule synthesized by Michael addition chemistry of an alkyl-amine with an alkyl-acrylate. The choice of lipidoid NPs for this study and, more, NPs with this specific lipidoid molecule, was prompted by prior work of Ball and colleagues.^{65;66} Additionally, it is worth mentioning that the composition of the NPs used also included the helper lipids cholesterol, distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DSPC) and polyethylene glycol (PEG)2000-DMG.^{61;65;66} First, the stability of the siRNA-containing lipidoid NPs was evaluated *in vitro* by exposing the formulation to physicochemical conditions similar to those found in the GIT. It was found that concentrations of pepsin and bile salts equivalent to those of a fed-state severely decreased glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene silencing mediated by siRNA-loaded lipidoid NPs in Caco-2 cells. At pepsin and bile salt concentrations representative of a fasting-state, however, siRNA GAPDH silencing activity was partially retained.^{19;21;61} The presence of mucin in a Caco-2 cell culture was also found to reduce gene silencing. On the contrary, the range of pH present in the GIT did not seem to negatively affect these systems and their payloads: within the pH range of 1.0 – 9.0, lipidoid NPs retained their stability and gene silencing efficiency, which, in this case, was mediated by anti-luciferase siRNAs in HeLa cells expressing this gene.^{21;61} Afterwards, in order to investigate *in vivo* biodistribution, a single dose of lipidoid NPs loaded with fluorescently labelled siRNAs was administered to mice via oral gavage. Lipidoid nanoparticles stayed in the GIT of mice for at least 8 h post administration, travelling across it over that period of time.^{16;21;61} Ball *et al.* observed the entry of lipidoid NPs in cells at the small intestines and colon of mice; but, in spite of that, statistically significant siRNA-mediated gene silencing in colon cells was not registered.^{19;21;61} An insufficient siRNA dose and/or an inconsistent delivery and uptake of the

administered dose within the gut have been suggested as possible explanations for this result.^{16;21;61}

In conclusion, the authors were capable of attaining the objective set for this study and demonstrated the challenges associated with lipid-based nanocarriers and the oral delivery of siRNAs.^{19;61} Although the intrinsic lack of stability of liposomes and other lipidic materials in the harsh environments of the GIT has for long been recognized^{19;67}, this type of studies are still of major importance. The reason being that an extended understanding of the relationship between the GIT conditions and the integrity and functionality of lipid-based nanocarriers will certainly facilitate the development of strategies to better their applicability for the delivery of siRNA-based drugs via oral administration. As a final point, considering the results reported in this study, two strategies can be suggested: 1) oral delivery of siRNAs using lipid-based nanocarrier formulations should be conducted under fasting conditions, because of pepsin and bile salts; and 2) to further minimize the negative impacts of pepsin, delivery nanocarrier particles can be protected from the environment of the stomach. This last suggestion can be put in place by encapsulating the NPs with a pH-sensitive polymer coating, for example.^{55;61}

4.2.1.1.2. Oral delivery of siRNA-containing naturally-derived lipid-based nanocarriers

The limitations associated with synthetic lipid-based nanocarriers (already addressed at the beginning of section 4.2.1.) have instigated research for safer, more biocompatible, and preferably more stable, drug delivery carrier systems.⁵⁹ In this context, lipid-based NPs derived from natural sources, such as exosomes released from different mammalian cells or exome-like NPs from edible plants, also known as plant-derived edible nanoparticles (PDNPs), have recently received a lot of interest.^{60;69;70}

4.2.1.1.2.1. Exosomes

Exosomes are nanosized (approx. 30 – 100 nm) vesicles, secreted by a variety of mammalian cells into the extracellular space; they can be found in many tissues and bodily fluids (e.g. milk), as well as in the supernatants of different cell types grown in culture.^{36;71;72} Exosomes consist of a lipid bilayer membrane, decorated with membrane-associated proteins, and, in its interior, of different macromolecular cargoes, which can include mRNAs, microRNAs (miRNAs), proteins, etc..^{36;56;68;73} Although for several years the physiological functions of exosomes were unascertained⁷⁰, it is now known that these vesicles play an important role in intercellular communication, by transporting and transferring these cargoes between cells.⁷²

