

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E
REGGIO EMILIA**

**DOTTORATO DI RICERCA
IN**

SCIENZE E TECNOLOGIE DEI PRODOTTI PER LA SALUTE
(nell'ambito della Scuola di dottorato in Scienze e Tecnologie dei Prodotti per la Salute)

XXV CICLO

**NANOPARTICELLE POLIMERICHE
ALLESTITE IN EMULSIONE
SEMPLICE: PREPARAZIONE,
OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI
FORMULATIVI ED APPLICAZIONE
NELLA TERAPIA ANTITUMORALE**

Candidato: Dott. Alessandro De Vita

Relatore (Tutor): Prof.ssa Maria Angela Vandelli

Coordinatore del Dottorato: Prof. Giovanni Tosi

Direttore della scuola di Dottorato: Prof.ssa Annalisa Tait

2010-2012

Alla mia famiglia.

Indice

INTRODUZIONE	3
Nanoparticelle polimeriche	4
PLA e PLGA	8
Preparazione delle nanoparticelle di PLGA	9
Polimerizzazione	10
Nanoprecipitazione	11
Emulsione semplice (o singola emulsione):	12
Doppia emulsione	14
Salting out	14
I tensiattivi	15
Stabilità delle nanoparticelle	17
Liofilizzazione	19
Sezione 1: Applicazione delle nanoparticelle; visualizzazione in vivo di nanosistemi impiegati in diagnostica e nel rilascio di farmaci al sistema nervoso centrale	20
Stato dell'arte: nanoparticelle di PLGA modificate con g7 e con molecole fluorescenti; valutazione dell'attraversamento della BBB	20
L'optical imaging	24
Sezione 2: Applicazione delle nanoparticelle nella veicolazione e nel direccionamento di farmaci antitumorali	28
Leucemia linfoide cronica	31
Nutlin-3 come potenziale agente antitumorale	35
SCOPO del LAVORO	40
MATERIALI	42
METODI	51
Ingegnerizzazione dei polimeri	52
Derivatizzazione del PLGA 503 H con il peptide g7	53
Derivatizzazione del PLGA 503 H con il marker fluorescente DY-675	54
Sintesi del PLGA RG 502 H-Rodamina	55
Modifica della Rodamina B base in Rodamina B piperazinamide	55
Modifica del PLGA con Rodamina B piperazinamide	56
Preparazione delle nanoparticelle	56
Preparazione e recupero delle nanoparticelle PLGA-g7-DY-675 (nanoprecipitazione)	57
Preparazione di nanoparticelle polimeriche in emulsione semplice	57
Preparazione di nanoparticelle polimeriche in emulsione semplice per la veicolazione ed il direccionamento di Nutlin-3	58
Caratterizzazione dei sistemi nanoparticellari	61
Analisi dimensionale	61
Analisi della carica superficiale ($\text{pot-}\zeta$)	62
Analisi morfologica	64
Valutazione quali/quantitativa della coniugazione con Rituximab	64
Spettroscopia elettronica per analisi chimiche ESCA	65

Caratterizzazione delle nanoemulsioni _____	65
Determinazione del PVA residuo _____	65
Esperimenti in vitro ed in vivo _____	66
Esperimenti in vivo: optical imaging _____	67
Valutazione dei profili di eccitazione/emissione _____	67
Preparazione dei topi per gli esperimenti di optical imaging _____	67
Esperimenti in vivo _____	68
Studi in microscopia a fluorescenza _____	68
Esperimenti in vitro: nanoparticelle veicolanti il Nutlin-3 _____	69
Valutazione dell'efficienza di incapsulazione (EI) e del contenuto di Nutlin-3 nelle nanoparticelle _____	69
Linee cellulari e analisi dell'uptake delle nanoparticelle _____	70
Analisi della vitalità cellulare, dell'apoptosi e del ciclo cellulare _____	70
Analisi statistica _____	71
RISULTATI _____	72
Sezione 1: Applicazione delle nanoparticelle; visualizzazione in vivo di nanosistemi impiegati in diagnostica e nel rilascio di farmaci al sistema nervoso centrale _____	73
Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle PLGA-g7-DY-675 _____	73
Dimensioni e carica superficiale _____	73
Caratterizzazione morfologica _____	75
Profili di eccitazione ed emissione dei Polimeri _____	76
Somministrazione in vivo e studi di imaging _____	78
Studi di microscopia confocale e a fluorescenza _____	80
Sezione 2: Applicazione delle nanoparticelle nella veicolazione e nel direccionamento di farmaci antitumorali _____	83
Studi preliminari di ottimizzazione dei parametri formulativi: nanoparticelle ottenute per emulsione semplice _____	83
Nanoparticelle polimeriche per la veicolazione di Nutlin 3 _____	93
Caratterizzazione chimico-fisica delle nanoparticelle _____	93
Capacità di veicolare il farmaco; studi in vitro _____	99
CONCLUSIONI _____	103
BIBLIOGRAFIA _____	106

INTRODUZIONE

Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono sistemi colloidali sferici costituiti da macromolecole (polimeri naturali o sintetici) aventi dimensioni variabili fra i 10 e i 1000 nm [Fessi et al., 1992, Galindo-Rodriguez et al., 2004, Oppenheim 1981, Alonso 1996 e Schaffazick et al., 2003]. Con il termine nanoparticella si identificano due diversi tipi di sistemi; in virtù delle tecniche di preparazione e del polimero impiegato infatti è possibile ottenere strutture con caratteristiche diverse. Le nanocapsule sono sistemi a serbatoio caratterizzati da un core o fase interna di farmaco rivestito da una membrana polimerica, mentre le nanosfere sono strutture matriciali in cui il farmaco è uniformemente distribuito nel polimero [Parveen et al., 2012].

In generale, le nanoparticelle vengono allestite e studiate quali vettori per l'incapsulazione e il direccionamento selettivo di farmaci a tessuti e cellule target. Il caricamento del principio attivo dipendente dal processo di produzione, dalle caratteristiche chimico-fisiche del polimero e del farmaco e dal rapporto polimero/farmaco impiegati, può essere stabile o riferibile ad adsorbimento superficiale: l'adsorbimento non garantisce la protezione e stabilizzazione del farmaco che viene rapidamente desorbito in contatto con il fluido biologico [Mishra et al., 2010]. Il farmaco efficacemente incorporato o nel serbatoio (nanocapsule) o nella matrice (nanosfere) può essere rilasciato attraverso processi diffusivi (nanocapsule e nanosfere) e/o legati all'erosione del sistema (nanosfere allestite con polimeri biodegradabili) e/o influenzato dal rigonfiamento polimerico (nanosfere allestite con polimeri idrofili).

Rispetto ad altri tipi di vettori colloidali come i liposomi, le nanoparticelle presentano maggiore stabilità in vivo e migliorata capacità di modulazione del rilascio; sono sistemi versatili sia da un punto di vista applicativo (veicolazione di farmaci con caratteristiche diverse -farmaci sintetici, molecole naturali, materiale genico, diagnostici- e per più vie di somministrazione) che formulativo. Modulando alcuni dei parametri di preparazione o utilizzando differenti polimeri, si possono infatti ottenere profili di rilascio del farmaco differenti a seconda delle esigenze, da poche ore fino ad arrivare a giorni ed anche settimane [Parveen et al., 2012]. Le tecniche di preparazione oggi disponibili permettono di ottenere nanoparticelle di dimensioni comprese tra 50 e 250 nm, abili ad extravasare da capillari con più ampie fenestrazioni (come accade nei vasi in neoangiogenesi, nella crescita tumorale; effetto EPR) e penetrare il tessuto sottostante. Assieme al ridotto drenaggio linfatico tipicamente osservato nei tessuti tumorati, ciò si traduce nella possibilità di poter accumulare più efficacemente il principio attivo a livello tessuto bersaglio (targeting passivo) [Panyam et al., 2003].

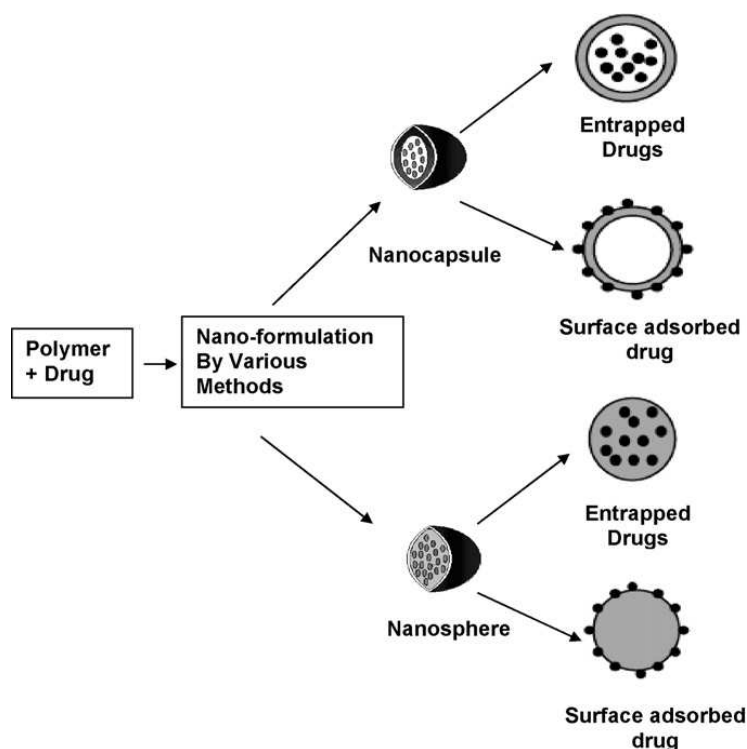


Figura 1: Rappresentazione schematica delle tipologie di nanoparticelle. Da un punto di vista dell'organizzazione dell'architettura polimerica il farmaco può trovarsi intrappolato all'interno dei nanosistemi od adsorbito sulla loro superficie.

La versatilità formulativa si esplica anche nella possibilità di attuare modifiche superficiali per stabilizzare e direzionare ancora più selettivamente (targeting cellulare, attivo) il sistema in vivo [Desai et al., 1997].

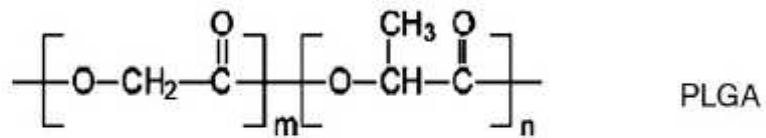
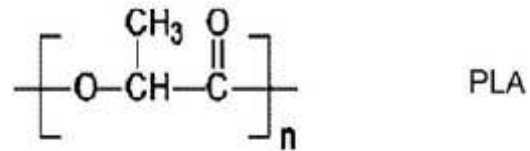
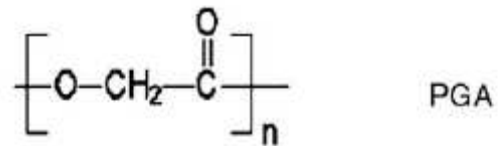
Per le loro caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche le nanoparticelle vengono utilizzate al fine di:

- Aumentare la stabilità dei farmaci nei liquidi biologici
- Aumentarne l'emivita nel circolo sanguigno
- Minimizzare gli effetti tossici
- Modificare la biodistribuzione del farmaco indirizzandolo solo al sito bersaglio
- Migliorare l'uptake cellulare sia in studi in vitro che in vivo

Nonostante le nanoparticelle siano state e siano ampiamente studiate da diversi anni e siano riconosciute come uno degli approcci più validi e promettenti per la veicolazione ed il direzionamento dei farmaci, solo poche formulazioni sono state recentemente immesse in commercio (es Abraxane) [Elzoghby et al., 2012 e Ernsting et al., 2012 e Feng et al., 2012]. L'impiego nel "drug delivery" è principalmente limitato dagli step richiesti per l'immissione in commercio, che prevedono la

dimostrazione della biodegradabilità -per evitare fenomeni di accumulo-, biocompatibilità -ovvero la valutazione della risposta dell'individuo alla somministrazione-, tossicità e purezza dei sistemi e dei polimeri costituenti, nonché dagli studi di stabilità, lunghi e complessi [Chaco et al., 1999 e Auvoillain et al., 1989]. L'impiego delle nanoparticelle è attualmente limitato al campo diagnostico in particolare alla diagnosi tumorale, specie nella valutazione della estensione della lesione [Yezhelyev et al., 2006].

È molto importante considerare le caratteristiche dei polimeri utilizzati, perché questi influenzano notevolmente l'applicabilità, nonché le proprietà chimico-fisiche dei sistemi. I polimeri maggiormente impiegati nell'allestimento di nanoparticelle sono di origine sintetica appartenenti alla classe dei poliacrilati, delle polianidridi e dei poliesteri alifatici. Tra i poliesteri i più utilizzati sono: l'acido poli-L-lattico (L-PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e il copolimero dei due monomeri acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA) [Soppimath et al., 200; Chacon et al., 1999]. Focalizziamo l'attenzione sul PLA e soprattutto sul PLGA.



Where m = number of units of lactic acid
 n = number of units of glycolic acid

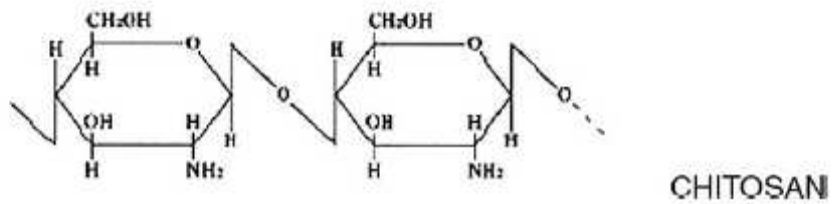
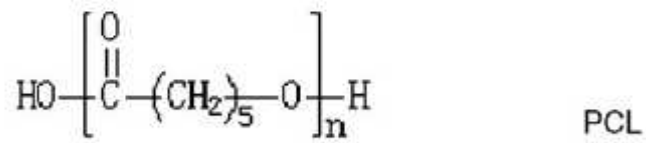


Figura 2: Polimeri maggiormente impiegati per l'allestimento di nanoparticelle.

PLA e PLGA

I derivati del PLA sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (US-FDA) per la somministrazione parenterale per uso umano in virtù della loro biodegradabilità e della atossicità dei prodotti di idrolisi [Hayes et al., 1996]. La biodegradazione procede con la degradazione dello scheletro polimerico per via chimica/enzimatica con formazione di derivati idrosolubili a basso peso molecolare che entrano nei normali cicli metabolici dell'organismo, in particolare il ciclo di Krebs, per essere poi eliminati sotto forma di anidride carbonica ed acqua. Il PLA presenta un'idrofobicità più spiccata rispetto al PLGA e tempi di degradazione abbastanza lunghi [Blanco et al., 2006]. Nel polimero PLGA, l'introduzione dei monomeri di acido glicolico aumenta l'idrofilia del polimero determinando un maggior richiamo d'acqua e una riduzione nei tempi di degradazione. Variando percentualmente il contenuto dei due monomeri, è possibile calibrare i tempi di degradazione in virtù delle somministrazioni richieste dalla terapia.

Anche la velocità di rilascio del farmaco dai sistemi nanoparticellari preparati con PLA o PLGA è strettamente dipendente, oltre che dalla diffusione attraverso la matrice polimerica (nanosfere) o la membrana polimerica (nanocapsule), dalla degradazione del polimero che è a sua volta influenzata da fattori tra cui il metodo di preparazione, la dimensione, la morfologia delle particelle, le proprietà intrinseche del polimero (il peso molecolare, la percentuale monomerica di uno e dell'altro monomero nel caso del PLGA, la cristallinità, la temperatura di transizione gommoso-vetrosa oTg) il pH, la temperatura e la forza ionica del mezzo e il sito di somministrazione correlato all'eventuale presenza di sistemi enzimatici. In generale si può affermare che la velocità di degradazione aumenta per polimeri a basso peso molecolare con caratteristiche di idrofilia e che si trovano allo stato amorfo. Non incide invece il processo di rigonfiamento.

La degradazione *in vivo* del PLA e del PLGA è evento complesso nel quale sono riconoscibili due momenti importanti; all'inizio del processo, infatti, si assiste ad un'importante diminuzione del peso molecolare del polimero, che degrada in oligomeri e monomeri senza una reale corrispondente diminuzione della massa; questo perché solo gli oligomeri e i monomeri solubili generati alla superficie del sistema riescono ad abbandonarlo, mentre quelli generati più profondamente rimangono intrappolati nel bulk. I prodotti di degradazione del polimero acidificano l'intorno con conseguente accelerazione del processo di degradazione che pertanto accelera nel tempo spostandosi prevalentemente all'interno del sistema [Abdelwahed et al., 2006], con abbattimento della massa del sistema stesso. Inoltre la natura acida delle unità monomeriche non è sempre favorevole al caricamento dei principi attivi (acidi o basi deboli) sensibili alle variazioni di pH, che vedono cambiare la loro solubilità. La velocità di degradazione del PLGA è influenzata dal rapporto tra monomeri (rapporto lattico-glicolico). Il PLGA caratterizzato da

un rapporto equimolare (50% D,L-acido lattico e 50% acido glicolico) degrada più facilmente del PLGA avente una netta prevalenza di acido lattico (ad esempio, 75% D,L-acido lattico e 25% acido glicolico) [Lemoine et al., 1996]. Oltre al rapporto tra acido lattico e acido glicolico vi sono altri parametri che influenzano profondamente la stabilità dei sistemi allestiti con tale polimero ed il rilascio dell'attivo, relazionabili al principio attivo (come il suo peso molecolare), ma anche alla formulazione (la presenza di modificazioni superficiali, di additivi) [Mittal et al., 2007].

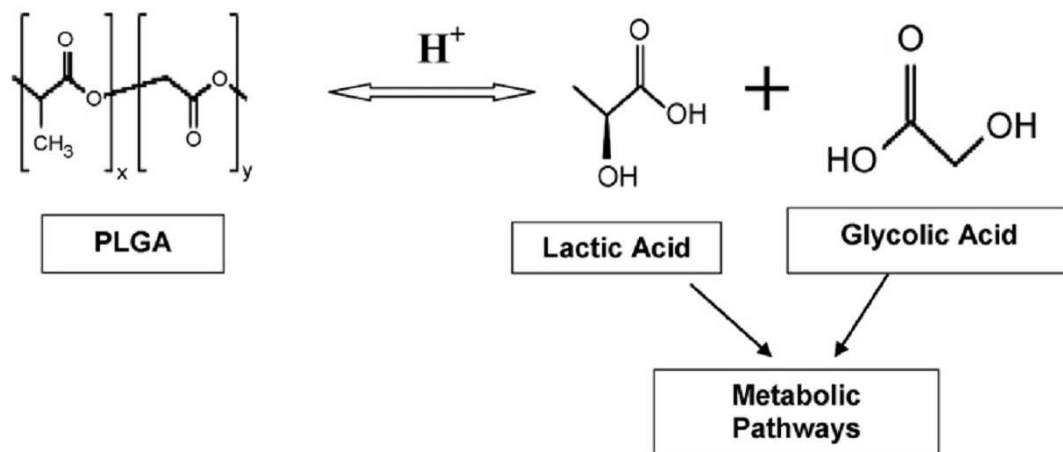


Figura 3: Idrolisi del PLGA [Kumari et al., 2010].

Preparazione delle nanoparticelle di PLGA

Durante l'ultimo ventennio diversi metodi sono stati studiati per la preparazione delle nanoparticelle. Tali procedure possono essere raggruppate in due gruppi principali:

- a) metodiche che richiedono la reazione di polimerizzazione partendo da unità monometriche,
- b) formulazioni ottenute mediante l'impiego di macromolecole o polimeri preformati di origine sintetica o naturale. L'impiego dei polimeri preformati è risultato più vantaggioso rispetto alle reazioni di polimerizzazione, anche per la vastità e versatilità dei polimeri oggi a disposizione. I procedimenti principalmente utilizzati sono: l'emulsione semplice, la doppia emulsione, il salting out e la nanoprecipitazione. In particolare, in questa sezione, verranno dettagliate la nano precipitazione e l'emulsione semplice utilizzate nella mia ricerca.

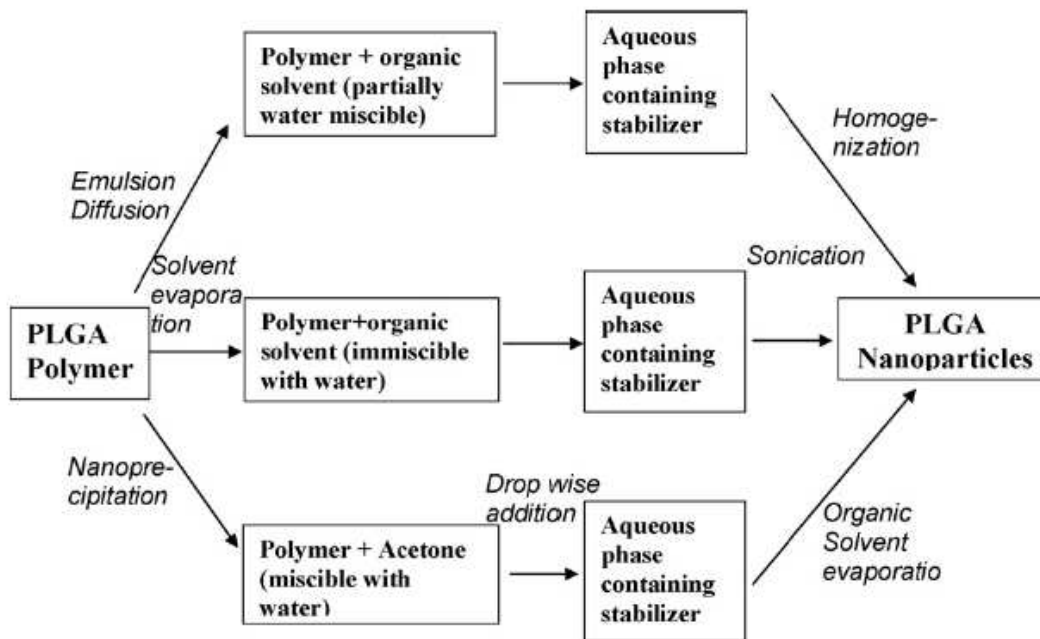


Figura 4: Rappresentazione schematica di alcune delle tecniche per l'allestimento di nanoparticelle che impiegano polimeri preformati.