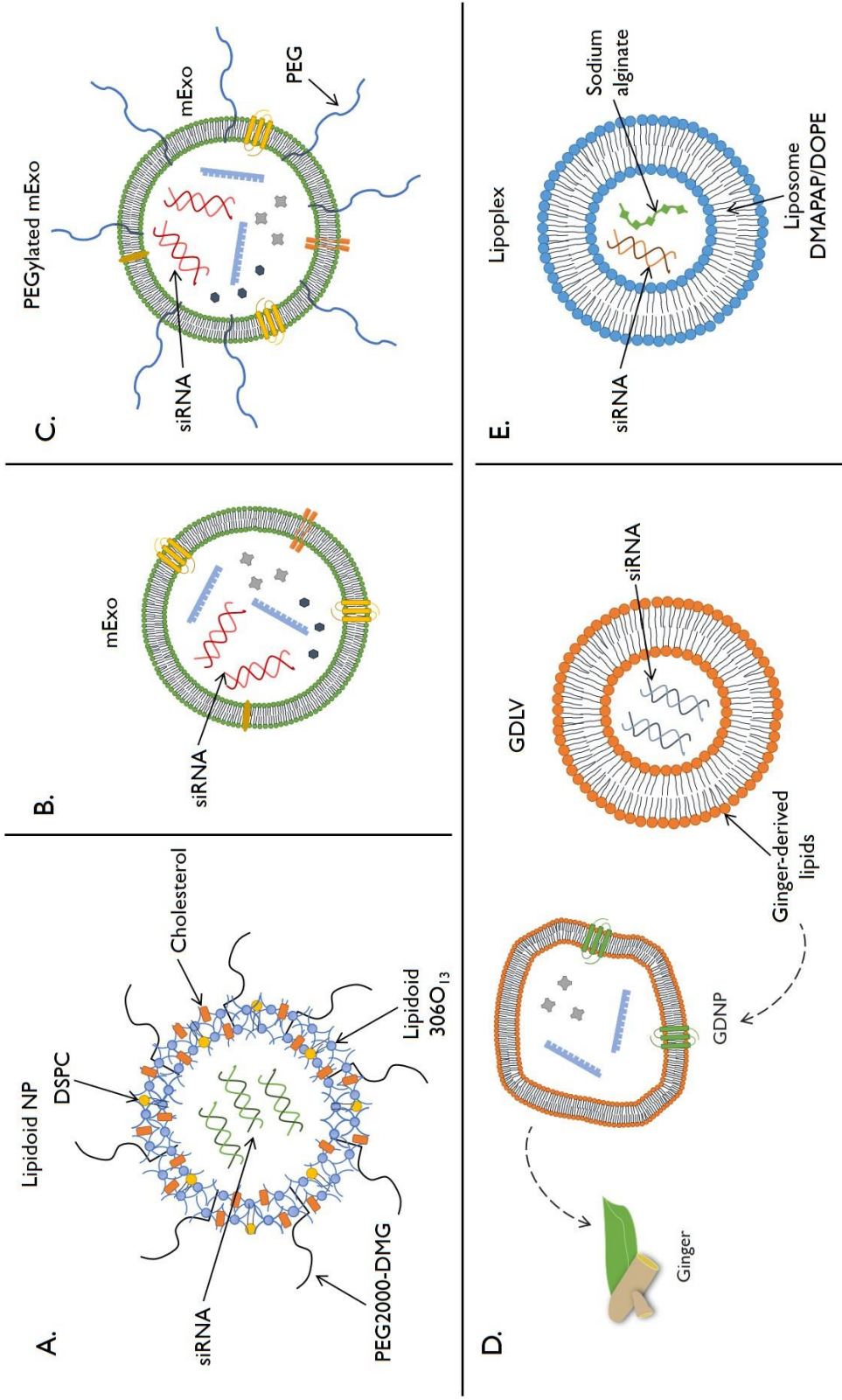


Figure 4. Simple schematic representation of lipid-based nanocarriers from new studies and approaches in the literature: **A.** Ball *et al.*⁶¹ Adapted from ⁶⁶; **B.** Shandilya *et al.*⁶² Adapted from ⁶²; **C.** Warren *et al.*⁶³ Adapted from ^{62,63}; **D.** Zhang *et al.*⁶⁴ Adapted from ^{57,68}; **D.** Busignies *et al.*⁵¹ Adapted from ¹¹.
Abbreviations: DMAPAP: 2-[3-[bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino]-N-ditetradecylcarbamoyl methyl-acetamide; DOPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DSPC: distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine; GDLV: ginger-derived lipid vehicle/vector; GDNP: ginger derived-nanoparticle; mExo: milk exosome; NP: nanoparticle; PEG: polyethylene glycol; siRNA: small interfering RNA.

The aforementioned structural and functional attributes have stressed the potential of exosomes as novel, plausible drug delivery nanocarrier systems, including in the field of siRNA delivery research.^{41;72} The possibility of loading exogenous siRNAs into exosomes and using them as delivery nanocarriers has been increasingly explored.^{36;69}

In addition, exosomes also show potential in overcoming the limitations common to existing synthetic lipid-based nanocarriers.⁵⁹ Potential of exosomes in this regard lies in the fact that they innately occur in organisms, where they essentially act as natural delivery systems. Accordingly, in comparison to synthetic lipid-based nanocarriers, exosomes are more biocompatible, have minimal toxicity issues and are non-immunogenic in nature. Furthermore, they have a longer circulating half-life; that is to say they can avoid the fate of some synthetic nanocarriers of being cleared too soon.^{12;70;71;72;74}

4.2.1.1.2.1.1. mExos

To date, published works on the use of exosomes as drug delivery nanocarriers for oral administration have mainly reported the use of milk exosomes (mExos), i.e. exosomes harvested from bovine/cow milk.⁷⁵ Exosomes are especially investigated in the field of cancer⁷⁵; and, in this field, for instance, several studies have evaluated mExos as nanocarrier systems for the oral delivery of chemopreventive agents, like withaferin A⁷⁶ or curcumin^{71;77}, as well as chemotherapeutic drugs, such as paclitaxel⁷⁸.

In the research field surrounding the oral delivery of siRNAs, mExos have also been the object of investigation.

Shandilya *et al.*⁶² published a study for which the overall aim can, in a way, be considered similar to that of the study of Ball *et al.*⁶¹: the study was aimed at investigating the stability and transport properties in the GIT of a formulation of mExos as nanocarriers for the delivery of siRNAs. Contrary to the study of Ball *et al.*, however, this work was performed *in vitro* in its entirety, first with use of a validated human *in vitro* digestive model, and then with the use of Caco-2 cells as an intestinal epithelial cell model. mExos loaded, via a lipofection reagent, with exogenous fluorescently-labeled siRNAs were used (Figure 4B.). The study was based on the comparative analysis of fluorescence intensity measurements for the free siRNAs, siRNAs encapsulated in digested mExos and siRNAs in undigested mExos.⁶² Briefly, siRNAs encapsulated in mExos were retained after *in vitro* digestion. No significant differences were observed between the fluorescence intensities of digested mExo-encapsulated siRNAs and undigested mExo-encapsulated siRNAs. Significant loss of non-encapsulated, free siRNAs was observed, however, suggesting that siRNA molecules lacking exosomal protection are

susceptible to degradation. Additionally, siRNA-containing mExos were successfully uptaken by Caco-2 cells, regardless of whether or not they had been previously subjected to the *in vitro* digestion protocol. Transepithelial transport of the mExos and of their siRNA cargoes also occurred, as was confirmed by the fluorescence intensity measured at the basolateral side of chambers divided by a Caco-2 monolayer of cells; this fluorescence intensity was significantly higher than the one registered for free siRNAs.⁶² Altogether, the results obtained in this study suggest siRNAs encapsulated in mExos are protected from the harsh digestive processes of the GIT and can subsequently undergo cellular uptake and transepithelial transport across the intestinal barrier. In other words, the results obtained seem to suggest that mExos can improve payload protection and intestinal permeability.⁶²