Polimerizzazione: si riconosce la polimerizzazione per addizione o in situ e la polimerizzazione interfacciale-policondensazione interfacciale.

La polimerizzazione per addizione od in situ, è caratterizzata dalla dispersione del monomero in un'emulsione od in una microemulsione inversa o ancora in una fase nella quale il monomero è solubile. Il processo di polimerizzazione può iniziare con meccanismi differenti sfruttando un catalizzatore che generalmente è rappresentato da uno ione o da un radicale libero o per formazione di un radicale libero mediante l'ausilio di una reazione ad alta energia provocata da radiazioni γ , ultravioletta o visibile. La fase di formazione delle nanoparticelle può iniziare in qualsiasi momento indipendentemente dalla avvenuta completa polimerizzazione. Il limite principale è rappresentato dalla difficoltà nella purificazione delle nanoparticelle dai catalizzatori, dai monomeri liberi e dai solventi organici impiegati nella formulazione.

La polimerizzazione interfacciale può avvenire sia con che in assenza di catalizzatore; la polimerizzazione è estremamente veloce. In questo caso uno monomero è solubilizzato nella fase acquosa interna, mentre il secondo è addizionato alla fase continua costituita dal solvente organico. L'emulsione (normalmente A/O) permette al monomero presente nella fase acquosa (con buona capacità di ripartizione in fase organica) di posizionarsi all'interfaccia tra le due fasi dando origine alla polimerizzazione una volta entrato in contatto con il monomero disciolto in fase organica. Con tale metodica si ottiene un'alta efficienza di incapsulazione [Couvreur et al., 2002], pur impiegando grandi quantitativi di solventi organici che dovranno poi essere allontanati. Il processo di

policondensazione interfacciale è stato descritto per la formazione di nanoparticelle a base di polimeri lipofili (ad es. ftaloilcloruri, dietilentriammina) in presenza od assenza di tensioattivi. Anche in questo caso i monomeri costituenti il polimero sono stati solubilizzati in due solventi tra loro immiscibili (ad es. dicloruro acido in tetracloroetano e diammina in acqua). Il polimero si forma all'interfaccia generando nanoparticelle di dimensioni inferiori ai 500 nm.

Nanoprecipitazione: La nanoprecipitazione nota anche come metodo dell'allontanamento del solvente è stata per la prima volta sviluppata e brevettata da Fessi e collaboratori nel 1989 [Fessi et al., 1989]. Tale tecnica prevede la solubilizzazione del polimero preformato in una soluzione organica miscibile con acqua; la soluzione organica è addizionata alla fase acquosa (in presenza od assenza di un surfattante) e la diffusione del solvente organico provoca la diminuzione della solubilità del polimero e la formazione delle nanoparticelle [Quintanar-Guerrero et al., 1998]. Tale metodica è stata applicata impiegando diversi polimeri quali: PLGA [Rao and Geckeler, 2011], policaprolattoni (PCL) [Dash and Konkimalla 2012], e poly(methyl vinyl ether-comaleicanhydride) (PVM/MA) [Irache et al., 2005, Arbo's et al., 2002, Camacho et al., 2011], ma anche derivati della cellulosa e policaprolattoni [Ekins and Xu, 2009]. Viene utilizzata con successo nella incapsulazione di molecole lipofile, con efficienze di incapsulazione anche prossime al 98% [Memisoglu et al., 2003]; è una tecnica semplice e riproducibile, non sono richieste agitazioni o sonicazioni prolungate come pure temperature elevate, tutte caratteristiche che possono portare alla degradazione del principio attivo. La formazione di nanoparticelle è istantanea e con diametri ridotti attestati sui 200 nm. I limiti sono da ricercarsi nell'impiego esclusivo di solventi miscibili con soluzioni acquose [Dimitrova et al., 1998] e nella difficoltà e costi della purificazione.

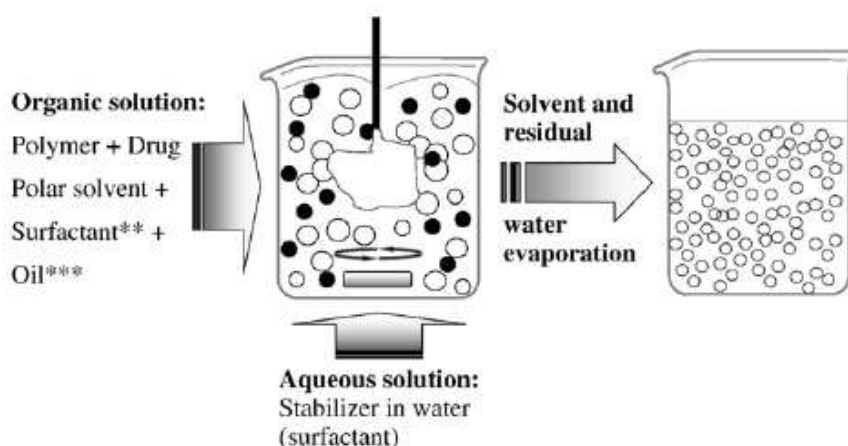


Figura 5: Rappresentazione schematica della tecnica della nano precipitazione.

Emulsione semplice (o singola emulsione): Il principio si basa sulla formazione stabile di un'emulsione O/A o A/O in funzione delle esigenze di formulazione. La tecnica in realtà risulta più adatta alla formulazione partendo da polimeri e farmaci idrofobi, pertanto da emulsioni O/A, anche per la semplicità operativa del procedimento di allestimento e della strumentazione richiesta [Huang and Ghebre-Sellassie, 1989]. L'emulsione semplice, nota anche come tecnica dell'emulsione ed allontanamento del solvente, venne impiegata per la prima volta da Beck e collaboratori nel 1979 per incapsulare il progesterone [Beck et al., 1979]; questa metodica prevede la dissoluzione del polimero in un solvente organico immiscibile con la fase acquosa, tra i più impiegati cloruro di metilene, diclorometano, cloroformio ed etilacetato; i polimeri maggiormente impiegati sono il PLGA, il PLA, i policaprolattone (PCL), l'etilcellulosa, il poliidrossibutirrato e la cellulosa acetato ftalato [Lemarchand et al., 2006]. Il principio attivo viene solubilizzato o finemente disperso nella soluzione polimerica che viene emulsionata in soluzione acquosa contenente un agente tensivante (emulsione O/A); tra i tensioattivi maggiormente impiegati vi è il PVA, l'idrossipropilmetil cellulosa (HMPC), la metilcellulosa (MeC), il sodio oleato (SO), il polisorbato-80, la gelatina e il poloxamer-188 [Soppimath et al., 2001]. L'emulsione viene allestita con l'ausilio di sonicatori (sonde sonicanti) o di ultraomogeneizzatori, in virtù delle dimensioni. Successivamente, si procede all'allontanamento del solvente organico mediante l'impiego di agitazione magnetica; spesso questa fase avviene con controllo della temperatura oppure sotto pressione. L'allontanamento del solvente provoca la precipitazione del polimero sotto forma di nanoparticelle; si ottengono nanosfere accanto a nanocapsule; le dimensioni nanometriche spesso non permettono una efficace definizione dei sistemi dove il farmaco si può ritrovare finemente disperso nella matrice polimerica (nanosfera) o nel core centrale (nanocapsula) [Parveen et al., 2012]. Agendo sulla velocità di agitazione/parametri di emulsione, sulla viscosità della soluzione acquosa, sui volumi delle fasi, sulla temperatura, sul tipo e concentrazione del tensioattivo si può determinare una riduzione od un aumento nel diametro medio delle nanoparticelle ed un controllo del processo di produzione [Tice and Gilley, 1995]. Così come descritta, tale tecnica trova impiego principalmente nella veicolazione di farmaci lipofili, tra questi si ricordano: β -estradiolo [Birnbaum et al., 1998], cisplatino [Garcia-Contreras et al., 1997], 5-fluorouracile [Dunn, 1991], albumina bovina sierica [Guo, 1994; Landry et al., 1996], doxorubicina [Juni et al., 1985; Tewes et al., 2007], clonazepam [Benelli et al., 1998], desametasone [Song et al., 1997], clorpromazide [Suzuki and Price, 1985], nifedipina [Sansdrap and Moes, 1993, 1998], prometazina [Cha et al., 1989], tumor necros factor α (TNF- α) [Iwata et al., 1998], anestetici locali [Wakiyama et al., 1982a e b], steroidi [Cavalier et al., 1986], testosterone [Gurny et al., 1981], bleomicina solfato [Juni et al., 1985], calcitonina [Mehta et al., 1994 e Jeyanthi et al., 1997], ciclosporina A [Jaiswal et al., 2004 e Sanchez et al., 1993], indometacina [Bodmeier and Chen, 1990],

praziquantel [Mainardes and Evangelista, 2005], acidi nucleici [Prabha et al., 2002] e loperamide [Ueda and Kreuter 1997].

Tra i vantaggi di questa metodica spicca la rapidità e la facilità nell'esecuzione, la possibilità di incorporare con alte efficienze farmaci lipofili o con buon coefficiente di ripartizione O/A. Gli attivi idrosolubili, vengono invece più efficacemente incapsulati mediante la tecnica della doppia emulsione. Una limitazione all'impiego di questa tecnica risiede nella necessità di utilizzare elevate velocità di sonicazione o di omogenizzazione per ottenere nanoemulsioni stabili, che possono determinare degradazioni a livello della struttura nanoparticellare o del farmaco; da qui l'esigenza di studiare accuratamente i parametri formulativi.

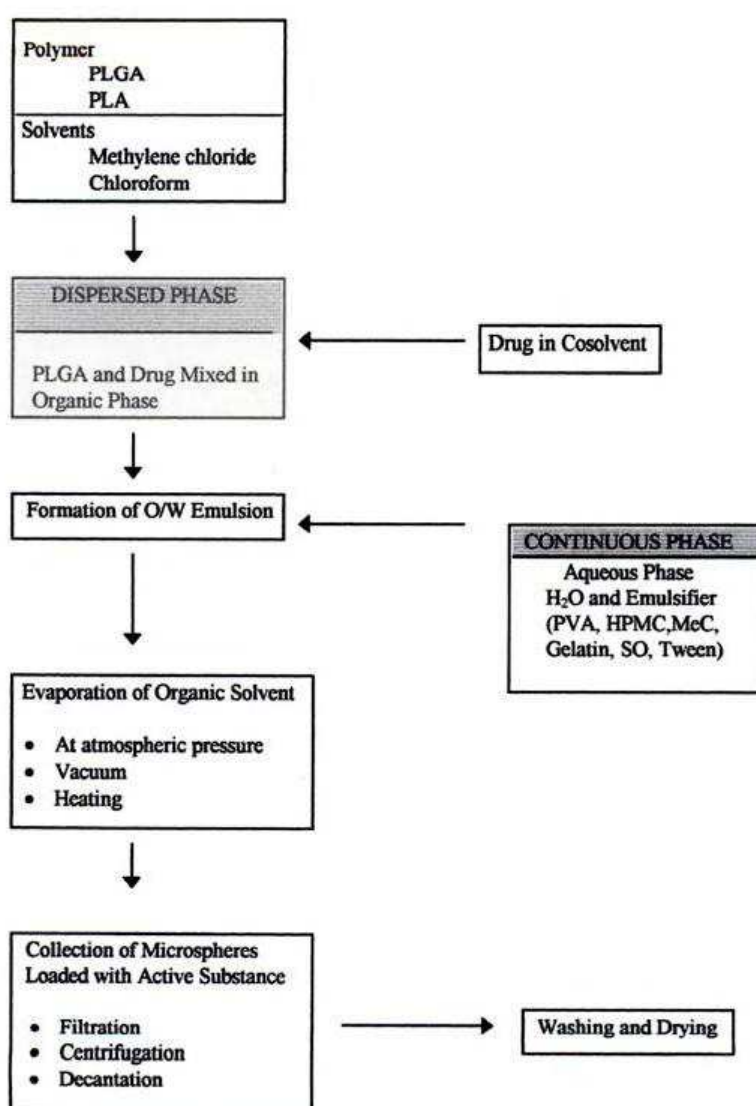


Figura 6: Schematizzazione delle fasi che portano all'allestimento delle nanoparticelle mediante la tecnica dell'emulsione semplice.

Doppia emulsione: *il primo articolo scientifico in cui viene riportata la tecnica della doppia emulsione risale ai primi del 1900 [Seifriz, 1925]; l'applicazione alla formulazione di nanoparticelle risale però agli anni '90 [Blanco and Alonso, 1997 e Lemoine and Pr eat, 1998 e Tob io et al., 1998] dove vengono impiegati omogenizzatori o sonicatori che guidano la formazione di sistemi nanoometrici. L'impiego e l'ottimizzazione di tale tecnica ha portato alla incapsulazione di farmaci idrofili (emulsione A/O/A), notoriamente pi  difficili da stabilizzare nei sistemi di rilascio, sostituendo in buona misura la formulazione per polimerizzazione che mostrava problemi legati alla purificazione [Lamprecht et al., 2000]. Per il caricamento di farmaci idrofili, ci si riferisce alla doppia emulsione A/O/A; con riferimento al polimero oggetto del mio studio, il PLGA, inizialmente si allestisce l'emulsione interna A/O solubilizzando il farmaco in fase acquosa e il polimero in fase organica. Tale emulsione viene a sua volta emulsionata con una fase acquosa che rappresenta la fase continua o fase disperdente. Vengono usati tensioattivi per stabilizzare sia l'emulsione A/O che la doppia A/O/A [Van der Graff et al., 2005]; tra i pi  impiegati il PVA, il poloxamero 188 o il poloxamero 331 [Blanco and Alonso, 1998]. La diffusione del principio attivo dalla fase interna acquosa alla fase disperdente (secondo gradiente che porta l'attivo a diffondere e migrare dalla fase interna all'interfaccia esterna),   limitato dalla presenza del solvente organico, che progressivamente sotto agitazione, viene allontanato provocando la precipitazione del polimero sul farmaco [Garti, 1998; Magdassi and Garti 1986]. Lo step critico delle formulazione   perci  rappresentato dalla modulazione del processo diffusivo, giocando sulle caratteristiche del polimero, delle emulsioni (volumi, viscosit , presenza di tensioattivi, concentrazioni etc) e del principio attivo stesso [Grossiord et al., 1998; Magdassi et al., 1984]. Inoltre la doppia emulsione   un sistema termodinamicamente instabile con una forte tendenza alla coalescenza, alla flocculazione o a fenomeni di creaming [Florence et Whitehill, 1981].*

Salting out: *L'allestimento di nanosfere ottenute mediante la tecnica del salting out   riferito alla fine degli anni '80 [Allémann, 1989]; successivamente tale tecnica   stata perfezionata da Leroux [Leroux, 1996]; entrambi i ricercatori si erano basati su uno studio precedente [Bindschaedler et al., 1988] che aveva portato ad un brevetto per una nuova procedura nell'allestimento di pseudolatex. Tale tecnica viene considerata come una modificazione della tecnica dell'emulsione semplice. Per prima cosa il polimero ed il principio attivo vengono solubilizzati in un solvente miscibile con l'acqua come l'acetone, la soluzione ottenuta viene emulsionata mediante elevata agitazione magnetica in un gel acquoso contenente l'agente "salting-out" (generalmente elettroliti come acetato di magnesio, cloruro di magnesio e calcio cloruro od in alternativa non-elettroliti come gli zuccheri, ed anche uno stabilizzante colloidale gelatina, gomma arabica, PVP, carbossimetilcellulosa, idrossietilcellulosa). La formazione delle nanosfere avviene per la diffusione dell'acetone nella fase acquosa, promossa dall'aggiunta di acqua o di soluzione tamponata all'emulsione olio/acqua ottenuta mediante agitazione magnetica. Successivamente si procede all'eliminazione del solvente e dell'agente salting-out mediante filtrazione cross-flow [Pinto Reis et al., 2006 e Quintanar-Guerrero et al., 1998]. I polimeri generalmente impiegati con questa metodica sono: il PLGA, il PLA, l'etilcellulosa e gli acidi metacrilici; i farmaci che vengono efficacemente caricati sono esclusivamente di natura lipofilica [Allémann et al., 1993; Leroux et al., 1995]. Tale tecnica mostra limiti nell'incapsulazione di*

farmaci lipofili e la possibile formazione di aggregati di durante la diffusione del solvente attraverso la fase acquosa dovuta alla comparsa di turbolenze interfacciali [Couvreur et al., 1995].

I tensiattivi

Di particolare importanza ai fini della formulazione e stabilità dei sistemi nanoparticellari è la scelta del tensioattivo, che gioca un ruolo fondamentale nella stabilizzazione delle emulsioni e del sistema in formazione nonché nel prevenire fenomeni di instabilità del carrier neoformato (vedi l'aggregazione, paragrafi successivi). Volendo discutere l'azione nella formulazione del sistema, il tensioattivo influenza direttamente alcune proprietà delle nanoparticelle come il diametro particellare, la struttura e la stabilità delle nano-emulsioni, l'intorno ionico nonché il caricamento e il rilascio del farmaco. Da un punto di vista chimico-fisico, le sostanze tensioattive variano l'angolo di contatto con una superficie solida, la tensione interfacciale con un altro liquido, l'indice di rifrazione (producendo opalescenza) e la viscosità. Nel caso di emulsioni, il tensioattivo agisce favorendo la miscelazione di due liquidi immiscibili tra di loro, riducendo notevolmente la tensione interfacciale e di conseguenza l'energia libera del sistema (con riferimento alla regola di Bancroft) .

La natura e la concentrazione del tensioattivo devono essere attentamente valutati ed ottimizzati. Per prevedere l'azione prodotta da un tensioattivo sulla dispersione di due liquidi immiscibili viene impiegata la teoria di Bancroft [Durand and Marie, 2009] che prevede che la fase continua sia quella in cui il tensioattivo risulti maggiormente solubile. La regola di Bancroft, trova il suo fondamento teorico ove si consideri che l'abbassamento della tensione superficiale di un liquido ne favorisce la frammentazione in gocce; pertanto, miscelando insieme due liquidi immiscibili la presenza di un tensioattivo ridurrà in misura minore la tensione superficiale del liquido in cui risulta più solubile e sarà dunque questo che si comporterà da fase esterna. Alla luce di quanto esposto si evince che un parametro fondamentale nella formulazione è rappresentato dalla tensione superficiale. Quando infatti due liquidi immiscibili fra di loro vengono agitati essi si frazionano in tante entità disperse generando un aumento della superficie dei due liquidi a contatto. Questo aumento della superficie è direttamente proporzionale ad un aumento di energia che viene fornita dall'agitazione meccanica che ha provocato il partizionamento delle due fasi. Appena però cessa l'energia meccanica fornita le due fasi tornano a separarsi. Il lavoro (W) necessario per la formazione dell'emulsione è rappresentato dalla seguente uguaglianza:

$$W = \gamma * \Delta S$$

Dove γ è la tensione interfacciale e ΔS è l'aumento della superficie totale W è espresso in erg nel sistema GS, in Joule nel SI, o in calorie. L'unica variabile quindi a parità di dispersione fra le due fasi è rappresentata dalla tensione superficiale. Tale parametro rappresenta la forze che deve essere vinta per ottenere la miscelazione di due liquidi immiscibili tra di loro ed è proprio su di esso che i tensioattivi vanno ad esplicare la loro attività, riducendo notevolmente la tensione interfacciale e di conseguenza l'energia libera del sistema.

Per un impiego razionale dei tensioattivi, è ovvia l'importanza di determinare quantitativamente il rapporto fra le porzioni polari (idrofile) e apolari (lipofile). Questo rapporto prende il nome di HLB (acronimo di: Hydrophylic – Lipophylic - Balance: Bilanciamento - Idrofilico - Lipofilico) ed è stato definito nel 1950 da William Griffin, come il rapporto tra il peso molecolare della parte idrofila e quello di tutta la molecola del tensioattivo, diviso per 5 e moltiplicato per 100 [Florence and Whitehill, 1982]. I tensioattivi possono essere classificati proprio in virtù del valore di HLB che appunto riporta la relativa affinità per la fase acquosa o organica. Surfattanti lipofili hanno bassi HLB (inferiori a 10) e sono ottimi agenti umettanti e antischiuma, mentre tensioattivi idrofili (con HLB maggiori di 10) sono ottimi emulsivanti e solubilizzanti. Tensioattivi con elevato valore di HLB formano prevalentemente emulsione O/A o emulsione multiple A/O/A.