Further exploring this specific type of nanocarriers for the delivery of siRNAs through the GIT and the oral route, Warren *et al.*⁶³ modified the surface of mExos with a hydrophilic coating of PEG (Figure 4C.), aiming at enhancing both their stability in the stomach and their ability to penetrate the intestinal mucus. The modification in question was successfully made using 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[azido(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG(2000)-azide), via the passive hydrophobic insertion of the DSPE tail in the lipid bilayer membrane of mExos.⁶³ Warren *et al.* found that mExos modified with PEG showed increased stability in acidic *in vitro* conditions representative of those of the human stomach. Moreover, using an *in vitro* transwell model of the intestinal mucus layer, the author and his research team also found that, when compared with their unmodified versions, PEGylated mExos had higher mucus penetrability.⁶³ Thus, modifying the exosomal surface with PEG seems to fulfil the proposed aims, expressed above. The researchers carried on investigating the PEGylated mExos *in vitro*. First, the intestinal uptake of unmodified and PEGylated mExos in Caco-2 cells was evaluated. Considerable uptake was observed for both exosomal formulations. Then, researchers evaluated the gene silencing activity of unmodified and PEG-modified mExos loaded with green fluorescent protein (GFP) siRNAs in HEK293 cells expressing the GFP gene. siRNA-loaded mExos with the surface modified with a PEG coating showed a slightly reduced silencing activity when compared with the unmodified mExos. It was hypothesized that the slightly reduced gene silencing registered could result from a decrease in the endosomal escape function of mExos, as a negative impact of their PEG coating, but this remains to be elucidated. Nonetheless, with the results obtained, it is reasonable to consider that siRNAs encapsulated in mExos, with or without a PEG-coated surface, were capable of efficient gene silencing. Moreover, because 1) it provides improved stability to acidic environments, like the stomach, and 2) it enhances the penetrability of mExos through the

mucus, without affecting their uptake by the intestinal epithelial cells, PEGylation can still be considered a promising strategy to improve the oral bioavailability of siRNA-based drugs in mExo formulations.⁶³

Still on the subject of mExos, besides their potential as oral drug delivery nanocarrier systems, it is important to mention they are uniquely attractive when compared with other types of exosomes, particularly cell culture-derived exosomes⁷²; because other sources of exosomes rather than cell cultures, such as bovine/cow milk enable low production costs and the possibility to scale up this type of vesicles.^{74;79;80}

4.2.1.1.2.2. PDNPs

PDNPs are exosome-like NPs isolated from different edible plants. They can be described as “exosome-like NPs”, because, in spite of some differences, PDNPs and mammalian cell-derived exosomes are comparable in many structural and functional ways; the two can even be considered counterparts. Indeed, both PDNPs and exosomes are nano-sized vesicles, composed by a lipid bilayer membrane and numerous macromolecular cargoes. Much like in exosomes, in PDNPs too a lot of the cargo macromolecules consist of nucleic acids, like mRNAs or miRNAs.^{69;70} Notably, recent observations showed ginger-derived nanoparticles (GDNPs) might carry approx. 125 miRNAs.⁸¹ Additionally, plant-derived vesicles might also contain secondary metabolites with relevant physiological activities and, in consequence, with potential therapeutic applications. Returning to the example of GDNPs, these contain 6-gingerol and 6-shogaol, two compounds with multiple molecular targets that have shown anti-oxidation, anti-inflammatory and anti-cancer activity.^{69;70;81}

PDNPs and mammalian cell-derived exosomes are also comparable in their potential in overcoming the limitations associated with synthetic lipid-based nanocarriers. PDNPs exhibit an inherent biocompatibility and negligible toxicity and immunogenicity.^{60;69} Furthermore, as happens with mExos, PDNPs are isolated from food products, which are generally inexpensive and widely available; therefore, compared to synthetic lipid-based nanocarriers, they may be more cost effective and more easily scaled up for mass production.^{68;80;82}

4.2.1.1.2.2.1. GDNPs and GDLVs

GDNPs are PDNPs isolated from ginger, the rhizome of *Zingiber officinale*.⁸² These vesicles can be considered attractive *per se*, in part, due to the characteristics mentioned as examples above, and could be directly employed for therapeutic purposes, such as the

prevention and treatment of IBD, for instance.⁸¹ Alternatively, GDNPs can be used in order to extract and reassemble ginger-derived lipids in the form of NPs that can serve as nanocarrier systems for the delivery of therapeutics, including siRNAs.^{69,82} NPs made of lipids obtained from GDNPs are commonly referred to, in the literature, as either ginger derived-nanovectors (GDNVs), ginger-derived lipid vehicles or ginger-derived lipid vectors (GDLVs)^{57,64}; as a matter of uniformity of terminology, hereafter these NPs will always be referred to as GDLVs.