Nei metodi sopracitati, sono spesso richieste elevate quantità di tensioattivi per formulare e stabilizzare il sistema. Tra i tensioattivi più utilizzati vi è il polivinil alcool (PVA) [Lee et al., 1999; Shakesheff et al., 1997]. Il PVA è un eccellente emulsionante e mostra buone proprietà adesive. Esso permette di ottenere nanoparticelle stabili, di piccole dimensioni e popolazioni particellari con diametri medi ravvicinati [Sahoo et al., 2002]. E' dimostrato che il PVA forma una sorta di coating sulla superficie delle nanoparticelle, difficile da rimuovere anche a seguito di ripetuti lavaggi aumentando la stabilità e la resistenza al congelamento tanto da evitare in alcune formulazioni l'ausilio di un crioprotettore se impiegato in un range di concentrazioni che va dal 2,5% al 5% [Abdelwahed et al., 2006]. Se da un lato il coating preserva il sistema riducendo l'aggregazione e migliorandone l'emivita plasmatica (il coating idrofilico facilita l'escape macrofagico), dall'altro aumenta la tossicità dei sistemi. Il PVA infatti è potenzialmente carcinogenico e la sua emivita plasmatica aumenta con il peso molecolare; quindi la scelta del peso molecolare del PVA così come di ridurre il più possibile la quantità impiegata e la quantità residua (attraverso tecniche di purificazione opportune) è stringente [Zambaux al., 1998]

Per cercare di spiegare come il PVA stabilizza l'emulsione occorre considerare il suo carattere anfifilico; infatti, grazie alla contemporanea presenza dei gruppi acetato (parte idrofobica) e dei gruppi ossidrilici (parte idrofila) il PVA rimane localizzato all'interfaccia liquido-liquido riducendo quindi in maniera efficace la tensione interfacciale e promuovendo la formazione di sistemi dispersi [Galindo-Rodriguez et al., 2004]. Non solo, proprio per la sua natura e per la "affinità relativa" al solvente organico, può, nella formazione di sistemi polimerici compenetrare e miscelarsi alle catene del polimero durante la formazione, con relativa alterazione (intesa come compressione o l'espansione) della gocciolina emulsionata, che si traduce in un aumento dell'energia delle interazioni polimero/polimero attraverso l'interfaccia determinando quindi la sua stabilizzazione [Boury et al., 1995]

Oltre al PVA vengono comunemente utilizzati i polisorbati o TWEEN (il nome deriva dalla contrazione del nome chimico: polioSSI-etilen-sorbitan-mono-stearato) che sono gli unici ad oggi a poter essere impiegati per preparazioni iniettive in quanto non pirogeni, non emolitici, non irritanti. Accanto ai Tween ricordiamo anche i copolimeri tra polioSSietilene e polioSSipropilene, come i Pluronic (PEG-PPG-PEG), o i Pluronic reverse (PPG-PEG-PPG). Questi tensioattivi (PEG = polietilenglicole, PPG = polipropilenglicole) hanno notevole affinità per la fase acquosa.

Stabilità delle nanoparticelle

La stabilità delle nanoparticelle, sia durante la conservazione che durante la somministrazione è un aspetto che deve essere indagato quando si propone il loro utilizzo per la somministrazione di attivi terapeutici.

Anche se più stabili rispetto ad altri sistemi di rilascio come i liposomi, le nanoparticelle hanno tendenza all'aggregazione se conservate in sospensione, così come perdere il farmaco incapsulato che tende a essere ceduto per gradiente. Diversi fattori possono influenzare la stabilità alla conservazione, alcuni dipendenti dalla formulazione ed altri dall'ambiente di stoccaggio. Sulla formulazione nanoparticellare andranno perciò condotti studi tesi a valutare LA STABILITÀ CHIMICA (ad esempio testando la velocità di degradazione e solubilizzazione del polimero) e LA STABILITÀ FISICA (la tendenza alla sedimentazione e all'aggregazione della sospensione nanoparticellare, così come alla formazione di cristalli) [Wu et al., 2011].

La stabilità chimica può essere influenzata dal pH del mezzo; in riferimento al polimero oggetto dei nostri studi, sappiamo che il PLGA è sufficientemente stabile ad una temperatura di 4°C in un tampone acquoso a pH fisiologico, mentre appare instabile in ambiente acido e alcalino (reazione auto-catalitica in ambiente acido). Il pH sia di preparazione che di conservazione influenza notevolmente anche la stabilità del farmaco; poiché molti farmaci hanno una degradazione pH dipendente è spesso indispensabile lavorare ad un pH controllato. Anche la temperatura di stoccaggio è un parametro importante; riguardo a questa variabile sono stati effettuati alcuni studi specifici su nanoparticelle di PLA e PLGA; sono riportati risultati discordanti soprattutto sulla conservazione a temperature superiori a 10°C, anche se sembra che la conservazione a 4°C sia sempre auspicabile [Abdelwahed et al., 2006].

Per quel che riguarda la stabilità fisica, più che problemi di sedimentazione, limitati dalla dimensione nanoparticellare e soprattutto dalla presenza di tensioattivi e viscosizzanti nell'ambiente di preparazione che bilancia la densità del sistema nanoparticellare con quella del mezzo [Wu et al., 2011], i preparati tendono all'aggregazione. Infatti, l'elevata area superficiale che caratterizza le nanoparticelle porta ad un incremento dell'energia superficiale, evento termodinamicamente sfavorevole. Per minimizzare questo parametro le

nanoparticelle tendono all'aggregazione, evento responsabile di una serie di problematiche legate alla stabilità formulativa. Per evitare l'aggregazione le nanoparticelle possono giocare sulla repulsione elettrostatica e quindi sulla carica superficiale e/o sulla stabilizzazione sterica [Rabinow, 2004]) per aggiunta di stabilizzanti ionici e non ionici al mezzo, rispettivamente. I tensioattivi che vengono utilizzati per stabilizzare le emulsioni O/A o A/O/A (che sono alla base di diverse metodiche di allestimento di nanoparticelle) e che abbassando la tensione superficiale, facilitando la dispersione stabile delle goccioline nella fase disperdente, possono divenire altrettanto importanti quali stabilizzanti all'aggregazione del sistema, una volta consolidato, in sospensione [Kim et al., 2004]. In particolare la stabilizzazione sterica è legata all'uso di tensioattivi, soprattutto non ionici, ed in particolare alla frazione di tensioattivo che rimane adsorbito sulla superficie del sistema, che dovrà coprire la nanoparticella in modo stabile minimizzando le interazioni inter-particellari, vincendo le forze attrattive. La sensibilità alle variazioni di temperatura del tensioattivo così come le concentrazioni spesso elevate (e pertanto tossiche) richieste per ottenere l'azione rappresentano il limite principale dell'impiego di tensioattivi non ionici nella stabilizzazione delle nanoparticelle. Lo sviluppo dei cristalli in una sospensione colloidale è responsabile dei cambiamenti nella dimensione e nella distribuzione dimensionale delle nanoparticelle. Particelle con piccoli diametri sono maggiormente solubili rispetto a quelle più grandi, e ciò è responsabile della creazione di un gradiente di concentrazione tra le due popolazioni dimensionalmente differenti; di conseguenza le molecole diffondono dalla zona a maggiore concentrazione (dove si trovano le più piccole) verso la zona a concentrazione minore. Questo evento genera una soluzione super-satura intorno alle particelle più grandi che si traduce nell'instaurarsi di cristallizzazione, e nel contempo è responsabile della dissoluzione del farmaco (presente nelle particelle più piccole) nel mezzo. Il processo continua fino a quando tutte le particelle più piccole vengono dissolte. Questo aumento del numero di nanoparticelle di grandi dimensioni, a spese delle più piccole, spiega l'alterazione del diametro e della distribuzione dimensionale dei campioni [Wu et al., 2011]. Anche in questo caso, l'impiego di tensioattivi minimizza il fenomeno [Tadros et al., 2005], in quanto, adsorbiti sulla superficie del nanosistema hanno la capacità di ridurre la tensione interfacciale tra le nanoparticelle e il mezzo della preparazione limitando la formazione dei cristalli. Ovviamente anche l'agitazione meccanica e la temperatura influenzano tale processo.

Accanto alla stabilità durante lo stoccaggio, un aspetto importante è rappresentato dalla stabilità alla somministrazione e dalla valutazione dell'interazione con i componenti del sangue, che spesso induce trasformazioni nel sistema che viene rapidamente allontanato dal circolo.

Il tempo di circolazione delle nanoparticelle in vivo è influenzato infatti da molti fattori quali la distribuzione dimensionale delle popolazioni costituenti il sistema e dalla loro carica superficiale, che insieme influenzano il grado di interazione del sistema stesso con le proteine sieriche [Lu et al., 2011]. L'adsorbimento proteico è un fattore chiave nel destino delle nanoparticelle che culmina con l'opsonizzazione e la conseguente fagocitosi da parte dei macrofagi del sistema reticolo endoteliale, sia a livello circolatorio che in alcuni tessuti come il fegato e la milza. Inoltre l'adsorbimento da parte delle proteine sieriche può indurre un rilascio

premature del farmaco dal sistema a causa di un effetto di partizionamento che avviene prima che lo stesso arrivi al sito target [Lu et al., 2011].

Liofilizzazione

La strategia più utilizzata per migliorare la stabilità chimico-fisica di una sospensione nanoparticellare si basa sulla trasformazione della stessa in una forma solida anidra tramite la liofilizzazione. La liofilizzazione è una tecnica di essiccazione che permette di ottenere, partendo da una soluzione, un polvere secca, con elevata superficie specifica, facile da maneggiare e conservare nonché velocemente risospesibile. In alcuni casi la completa risospensione del liofilizzato nanoparticellare è migliorata dall'impiego di ultrasuoni (sonicazione). La tecnica della liofilizzazione prevede il congelamento della sospensione e la successiva eliminazione del suo contenuto di acqua attraverso il processo di sublimazione sotto vuoto.

Le condizioni di congelamento della formulazione, nonché i parametri di liofilizzazione devono essere accuratamente ottimizzati; in particolare la fase di congelamento deve essere tale da impedire la formazione di cristalli di grandi dimensioni che potrebbero destabilizzare e rompere il sistema; in generale, un congelamento istantaneo porta alla formazione di cristalli di ghiaccio che si producono simultaneamente in tutte le parti del preparato e si ottengono cristalli piccoli e distribuiti uniformemente.

Talvolta la presenza di tracce di tensioattivi nella formulazione aiuta la risospesibilità delle nanoparticelle liofilizzate; ad esempio il PVA ha un duplice meccanismo di stabilizzazione, che sovente, non rende necessario l'utilizzo di un protettore: infatti mentre il tensioattivo adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle previene l'aggregazione, le tracce presenti in soluzione formano una matrice vetrosa, che riduce lo stress meccanico causato dai cristalli di ghiaccio [Abdelwahed et al., 2006]. Notoriamente è però richiesta l'aggiunta di crioprotettori per ottenere una efficace stabilizzazione della formulazione durante il congelamento e la successiva liofilizzazione, portando ad un prodotto stabile non alterato.

I crioprotettori più utilizzati in ambito tecnologico-farmaceutico sono il glucosio, il trealosio, il mannitolo, il sorbitolo ed il saccarosio; tali crioprotettori sono in grado di proteggere le strutture nanoparticellari da aggregazione e fusione durante il processo di liofilizzazione formando una struttura vetrosa amorfa durante il congelamento (vetrificazione della sospensione), attorno alla nanoparticella che previene i danni meccanici durante la formazione dei cristalli di ghiaccio. In più aumentano la viscosità del preparato, proteggendolo dalla perdita di principio attivo. È anche importante essere a conoscenza della presenza di ulteriori eccipienti farmaceutici, solitamente usati ad esempio per scopi di isotonicità

(glucosio). Tali eccipienti possono fungere da crioprotettori che facilitano la ricostituzione acquosa del prodotto liofilizzato [Pinto Reis et al., 2006].

In generale possiamo dire che i vantaggi del processo di liofilizzazione su sistemi nanoparticellari sono riconducibili alla scarsa perdita di attivo durante il processo di essiccamento, al mantenimento dell'attività del liofilizzato rispetto al prodotto di partenza, così come al miglioramento di alcuni parametri formulativi quali la re-idratabilità e la ri-sospensibilità, mentre gli svantaggi sono principalmente legati al costo e ai lunghi tempi di processo (almeno 24 ore).

Quando le nanoparticelle sono allestite in solventi non acquosi la liofilizzazione non viene applicata; in questi casi si cerca di stabilizzare il sistema ingegnerizzando la superficie o impiegando surfattanti e tensioattivi, un esempio è rappresentato dalle formulazioni di nanoparticelle per spray nasali (MDI) sospese in un propellente come l'HFA.

Sezione 1: Applicazione delle nanoparticelle; visualizzazione in vivo di nanosistemi impiegati in diagnostica e nel rilascio di farmaci al sistema nervoso centrale

Questa prima applicazione si inserisce in una ricerca iniziata circa 6 anni fa dai ricercatori del gruppo di tecnologia di Modena presso il quale ho condotto i miei studi; tali ricercatori hanno progettato ed ottimizzato nanoparticelle polimeriche modificate in superficie e direzionate al cervello. Attraverso la coniugazione del polimero con molecole fluorescenti è stato possibile studiare ed apprezzare il direzionamento oltre barriera ematoencefalica, su sezioni cerebrali di animali trattati con i nanosistemi e successivamente sacrificati. Le procedure sperimentali adottate hanno permesso di indagare la distribuzione delle nanoparticelle all'interno dei diversi organi e tessuti, ma non la visualizzazione e nemmeno la cinetica delle nanoparticelle dopo somministrazione in vivo. Da qui l'esigenza di formulare un sistema tracciabile con tecniche di optical imaging.

Stato dell'arte: nanoparticelle di PLGA modificate con g7 e con molecole fluorescenti; valutazione dell'attraversamento della BBB

Nanoparticelle polimeriche di PLGA sono state modificate con un ligando selettivo per la BBB. Il rationale che ha guidato il progetto si inserisce nella "chimeric peptide technology" [Pardridge, 2002; Brasnjevic et al., 2009] e nasce dalle conoscenze di specifici meccanismi di passaggio della BBB di determinate sostanze: è noto infatti che una serie di peptidi oppioidi superano la BBB ed in particolare l'MMP-2200 (H2N-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Ser-

O-b-D-lattosio-CONH₂) che è stato considerato come molecola base per la modifica. Questo peptide ha un effetto oppioide derivante dalla presenza al terminale amminico della sequenza aminoacidica, dell'aminoacido tirosina (Tyr). Partendo da tale molecola base i ricercatori del TeFarTI hanno sintetizzato un analogo peptidico (si tratta di un eptapeptide) sostituendo la tirosina con una molecola di fenilalanina (Phe) per evitare l'effetto oppioide; quindi hanno modificato con diversi carboidrati all'ossidrilica della serina, dal momento che è risaputo che la presenza di residui zuccherini può incrementare l'accesso attraverso la BEE. [constatando che il glucosio è lo zucchero più efficace per promuovere ed aumentare la disponibilità al CNS]. Quindi i ricercatori hanno coniugato il PLGA con una serie di peptidi. Parallelamente, il PLGA è stato modificato con dei fluorocromi così da ottenere un polimero visualizzabile, utilizzando microscopie a fluorescenza e confocale. Dopo somministrazione tramite perfusione cerebrale (In situ Brain Perfusion Technique") in ratti, le nanoparticelle costituite da una miscela di PLGA modificato con peptidi e PLGA marcato con fluorocromi, hanno fornito importanti risultati in termini di distribuzione e di abilità nel passaggio attraverso la BEE. Le nanoparticelle preparate con PLGA non modificato non superavano la BBB, mentre nanoparticelle ottenute con PLGA modificato, grazie alla presenza del peptide esposto sulla superficie delle nanoparticelle, si sono rivelate molto abili nell'attraversamento. Dopo somministrazione in vena femorale, le nanoparticelle modificate dopo 30 min rimanevano localizzate a livello delle cellule del sistema reticolo endoteliale del fegato e della milza, a conferma di un'importante captazione da parte dei macrofagi nei confronti delle nanoparticelle. Le stesse nanoparticelle però, dopo 60 min, vengono localizzate anche a livello del parenchima cerebrale, dimostrando di essere in grado di bypassare l'uptake macrofagico e, attraverso la circolazione sistemica, giungere ed attraversare la BBB. Tali studi preliminari hanno portato alla identificazione di un buon carrier per molecole attive al CNS [Tosi et al.,2005; Costantino e al., 2005, 2006].

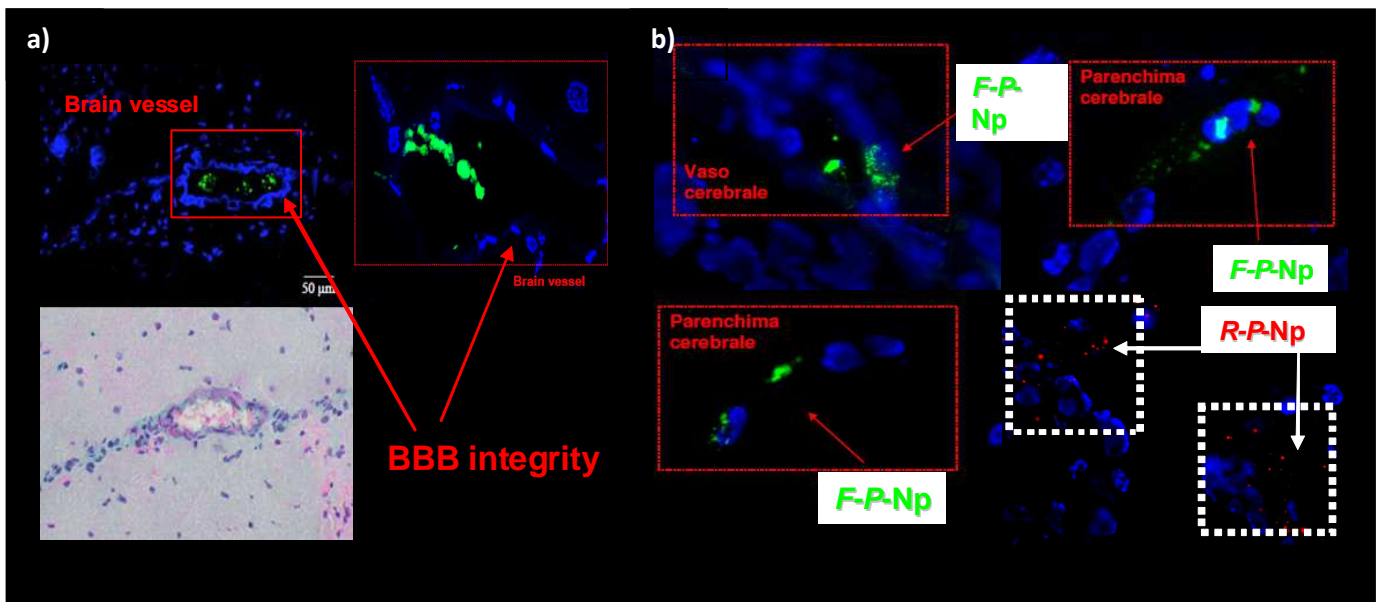


Figura 7: Localizzazione dopo somministrazione di nanoparticelle a) non modificate e b) modificate in superficie con il peptide. Sezioni cerebrali; microscopia a fluorescenza.

La potenzialità di tale carrier nel veicolare principi attivi al SNC è stata valutata incorporando due farmaci modello, la loperamide e la rodamina. La loperamide è un peptide agonista oppioidi (farmaco p/p) che manca dell'azione centrale a causa dell'efflusso garantito da Pgp; media al contrario un'attività antidiarroica legandosi ai recettori oppioidi della parete intestinale. I recettori oppioidi, classificati in quattro tipi (μ , δ , κ , ORL1), sono distribuiti sia a livello centrale che periferico (plessi nervosi intramurali del tratto gastrointestinale, delle vie biliari, urogenitali e degli apparati circolatorio e respiratorio). I recettori di tipo μ sono i più diffusi ed abbondanti e mediano la maggior parte degli effetti farmacologici degli analgesici oppiacei (analgesia, depressione respiratoria, miosi, inibizione della tosse, attività antidiarroica, rigidità muscolare); la loperamide è particolarmente affine alla classe dei recettori μ e in minor misura ai recettori δ : manca dell'azione centrale a causa dell'efflusso garantito da Pgp. Purtroppo, in co-somministrazione con inibitori della Pgp, come la Quinidina, induce depressione respiratoria, tipico sintomo dell'effetto oppioidi centrale. Similmente, assieme a Cereport, analogo della Bradikinina, molecola a transitoria azione permeante la BBB, esprime nei ratti effetto analgesico superiore rispetto alla semplice somministrazione dell'oppioidi, effetto assente in cavie pretrattate con Naloxone, antagonista oppioidi, a indicare che l'analgesia è mediata proprio dall'aumento di Loperamide a livello centrale. Anche la rodamina è substrato della Pgp e non oltrepassa la BBB, si accumula selettivamente nel parenchima cerebrale solo in seguito a pre-somministrazione di inibitori di Pgp. Rh-123 è un marker fluorescente e anche se non ci sono studi di caricamento in nanoparticelle, viene ampiamente utilizzata in associazione con inibitori della Pgp per testare la funzionalità dei meccanismi di efflusso a livello della BEE. La Rh-123 caricata all'interno delle nanoparticelle e con un profilo di rilascio molto lento permette di effettuare studi di biodistribuzione ,quantificare quantificando la quantità delle nanoparticelle nei diversi organi (studi di biodistribuzione).

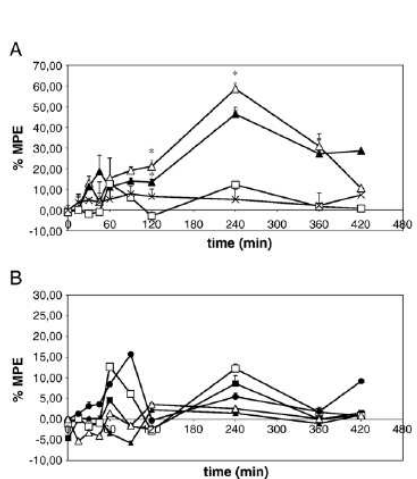


Fig. 6. A Antinociceptive effect test. LOP-g7-Np (1 and 2) and LOP-(R)-g7-Np. LOP-B-Np as control group. Δ is %MPE for LOP-g7-Np-(1) administration. \blacktriangle is the %MPE for LOP-g7-Np-(2) administration. \times is %MPE for LOP-(R)-g7-Np administration. \square is %MPE for LOP-B-Np administration. * P <0.05 vs Control groups and $^{\circ}P$ <0.05 vs LOP-g7-Np-(2). ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls Tests. B Antinociceptive effect test. Control groups. \blacksquare is % MPE for g7-Np administration. \square is % MPE for LOP-B-Np administration. \bullet is % MPE for simple mixture administration. \blacktriangle is % MPE for buffered saline solution administration. Δ is % MPE for Loperamide solution administration. * P <0.05 vs Control groups and $^{\circ}P$ <0.05 vs LOP-g7-Np-(2). ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls tests.