In a recently published study, Zhang *et al.*⁶⁴ gives an account of his team's research on GDLVs as lipid-based nanocarriers for the oral delivery of siRNAs to the colon, in the perspective of treating UC and of, simultaneously, circumventing the limitations of synthetic lipid-based nanocarriers. GDLVs were obtained from the lipids of a specific subpopulation of GDNPs, isolated from homogenized ginger using ultracentrifugation and sucrose gradient centrifugation methods. The subpopulation of GDNPs in question had already been characterized and studied by this team.⁸¹ In prior work⁸¹, Zhang *et al.* showed that, following oral administration to mice, this subpopulation could naturally target the (inflamed) mucosa of the colon and presented anti-inflammatory properties.^{64,81} In this study, the obtained GDLVs were loaded with siRNA molecules targeting CD98 (Figure 4D.), a transmembrane glycoprotein whose increased colonic expression plays an important role in intestinal inflammatory conditions such as UC.^{64,83} Efficient cellular uptake was observed *in vitro*, in both Colon-26 and RAW 264.7 cells. Furthermore, with the same cellular models, it was found that siRNA-loaded GDLVs were capable of silencing the expression of CD98 mRNA in an efficient manner. In *in vivo* experiments, formulations of CD98 siRNA-loaded GDLVs were orally administered to a mouse model of UC, twice, with a 12 h interval. Whereas formulations of siRNA-containing GDLVs suppressed the expression of CD98 in the ileum and colon of mice, no decrease in CD98 protein expression was observed in the duodenum or jejunum. These results are coherent with the *in vivo* biodistributions studies performed first, which indicated that GDLVs were retained in the stomach, ileum and colon of mice, but did not exhibit high retention neither in the duodenum nor the jejunum. It can be concluded that orally administered formulations of CD98 siRNA-loaded GDLVs targeted colon tissues and efficiently reduced colonic CD98 gene expression. As such, GDLVs constitute promising approaches for the oral delivery of siRNAs for the treatment of diseases in the GIT, like UC.⁶⁴

Consequently, this research group further proceeded its studies on GDLVs. To be more precise, this research group used GDLVs functionalized with folic acid (FA) in order to

achieve targeted delivery of divalent metal-ion transporter 1 (Dmt1) siRNAs to the duodenal epithelium following oral administration to mice.^{84,85} Its overall objective was to assess if the *in vivo* knockdown of intestinal Dmt1 would prevent iron loading⁸⁴, in appropriate mice models, and mitigate it once already established.⁸⁵ A detailed discussion on iron overload disorders and the role Dmt1 plays in them was considered beyond the scope of this monograph. For details on these topics, as well as on the results obtained in the mentioned research studies, readers are encouraged to look into reference reviews³ and the original research articles.^{84,85}

4.2.1.1.3. Lyophilization and compression of siRNA-containing lipid-based nanocarriers into tablets for oral administration

Nonviral nanocarrier formulations for the delivery of siRNAs are normally produced in the form of aqueous colloidal suspensions; the ones intended for delivery via the oral route included.^{51,73} In fact, all the studies reviewed in this monograph thus far report the use of this type of formulations. Liquid, aqueous colloidal suspensions suffer from instability, however, and are prone to physical and chemical degradation. In order to improve stability, removing water from the formulations may be considered, which can be attained by freeze-drying.⁸⁶

Freeze-drying, also known as lyophilization, is essentially a 3-step – freezing, primary drying (ice sublimation) and secondary drying (desorption of unfrozen water) – water removal process.^{73,86} Freeze-drying aqueous suspensions in order to eliminate their water and obtain solid powders, not only helps prevent the particle aggregation and degradation that can occur in suspension, hence improving stability, but can also prove convenient and cost-effective in terms of transport, handling and distribution.^{55,86} Additionally, freeze-dried powders can be transformed into other solid dosage forms, such as tablets or capsules, which are commonly used as dosage forms for oral drug delivery.^{86,87}

The prospect of transforming aqueous suspensions of siRNA-containing nanocarriers into solid powders, and subsequently into solid dosage forms for oral administration, is interesting and would undoubtedly represent an important advance in this field. Nonetheless, it is important to bear in mind that siRNA nanocarrier formulations are usually complex and fragile. Lyophilization and subsequent downstream processing (e.g. powder compression to obtain tablets) generate various stresses that can eventually destabilize siRNAs and their carrier systems on a structural and functional level.^{55,73,86,88}

Recently, the tableability of a liquid, aqueous suspension of siRNA-containing lipid-based nanocarriers was evaluated, as reported by Busignies *et al.*⁵¹

siRNA lipoplexes composed of siRNAs specific to luciferase, plus of the cationic lipid 2-{3-[bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecylcarbamoyl methyl-acetamide (DMAPAP), the zwitterionic lipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and the anionic polymer sodium alginate, as an adjuvant, were prepared (Figure 4E.) in the form of an aqueous suspension. The lipoplexes were then mixed with a solution of trehalose and mannitol; these are lyophilization specific excipients that, in this case, were used as a cryo/lyoprotectant and as a bulking agent, respectively. In the presence of these excipients, following a fast pre-freezing step in liquid nitrogen, the aforementioned formulation was submitted to a freeze-drying cycle. Afterwards, in order to proceed to the tableting process, the solid powder resulting from the freeze-drying process was mixed with lactose (23 % w/w), used as a diluent for direct compression, and magnesium stearate (0.5 % w/w), a lubricant. The mixture was compacted with a compression simulator and tablets were obtained.⁵¹