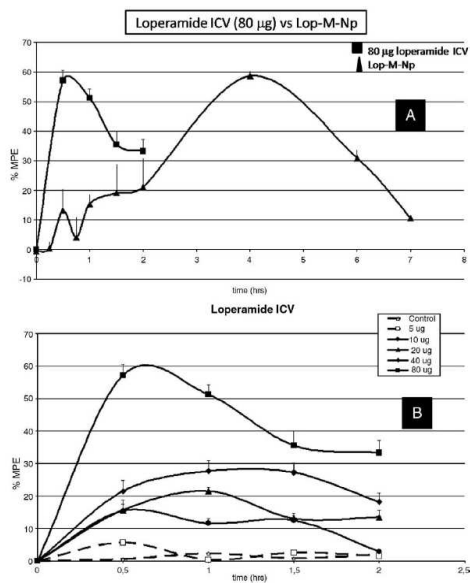


Figure 4. (A) Antinociceptive effect exerted by the ICV administration of loperamide (square) in comparison with the effect exerted by loperamide loaded in the peptide-modified NPs (Lop-M-NP) (triangle). (B) Antinociceptive effect exerted by loperamide ICV administration at different dosages. Data are presented as an average of at least three experiments \pm SEM (bars) and were analyzed by means of ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls tests for multiple comparisons. At 3h time point every group is significantly (at least P <0.05) different from the other groups; some exceptions were recognized, namely: at 1 hour, control group 5 μ g and 40 μ g vs 20 μ g; at 1.5 hours 20 μ g vs 10 μ g and 0 μ g vs 5 μ g; at 2 hours, control vs 5 μ g, control vs 10 μ g, 5 μ g vs 10 μ g, and 20 μ g vs 40 μ g. PE, maximum possible effect.

Figura 8: Effetto antinocicettivo valutato dopo somministrazione ICV di una soluzione di loperamide (figura di destra) in confronto alla somministrazione di nanoparticelle modificate in superficie (figura di sinistra); tale somministrazione ha permesso di risalire alla quantità di farmaco che produce l'azione nocicettiva osservata e che quindi giunge al SNC con la nano particella; è stato pertanto calcolata la % di farmaco rispetto a quella somministrata che arriva al SNC con le nanoparticelle [Tosi et al., 2007, 2009, Vergoni et al., 2009].

Dopo somministrazione endovenosa (in vena caudale), le nanoparticelle modificate hanno dimostrato una capacità di superare la BEE pari al 15% dopo 2 h dalla somministrazione. Le nanoparticelle caricate con Loperamide sono state invece utilizzate in test farmacologici di nocicezione per valutare l'effetto analgesico. L'analgesia è prova del successo nel brain targeting essendo il farmaco substrato delle Pgp: la somministrazione sistemica di nanoparticelle modificate con peptide ha portato ad un evidente effetto farmacologico; accanto ad un iniziale effetto simil-opioidi nella prima ora, probabilmente relativo al farmaco adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle, compare un forte effetto analgesico dose-dipendente sino a 6 ore, mostrando pertanto un rilascio prolungato del farmaco all'interno del SNC. Tali risultati, avvalorati dall'assenza di analgesia in numerosi controlli, suggeriscono che il 13% della dose somministrata dopo iniezione nella vena caudale dei ratti ha raggiunto il SNC. Questo dato va a confermare i dati precedentemente esposti riguardanti la biodistribuzione, con un ordine di grandezza di localizzazione cerebrale paragonabile. Tale dato è confortante se paragonato agli altri sistemi nanotecnologici proposti in letteratura e prima descritti (nanoparticelle di PBCA con polisorbato, nanoparticelle pegilate), dove la quantità di farmaco veicolata al SNC non supera mai il 5-6% della dose somministrata [Tosi et al., 2007, 2009; Vergoni et al., 2009].

L'optical imaging

Diverse scoperte rivoluzionarie [che vanno dai raggi x in medicina (Wilhelm Roentgen, 1895) alla tomografia computerizzata (CT), alla risonanza magnetica nucleare (MRI), all'impiego di mezzi di contrasto] hanno portato alla moderna diagnostica per immagini [Licha and Olbrich, 2005]. Negli ultimi decenni metodiche emergenti quali la tomografia ad emissione di positroni (PET) o la tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone (SPECT) hanno migliorato la sensibilità diagnostica, aprendo all'applicazione nel campo del *molecular imaging*.

Tra i diversi campi di applicazione della diagnostica per immagini quella nella valutazione della localizzazione di farmaci (sia molecole attive che sistemi strutturati come profarmaci polimerici, ma anche nanoparticelle polimeriche o altri carriers veicolanti attivi e diagnostici) è di grande attualità; essa infatti costituisce uno strumento prezioso per il ricercatore nel fornire informazioni utili riguardo la biodistribuzione, la tracciabilità, la farmacocinetica del principio attivo o del sistema somministrato. Grazie ad essa lo sperimentatore è in grado di monitorare il farmaco o il vettore dell'attivo nei diversi distretti dell'organismo potendo altresì valutare l'effettivo raggiungimento di uno specifico target cellulare [Rudin and Weissleder, 2003; Licha and Olbrich, 2005]. Per l'applicazione della diagnostica per immagini a tale settore che combina di fatto la nanomedicina alla biofarmaceutica, occorre parlare di sonde per imaging e di tecniche quali il *Radionuclide Imaging*, il *Contrast-enhanced Ultrasound (CEUS)*, il *Magnetic Resonance Imaging*, e l' *Optical Imaging* [Gang et Xiaoyuan, 2009].

Technique	Resolution	Depth	Time	Imaging agents	Target*	Cost†	Primary small-animal use	Clinical use
MR	10–100 µm	No limit	Minutes–hours	Gadolinium, dysprosium, iron oxide particles	A, P, M	\$\$\$	Versatile imaging modality with high soft-tissue contrast	Yes
CT	50 µm	No limit	Minutes	Iodine	A, P	\$\$	Lung and bone imaging	Yes
Ultrasound	50 µm	Millimetres	Minutes	Microbubbles	A, P	\$\$	Vascular and interventional imaging	Yes
PET	1–2 mm	No limit	Minutes	¹⁸ F, ¹¹ C, ¹⁵ O	P, M	\$\$\$	Versatile imaging modality with many different tracers	Yes
SPECT	1–2 mm	No limit	Minutes	^{99m} Tc, ¹¹¹ In chelates	P, M	\$\$	Commonly used to image labelled antibodies, peptides and so on	Yes
FRI	2–3 mm	<1 cm	Seconds–minutes	Photoproteins (GFP), NIR fluorochromes	P, M	\$	Rapid screening of molecular events in surface-based tumours	Development
FMT	1 mm	<10 cm	Seconds–minutes	NIR fluorochromes	P, M	\$\$	Quantitative imaging of targeted or 'smart' fluorochrome reporters in deep tumours	Development
BLI	Several millimetres	Centimetres	Minutes	Luciferins	M	\$\$	Gene expression, cell and bacterial tracking	No
Intravital microscopy (confocal, multiphoton)	1 µm	<400 µm	Seconds–minutes	Photoproteins (GFP), Fluorochromes	P, M	\$\$\$	All of the above at higher resolutions but at limited depths and coverage	Limited development (skin)

*Primary area that a given imaging modality interrogates: A, anatomical; M, molecular; P, physiological. †Cost of system: \$ <100,000; \$\$ 100–300,000; \$\$\$ >300,000. BLI, bioluminescence imaging; CT, X-ray computed tomography; FMT, fluorescence-mediated molecular tomography; FRI, fluorescence reflectance imaging; GFP, green fluorescent protein; NIR, near-infrared; MR, magnetic resonance; PET, positron emission tomography; SPECT, single-photon emission computed tomography.

Tabella 1: Panoramica delle principale tecniche di imaging ad oggi impiegate nel *drug delivery* e nel *drug discovery* [Rudin and Weissleder, 2003].

Il Radionuclide Imaging si avvale del legame tra l'attivo che si intende monitorare e un radioisotopo, sfruttandone le proprietà di emissione. Diversi studi in questo senso hanno confermato la possibilità di utilizzare radionuclidi (quali ¹³¹I, ⁶⁷Ga, ¹²³I, ^{99m}Tc, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁷⁶Br, ¹²⁴I) come marcanti di attivi o dei loro vettori permettendo di verificarne le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche [Kleiter et al., 2006; Wang et al., 2008; Cao et al., 2008; Chen et al., 2005].

Un'altra tecnica particolarmente impiegata nel *drug delivery* è rappresentata dal **Contrast-enhanced Ultrasound (CEUS)**, tale tecnica sfrutta l'impiego di mezzi di contrasto ultrasonici, come le microbubbles, microsfere caricate con dei gas che posseggono specifiche proprietà acustiche e che vengono quindi sfruttate come mezzo di contrasto mediante l'impiego di ultrasuoni [Dijkmans et al., 2004]. Una tecnica particolarmente versatile sia nel campo clinico che in quello della ricerca è rappresentata dal **Magnetic Resonance Imagin.** L'applicazione di tale tecnica nel *drug delivery* trova il rationale nella possibilità di poter monitorare la biodistribuzione dell'attivo mediante la semplice applicazione di un campo magnetico [Ünak et al., 2008]. Al fine di ottenere un sistema facilmente visualizzabile vengono generalmente impiegate micelle o nanoparticelle di ossido di ferro caricate con il farmaco; diversi studi riportano l'impiego di tali sistemi come strumento promettente dell'imaging di farmaci [Nasongkla et al., 2006; Hanessian et al., 2008; Maharramov et al., 2011; Hu et al., 2012]

Tra le differenti tecniche impiegate in diagnostica l'optical imaging trova uso in molteplici applicazioni che spaziano dal medical imaging al drug delivery fino al drug discovery.

Optical in vivo imaging techniques				
Technique	Wavelength	contrasting principle	Resolution	Imaging depth maximum
Microscopy(epi, confocal, 2-photon)	VIS	Intrinsic fluorescence and fluorescent probes	microscopic	500 μ m
Optical coherence tomography (OCT)	VIS	Scattering, reflection	Mesoscopic/ microscopic	2 mm
Laser speckle imaging	VIS, NIR	Scattering, reflection	Mesoscopic	1 mm
Fluorescence reflectance imaging	VIS, NIR	Intrinsic fluorescence and fluorescent probes	Mesoscopic/ macroscopic	~10 mm
Bioluminescence imaging	VIS	Bioluminescent reporters(Luciferin/Luciferase)	Macroscopic	~3 cm
Diffuse optical tomography (DOT)	NIR	Scattering, intrinsic absorption and absorbing agents	Macroscopic	~12 cm
Fluorescence molecular tomography (FMT)	NIR	Fluorescent agents(targeted, activated)	Macroscopic	~12 cm
Enhanced endoscopy/laparoscopy	VIS, NIR	Visual inspection, fluorescent agents	Macroscopic	~5 mm

Tabella 2: Panorama delle differenti tecniche di optical imaging ad oggi impiegate, con riferimento agli aspetti fisici e tecnici che ne sono alla base [Licha and Olbrich 2005].