The tableability of the aqueous suspension of siRNA-containing lipid-based nanocarriers in question was evaluated by studying the impact of the lyophilization and compression processes on the structure of the nanocarriers and on the gene silencing efficacy of the carried siRNAs. Gene silencing mediated by the formulated siRNAs was studied *in vitro*, using luciferase labeled-cells.⁵¹ The gene silencing efficacy of lipoplexes resuspended from the freeze-dried powder, after the freeze-drying process, was found to be identical to that of a fresh lipoplex suspension. While they did not lose efficacy during freeze-drying, lipoplexes submitted to compression, obtained from tablets disintegrated in water, retained only a little over 60 % of the gene silencing efficacy of the fresh lipoplex suspension. It is possible to establish a correlation between these results and the results relating to the impact of the lyophilization and compression processes on the supramolecular structure of the lipid-based nanocarriers employed as siRNA delivery systems in this formulation. Freeze-drying did not alter the structure of the lipoplexes, but changes in their supramolecular structure were observed after the disintegration of tablets. The efficacy of lipoplexes strongly depends on their structure. Therefore, it can be hypothesized that the observed loss of approx. 40 % of the gene silencing efficacy may correlate to the effect of compression on the structure of these lipid-based nanocarrier systems. Everything considered, this report by Busignies *et al.* is the first to suggest that it may be possible to transform an aqueous suspension of siRNA-containing lipid-based nanocarriers into tablets, while maintaining some gene silencing efficacy.⁵¹ This would be extremely promising for the oral administration of this type of therapeutics.

5. Conclusions and future perspectives

Since the discovery of the ability of siRNAs to trigger the RNAi gene silencing process, these molecules have piqued interest as potential novel therapeutic agents.^{2,7} However, the successful development of siRNA-based drugs is strongly dependent on the development of formulation approaches, such as nonviral nanocarrier formulations, that enable the adequate delivery of siRNAs to target cells. In this context, delivery via the oral route remains particularly challenging; the reason being the several barriers imposed at both the extracellular and cellular levels by characteristics of the GIT.²⁰

In the past, lipid-based nanocarrier systems have found limited applicability in the oral delivery of siRNA-based drugs, due to the inherent instability of lipidic materials in the GIT.¹⁹ Nonetheless, in recent years, some studies in the field of the oral delivery of siRNAs reported new strategies and approaches which can fit this category of nanocarriers. This monograph aimed primarily at discussing and reviewing those reports, as they represent interesting advances in this field.

This last section of the monograph, in turn, aims at discussing identified limitations and opportunities for future work related with the aforementioned studies and approaches.

Based on the conclusions of Busignies *et al.*⁵¹, in future work, instead of tableting freeze-dried siRNA-containing lipid-based nanocarriers, other solid dosage forms could be used for oral delivery applications. Loading this type of freeze-dried carriers into enteric-coated capsules might be a compelling alternative. On one hand, this would avoid the stresses caused by compression on lipid-based nanocarriers; stresses that can negatively impact the gene silencing efficiency of the system as a whole.⁵¹ On the other hand, enteric-coated capsules would also help protect lipid-based nanocarriers from the environment of the stomach, which, according to Ball *et al.*, is a plausible strategy to further improve oral delivery of siRNAs with these carriers.^{55,61}

Despite the encouraging results from the studies concerning mExos as siRNA nanocarriers for oral delivery reviewed in this monograph, it is important to note these studies were performed entirely *in vitro*. Unfortunately, *in vitro* results not always correlate well with subsequent *in vivo* data.⁶⁶ Therefore, future *in vivo* research is needed for confirmation.

Milk and ginger, which serve as sources for mExos and GDNPs/GDLVs, respectively, are extremely complex, natural, food products. The small-scale of the preclinical studies presented here in which mExos and GDNPs/GDLVs were used minimizes the potential for

errors and variations. However, in large-scale production, batch-to-batch variations may occur. Challenges in this regard must be taken into consideration.

In conclusion, the oral delivery of siRNA-based drugs employing lipid-based nanocarriers is still in its infancy. Moreover, a solid preclinical body of data is still lacking behind the recent studies and approaches reported in this field and several limitations, gaps in knowledge and opportunities for future work can be identified. Nonetheless, the existing preclinical data looks interesting and successful maneuvers around the identified barriers will likely bring this field closer to clinical experiments.

References

1. AKHTAR, Saghir; BENTER, Ibrahim F. - Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. ISSN 00219738. 117:12 (2007) 3623–3632. doi: 10.1172/JCI33494.
2. LAM, Jenny K. W. *et al.* - siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. ISSN 21622531. 4:9 (2015) e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23.
3. ATTARWALA, Husain *et al.* - Oral nucleic acid therapy using multicompartmental delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. ISSN 1939-0041. 10:2 (2018) e1478. doi: 10.1002/WNAN.1478.
4. FIRE, Andrew *et al.* - Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. ISSN 00280836. 391:6669 (1998) 806–811. doi: 10.1038/35888.
5. GOMES-DA-SILVA, Lígia Catarina; SIMÕES, Sérgio; MOREIRA, João Nuno - Challenging the future of siRNA therapeutics against cancer: The crucial role of nanotechnology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. ISSN 14209071. 71:8 (2014) 1417–1438. doi: 10.1007/s00018-013-1502-2.
6. ELBASHIR, Sayda M. *et al.* - Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. ISSN 00280836. 411:6836 (2001) 494–498. doi: 10.1038/35078107.
7. KULKARNI, Jayesh A. *et al.* - Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics. *Accounts of Chemical Research*. ISSN 15204898. 52:9 (2019) 2435–2444. doi: 10.1021/acs.accounts.9b00368.
8. BUSIGNIES, Virginie *et al.* - Nanostructures for oral delivery of therapeutic nucleic acids. In: *Nanostructures for Oral Medicine*. Elsevier, 2017. ISBN 9780323477215. p. 147–172.
9. DYKXHOORN, Derek M.; LIEBERMAN, Judy - Knocking down Disease with siRNAs. *Cell*. ISSN 00928674. 126:2 (2006) 231–235. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.007.
10. BHAVSAR, Mayank D.; AMIJI, Mansoor M. - Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. ISSN 17425247. 4:3 (2007) 197–213. doi: 10.1517/17425247.4.3.197.
11. RIBEIRO, Marcela Coelho Silva *et al.* - Neuroprotective effect of siRNA entrapped in

- hyaluronic acid-coated lipoplexes by intravitreal administration. *Pharmaceutics*. ISSN 19994923. 13:6 (2021) 845. doi: 10.3390/pharmaceutics13060845.
12. WENG, Yuhua *et al.* - Improved Nucleic Acid Therapy with Advanced Nanoscale Biotechnology. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. ISSN 21622531. 19 (2020) 581–601. doi: 10.1016/j.omtn.2019.12.004.
13. SIOUD, Mouldy - RNA Interference: Mechanisms, Technical Challenges, and Therapeutic Opportunities. *Methods in Molecular Biology*. ISSN 10643745. 1218 (2015). doi: 10.1007/978-1-4939-1538-5_1.
14. KRIEGEL, Christina; ATTARWALA, Husain; AMIJI, Mansoor - Multi-compartmental oral delivery systems for nucleic acid therapy in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 0169409X. 65:6 (2013) 891–901. doi: 10.1016/j.addr.2012.11.003.
15. FORBES, Diane C.; PEPPAS, Nicholas A. - Oral delivery of small RNA and DNA. *Journal of Controlled Release*. ISSN 01683659. 162:2 (2012) 438–445. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.037.
16. O'DRISCOLL, Caitriona M. *et al.* - Oral delivery of non-viral nucleic acid-based therapeutics - do we have the guts for this? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. ISSN 18790720. 133 (2019) 190–204. doi: 10.1016/j.ejps.2019.03.027.
17. SEMPLE, Sean C. *et al.* - Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature Biotechnology*. ISSN 10870156. 28:2 (2010) 172–176. doi: 10.1038/nbt.1602.
18. JULIANO, Rudolph L. - The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. ISSN 13624962. 44:14 (2016) 6518–6548. doi: 10.1093/nar/gkw236.
19. NAWSHAD HOSSIAN, A. K. M.; MACKENZIE, Gerardo G.; MATTHEOLABAKIS, George - miRNAs in gastrointestinal diseases: Can we effectively deliver RNA-based therapeutics orally? *Nanomedicine*. ISSN 17486963. 14:21 (2019) 2873–2889. doi: 10.2217/nnm-2019-0180.
20. O'NEILL, Martin J. *et al.* - Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: Physiological barriers and preclinical models. *Drug Discovery Today*. ISSN 13596446. 16:5–6 (2011) 203–218. doi: 10.1016/j.drudis.2011.01.003.
21. CHEVALIER, Rachel - siRNA Targeting and Treatment of Gastrointestinal Diseases. *Clinical and Translational Science*. ISSN 17528062. 12:6 (2019) 573–585. doi: 10.1111/cts.12668.
22. OZCAN, Gulnihal *et al.* - Preclinical and clinical development of siRNA-based

therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 18728294. 87 (2015) 108–119. doi: 10.1016/j.addr.2015.01.007.

23. AAGAARD, Lars; ROSSI, John J. - RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 0169409X. 59:2–3 (2007) 75–86. doi: 10.1016/j.addr.2007.03.005.

24. KANASTY, Rosemary *et al.* - Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials* 2013 12:11. ISSN 1476-4660. 12:11 (2013) 967–977. doi: 10.1038/nmat3765.

25. BUMCROT, David *et al.* - RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nature Chemical Biology* 2006 2:12. ISSN 1552-4469. 2:12 (2006) 711–719. doi: 10.1038/nchembio839.

26. ZHANG, M. May *et al.* - The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochemical Pharmacology*. ISSN 0006-2952. 189 (2021) 114432. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114432.

27. Drug Approval Package: Onpattro (patisiran) [cited 2021 Apr 28]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922orig1s000toc.cfm

28. FDA approves first-of-its kind targeted RNA-based therapy to treat a rare disease | FDA [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-its-kind-targeted-rna-based-therapy-treat-rare-disease>

29. Onpattro | European Medicines Agency [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/onpattro>

30. Drug Approval Package: GIVLAARI (givosiran)Injection [cited 2021 Apr 28]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000TOC.cfm

31. FDA approves givosiran for acute hepatic porphyria | FDA [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-givosiran-acute-hepatic-porphyrria>

32. Givlaari | European Medicines Agency [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/givlaari>

33. FDA Approves First Drug to Treat Rare Metabolic Disorder | FDA [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-treat-rare-metabolic-disorder>

34. Oxlumio | European Medicines Agency [cited 2021 Apr 28]. Available from:

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/oxlumo>

35. Leqvio | European Medicines Agency [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/leqvio>

36. SHAHABIPOUR, Fahimeh *et al.* - Exosomes: Nanoparticulate tools for RNA interference and drug delivery. *Journal of Cellular Physiology*. ISSN 10974652. 232:7 (2017) 1660–1668. doi: 10.1002/jcp.25766.

37. YANG, Chunhua; MERLIN, Didier - Nanoparticle-mediated drug delivery systems for the treatment of IBD: Current perspectives. *International Journal of Nanomedicine*. ISSN 11782013. 14 (2019) 8875–8889. doi: 10.2147/IJN.S210315.

38. KACZMAREK, James C.; KOWALSKI, Piotr S.; ANDERSON, Daniel G. - Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. *Genome Medicine*. ISSN 1756994X. 9:1 (2017) 1–16. doi: 10.1186/s13073-017-0450-0.

39. PARASHAR, Deepti *et al.* - Lipid-based nanocarriers for delivery of small interfering RNA for therapeutic use. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. ISSN 18790720. 142 (2020) 105159. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105159.

40. MUKALEL, Alvin J. *et al.* - Nanoparticles for nucleic acid delivery: Applications in cancer immunotherapy. *Cancer Letters*. ISSN 18727980. 458 (2019) 102–112. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.040.

41. YONEZAWA, Sei; KOIDE, Hiroyuki; ASAI, Tomohiro - Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 0169-409X. 154–155 (2020) 64–78. doi: 10.1016/J.ADDR.2020.07.022.

42. MÖCKL, Leonhard - The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. ISSN 2296634X. 8 (2020) 253. doi: 10.3389/fcell.2020.00253.

43. SUN, Willy W. *et al.* - Nanoarchitecture and dynamics of the mouse enteric glycocalyx examined by freeze-etching electron tomography and intravital microscopy. *Communications Biology*. ISSN 23993642. 3:1 (2020) 1–10. doi: 10.1038/s42003-019-0735-5.

44. LAI, Samuel K.; WANG, Ying Ying; HANES, Justin - Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 0169409X. 61:2 (2009) 158–171. doi: 10.1016/j.addr.2008.11.002.

45. ENSIGN, Laura M.; CONE, Richard; HANES, Justin - Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN

0169409X. 64:6 (2012) 557–570. doi: 10.1016/j.addr.2011.12.009.

46. GABOR, Franz *et al.* - Improving oral delivery. Handbook of Experimental Pharmacology. ISSN 01712004. 197:197 (2010) 345–398. doi: 10.1007/978-3-642-00477-3_12.

47. DURÁN-LOBATO, Matilde; NIU, Zhigao; ALONSO, María José - Oral Delivery of Biologics for Precision Medicine. Advanced Materials. ISSN 15214095. 32:13 (2020) 1901935. doi: 10.1002/adma.201901935.

48. HUA, Susan *et al.* - Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. ISSN 15499642. 11:5 (2015) 1117–1132. doi: 10.1016/j.nano.2015.02.018.

49. WILSON, D. Scott *et al.* - Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF- α -siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. Nature Materials. ISSN 14764660. 9:11 (2010) 923–928. doi: 10.1038/nmat2859.

50. URITS, Ivan *et al.* - A Review of Patisiran (ONPATTRO[®]) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. Neurology and Therapy. ISSN 21936536. 9:2 (2020) 301–315. doi: 10.1007/s40120-020-00208-1.

51. BUSIGNIES, Virginie *et al.* - Compression of Vectors for Small Interfering RNAs Delivery: Toward Oral Administration of siRNA Lipoplexes in Tablet Forms. Molecular Pharmaceutics. ISSN 15438392. 17:4 (2020) 1159–1169. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01190.

52. EL-MAYTA, Rakan *et al.* - A Nanoparticle Platform for Accelerated In Vivo Oral Delivery Screening of Nucleic Acids. Advanced Therapeutics. ISSN 23663987. 4:1 (2021). doi: 10.1002/adtp.202000111.

53. AOUADI, Myriam *et al.* - Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. Nature. ISSN 00280836. 458:7242 (2009) 1180–1184. doi: 10.1038/nature07774.

54. AKHTAR, Saghir - Oral delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. Journal of Drug Targeting. ISSN 1061186X. 17:7 (2009) 491–495. doi: 10.1080/10611860903057674.

55. VASS, Panna *et al.* - Drying technology strategies for colon-targeted oral delivery of biopharmaceuticals. Journal of Controlled Release. ISSN 18734995. 296 (2019) 162–178. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.01.023.

56. ZHANG, Mingzhen; MERLIN, Didier - Nanoparticle-based oral drug delivery systems targeting the colon for treatment of ulcerative colitis. Inflammatory Bowel Diseases. ISSN

15364844. 24:7 (2018) 1401–1415. doi: 10.1093/ibd/izy123.
57. ZHANG, Mingzhen *et al.* - Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy. *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 24:10 (2016) 1783–1796. doi: 10.1038/mt.2016.159.
58. THI, Thai Thanh Hoang *et al.* - Lipid-based nanoparticles in the clinic and clinical trials: From cancer nanomedicine to COVID-19 vaccines. *Vaccines*. ISSN 2076393X. 9:4 (2021) 359. doi: 10.3390/vaccines9040359.
59. ZHANG, Mengjun *et al.* - Exosome-based nanocarriers as bio-inspired and versatile vehicles for drug delivery: recent advances and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*. ISSN 2050750X. 7:15 (2019) 2421–2433. doi: 10.1039/C9TB00170K.
60. BALACHANDRAN, Banuja; YUANA, Yuana - Extracellular vesicles-based drug delivery system for cancer treatment. *Cogent Medicine*. ISSN 2331-205X. 6:1 (2019) 1635806. doi: 10.1080/2331205x.2019.1635806.
61. BALL, Rebecca L.; BAJAJ, Palak; WHITEHEAD, Kathryn A. - Oral delivery of siRNA lipid nanoparticles: Fate in the GI tract. *Scientific Reports*. ISSN 20452322. 8:1 (2018) 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-20632-6.
62. SHANDILYA, Shruti *et al.* - Small Interfering RNA in Milk Exosomes Is Resistant to Digestion and Crosses the Intestinal Barrier in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 15205118. 65:43 (2017) 9506–9513. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03123.
63. WARREN, Matthew R. *et al.* - Milk exosomes with enhanced mucus penetrability for oral delivery of siRNA. *Biomaterials Science*. ISSN 20474849. 9:12 (2021) 4260–4277. doi: 10.1039/d0bm01497d.
64. ZHANG, Mingzhen *et al.* - Oral administration of ginger-derived nanolipids loaded with siRNA as a novel approach for efficient siRNA drug delivery to treat ulcerative colitis. *Nanomedicine*. ISSN 17486963. 12:16 (2017) 1927–1943. doi: 10.2217/nnm-2017-0196.
65. BALL, Rebecca L.; KNAPP, Christopher M.; WHITEHEAD, Kathryn A. - Lipidoid nanoparticles for siRNA delivery to the intestinal epithelium: In vitro investigations in a CACO-2 model. *PLoS ONE*. ISSN 19326203. 10:7 (2015) e0133154. doi: 10.1371/journal.pone.0133154.
66. WHITEHEAD, Kathryn A. *et al.* - Degradable lipid nanoparticles with predictable in vivo siRNA delivery activity. *Nature Communications*. ISSN 20411723. 5:1 (2014) 1–10. doi: 10.1038/ncomms5277.

67. ROWLAND, Richard N.; WOODLEY, John F. - The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*. ISSN 00052760. 620:3 (1980) 400–409. doi: 10.1016/0005-2760(80)90131-9.
68. ZHANG, Mingzhen *et al.* - Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases. *Tissue Barriers*. ISSN 21688370. 4:2 (2016). doi: 10.1080/21688370.2015.1134415.
69. YANG, Chunhua; ZHANG, Mingzhen; MERLIN, Didier - Advances in plant-derived edible nanoparticle-based lipid nano-drug delivery systems as therapeutic nanomedicines. *Journal of Materials Chemistry B*. ISSN 2050750X. 6:9 (2018) 1312–1321. doi: 10.1039/c7tb03207b.
70. AKUMA, Precious; OKAGU, Ogadimma D.; UDENIGWE, Chibuike C. - Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. ISSN 2571581X. 3 (2019) 23. doi: 10.3389/fsufs.2019.00023.
71. VASHISHT, Monika *et al.* - Curcumin Encapsulated in Milk Exosomes Resists Human Digestion and Possesses Enhanced Intestinal Permeability in Vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. ISSN 15590291. 183:3 (2017) 993–1007. doi: 10.1007/s12010-017-2478-4.
72. AQIL, Farrukh *et al.* - Milk exosomes - Natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer Letters*. ISSN 18727980. 449 (2019) 186–195. doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.011.
73. TRENKENSCHUH, Eduard; FRIESS, Wolfgang - Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. ISSN 18733441. 165 (2021) 345–360. doi: 10.1016/j.ejpb.2021.05.024.
74. CAROBOLANTE, Greta *et al.* - Cow milk and intestinal epithelial cell-derived extracellular vesicles as systems for enhancing oral drug delivery. *Pharmaceutics*. ISSN 19994923. 12:3 (2020) 226. doi: 10.3390/pharmaceutics12030226.
75. PINHEIRO, Alice *et al.* - Extracellular vesicles: intelligent delivery strategies for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release*. ISSN 18734995. 289 (2018) 56–69. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.09.019.
76. MUNAGALA, Radha *et al.* - Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Letters*. ISSN 18727980. 371:1 (2016) 48–61. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.020.
77. AQIL, Farrukh *et al.* - Exosomes for the Enhanced Tissue Bioavailability and Efficacy of Curcumin. *AAPS Journal*. ISSN 15507416. 19:6 (2017) 1691–1702. doi: 10.1208/s12248-017-0154-9.

78. AGRAWAL, Ashish K. *et al.* - Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. ISSN 15499642. 13:5 (2017) 1627–1636. doi: 10.1016/j.nano.2017.03.001.
79. SEDYKH, Sergey; KULESHOVA, Anna; NEVINSKY, Georgy - Milk exosomes: Perspective agents for anticancer drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 14220067. 21:18 (2020) 1–16. doi: 10.3390/ijms21186646.
80. SOMIYA, Masaharu; YOSHIOKA, Yusuke; OCHIYA, Takahiro - Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. ISSN 20013078. 7:1 (2018) 1440132. doi: 10.1080/20013078.2018.1440132.
81. ZHANG, Mingzhen *et al.* - Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*. ISSN 18785905. 101 (2016) 321–340. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.018.
82. ZHANG, Mingzhen; COLLINS, James F.; MERLIN, Didier - Do ginger-derived nanoparticles represent an attractive treatment strategy for inflammatory bowel diseases? *Nanomedicine*. ISSN 17486963. 12:23 (2016) 3035–3037. doi: 10.2217/nnm-2016-0353.
83. NGUYEN, Hang Thi Thu *et al.* - CD98 expression modulates intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer in mice. *Journal of Clinical Investigation*. ISSN 00219738. 121:5 (2011) 1733–1747. doi: 10.1172/JCI44631.
84. WANG, Xiaoyu *et al.* - Oral Gavage of Ginger Nanoparticle-Derived Lipid Vectors Carrying Dmt1 siRNA Blunts Iron Loading in Murine Hereditary Hemochromatosis. *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 27:3 (2019) 493–506. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.01.003.
85. WANG, Xiaoyu *et al.* - Oral administration of ginger-derived lipid nanoparticles and dmt1 sirna potentiates the effect of dietary iron restriction and mitigates pre-existing iron overload in hamp ko mice. *Nutrients*. ISSN 20726643. 13:5 (2021) 1686. doi: 10.3390/nu13051686.
86. ABDELWAHED, Wassim *et al.* - Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 0169409X. 58:15 (2006) 1688–1713. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.017.
87. WILKHU, Jitinder S. *et al.* - Development of a solid dosage platform for the oral delivery of bilayer vesicles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. ISSN 18790720. 108 (2017) 71–77. doi: 10.1016/j.ejps.2017.06.014.

88. LU, Yuwei *et al.* - Effects of compaction and storage conditions on stability of intravenous immunoglobulin – Implication on developing oral tablets of biologics. *International Journal of Pharmaceutics*. ISSN 18733476. 604 (2021) 120737. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120737.