L'optical imaging combina sensibilità e vaste possibilità di applicazione nello studio non invasivo di bersagli molecolari all'interno del corpo di un animale vivo. Questa tecnologia è può essere utilizzata per seguire la progressione della malattia, gli effetti di farmaci candidati sulla patologia bersaglio, il comportamento farmacocinetico dei farmaci candidati, e lo sviluppo di biomarker indicativi di esiti della malattia e del trattamento.

L'immagine acquisita è strettamente dipendente dalla lunghezza d'onda della luce applicata, dalla modalità di detection dello strumento e dall'impiego di sonde ottiche o di agenti ottici esterni sfruttati come mezzi di contrasto. A seconda della lunghezza d'onda della luce applicata si possono ottenere differenti penetrazioni dei tessuti. L'impiego infatti di lunghezza d'onda superiori a 650 nm, nel campo cioè dell'UV-VIS, permette una scarsa penetrazione dei tessuti con la possibilità di analizzare spessori che vanno da pochi micrometri a 1 millimetro, a causa del forte assorbimento dei più importanti cromofori costituenti i tessuti quali la deossiemoglobina e l'ossiemoglobina. Lunghezze d'onda comprese tra i 700 e 900 nm (Near-Infrared NIR) invece permettono una miglior penetrazione dei tessuti a causa del limitato assorbimento di essi in questa regione spettrale [Ntziachristos et al., 2003]. Combinando tecniche differenti che spaziano dalla biologia molecolare alla chimica pura sono stati sviluppati metodi di imaging in grado di visualizzare un ampia varietà di target quali cellule, tessuti, organi, eventi cellulari, attività enzimatiche e farmaci [Lucker and Lucker, 2008;Rudin and Weissleder, 2003].

Attualmente, i tre principali tipi di “labels” utilizzati nell’optical imaging sfruttano la bioluminescenza, le proteine fluorescenti oppure i marcanti fluorescenti e i sistemi nanoparticellari strutturati. La bioluminescenza e le proteine fluorescenti richiedono l’ingegnerizzazione di linee cellulari o animali transgenici portatori del gene appropriato. I marcanti fluorescenti invece risultano più duttili e impiegabili, con enorme potenzialità in applicazioni cliniche. Per esempio, il carbocianine indocianina verde (ICG, noto anche come Cardiogreen R), è stato usato in clinica per oltre 25 anni come indicatore per studi che coinvolgono il cuore, fegato, polmoni, e la circolazione. Vettori di farmaci antineoplastici sono stati marcati otticamente allo scopo di monitorarne la farmacocinetica e la biodistribuzione; è possibile altresì valutare indirettamente, per via biochimica e mediante microscopia in vivo, il target e quindi l’organo/tessuto patologico (ad es. le modificazioni a carico dell’endotelio vascolare dei vasi angiogenici, con endotelio discontinuo e disorganizzato, l’aumento della permeabilità alle macromolecole circolanti e l’accumulo tissutale del principio attivo). L’impiego di macromolecole come ad esempio il destrano-fluoresceinaiotiocianato o nanoparticelle o microparticelle marcate con diversi fluorocromi hanno permesso di quantificare l’extravasazione delle molecole dal lume vascolare alla matrice extracellulare e di conseguenza la permeabilità dei vasi tumorali, quantificando i diametri dei pori tra 100 nm e 2 μ m a seconda del tumore, della regione in cui si è sviluppato e il modo in cui cresce e regredisce [Hobbs et al., 1998; Jain et al., 2002; Krasnici et al., 2005].

I quantum dots (QDs) (nanocristalli inorganici di materiale semiconduttore, con diametro dell’ordine di 1-10 nm che possiedono proprietà luminescenti, ottiche ed elettroniche uniche: quando sono eccitati con apposite sorgenti di luce (lunghezze d’onde a cui i tessuti del corpo risultano trasparenti) emettono una fluorescenza misurabile. A seconda del diametro e del tipo di nanoparticella, l’emissione è diversa, permettendo analisi differenziali. La capacità di indirizzare queste molecole ai tessuti malati fornisce un ottimo sistema diagnostico) stanno emergendo come sistemi alternativi ai convenzionali marcanti organici (biomarkes fluorescenti). Le loro migliori caratteristiche in termini di fotostabilità e di luminosità li rendono eccellenti candidati nell’impiego come traccianti farmaceutici; alcuni studi riportano infatti l’uso di tali marcanti in sistemi complessi modificati con aptameri targettizzanti in associazione con doxorubicina o immunoliposomi caricati con doxorubicina fornendo molteplici informazioni che vanno dal targeting tumorale, all’imaging e al *drug delivery* [Bagalkot et al., 2007; Weng et al., 2008].

Nel vasto panorama delle sonde impiegate nell’optical imaging una classe degna di nota è rappresentata dai fluorocromi Near-Infrared (NIR). Tali marcanti superano limitazioni quali l’attenuazione e lo scattering della luce da parte dei tessuti analizzati, minimizzando i problemi legati alla scarsa rilevazione dei fotoni nei tessuti [Luker and Lucker, 2008] e amplificando il segnale di detection.

In generale i fluorocromi nel NIR hanno alta sensibilità, attribuibile alla bassa fluorescenza di fondo e agli alti coefficienti di estinzione, che forniscono elevate rese quantiche. La regione NIR è compatibile anche con componenti ottici a stato solido, come i laser a diodi e rivelatori al silicio; questo ha portato ad un notevole e rapido sviluppo della delle “NIR fluorescence imaging”.

La luce infatti, viene assorbita dall'emoglobina, dalla melanina, dai lipidi, e da altri composti presenti nel tessuto vivente. Poiché si osserva una diminuzione di assorbimento e diffusione all'aumentare lunghezza d'onda, i coloranti fluorescenti e le proteine assorbenti sotto 700 nm sono difficili da rilevare se presenti in piccole quantità e a profondità maggiori di alcuni millimetri. Nella regione NIR (700-900 nm), il coefficiente di assorbimento del tessuto è minimo e la luce può penetrare anche ad una profondità di diversi centimetri (fino a circa 15 cm). Sopra 900 nm, l'assorbimento della luce da parte delle molecole di acqua comincia a causare interferenze. Inoltre, composti naturalmente presenti nei tessuti animali possono causare auto-fluorescenza in tutta la gamma spettrale del visibile fino a ~ 700 nm, che può mascherare il segnale desiderato. Al fine quindi di ottenere immagini apprezzabili delle regioni del nostro organismo situate in profondità sono state messe a punto strategie che impieghino fluorocromi nel Near-Infrared con emissioni di lunghezze d'onda comprese tra 650 e 900 nm.

Ad oggi diversi marcanti NIR vengono impiegati per l'imaging in vivo; sono classificati in base agli spettri di eccitazione ed emissione e siglati in relazione alle ditte che li producono e commercializzano; tra i primi impiegati va ricordato il Cy5.5 che è stato utilizzato in passato essenzialmente a causa della mancanza di altri coloranti più adatti per l'imaging. Tale marcante infatti ha eccitazione / emissione massimali a lunghezze d'onda che rientrano ancora nel range di autofluorescenza dei tessuti impattando con le prestazioni complessive. Marcante come 800 CW IRDye che ha eccitazione/emissione massimali tra 774nm e 789nm, perfettamente centrata nella regione infrarossa, forniscono un ottimo rapporto segnale rumore e buona applicazione nell'optical imaging. Il DY-675 scelto per i nostri studi, mostra assorbimento / emissione massimali tra 674nm/ 699nm (in etanolo), ma buone caratteristiche di solubilità e prestazioni, se impiegato per derivatizzare polimeri o composti organici funzionali. E' considerata una sonda border line tra il “far red” ed il “near infrared”.

Sezione 2: Applicazione delle nanoparticelle nella veicolazione e nel direzionamento di farmaci antitumorali

Lo sviluppo di un metodo di somministrazione e rilascio non invasivo di antitumorali con l'obiettivo di ottenere concentrazioni significative al bersaglio, limitando allo stesso tempo l'esposizione sistematica e la distribuzione ai punti periferici di azione, può migliorare significativamente le prospettive di impiego

clinico e l'efficacia della terapia. Recentemente, molti studi hanno riportato la progettazione e l'ottimizzare di sistemi di rilascio proposti per il trasporto di antitumorali, applicando anche strategie quali la PEGilazione che migliora la stabilità in circolo, oppure il legame covalente agli anticorpi monoclonali specificamente diretti verso le popolazioni cellulari che sovraesprimono il recettore specifico.

In particolare, nella terapia antitumorale, le nanoparticelle risultano tra i sistemi più versatili ed applicabili. La recente immissione in commercio del farmaco Abraxane ha consacrato tali sistemi quali potenziali strumenti per la somministrazione, stabilizzazione e rilascio modulato di antitumorali al target. Abraxane è una formulazione a base di nanoparticelle di albumina per la veicolazione del paclitaxel [Malam *et al.*, 2009]. E' indicato nel trattamento del cancro metastatico della mammella in pazienti in cui il trattamento iniziale per la malattia metastatica non è più efficace e per le quali la terapia standard, contenente un' "antraciclina", è controindicata. Le nanoparticelle di albumina attraversano l'endotelio verso l'area interstiziale del tessuto tumorato per transitosi; utilizzano il trasporto attraverso specifici recettori per l'albumina (gp60) sovraespressi sull'endotelio del vaso tumorato sfruttando la via naturale con la quale le cellule tumorate ottengono energia e nutrimento per la loro rapida crescita. Questo perché l'albumina è un carrier naturale di nutrienti idrofobici, vitamine e steroidi e regola il passaggio di una discreta quantità di molecole dal sangue ai tessuti. Praticamente, l'albumina lega i recettori caveolina-1 provocando la formazione di caveolae che trasportano il cargo attraverso l'endotelio. Proprio per l'esigenza di nutrimento e di crescita, una volta nella zona interstiziale, l'albumina (e di conseguenza il sistema nanoparticellare-strutturato) tende ad accumularsi nelle aree infiammate e in molti tumori e ad interagire con la proteina Acidica Secreta e Ricca di Cisteina (SPARC - Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) sovra-espressa sulla superficie delle cellule tumorate. SPARC, infatti, è iperespressa selettivamente in molti tipi di tumori umani, tra cui il tumore della mammella, conferendo a questi tumori una prognosi peggiore (sembra permettere l'ordinata organizzazione dello stroma tumorale, favorendone la crescita e il processo metastatico). Studi di immunistochemical hanno dimostrato che SPARC è iperespressa nel 46% di carcinomi mammari e soltanto nell'1% di tessuti normali mammari. SPARC agisce come un vero e proprio magnete: essa attira e lega il complesso albumina-farmaco e lo concentra nell'interstizio del tumore, permettendo un'alta concentrazione di paclitaxel albumina nel tumore. Abraxane è facilmente somministrato via iv, non contiene solventi tossici ed ha dimostrato un tasso di risposta clinica migliore del doppio rispetto a Taxol (farmaco convenzionale dove compaiono come co-solventi il Cremophor e l'etanolo) in uno studio randomizzato condotto su 460 pazienti [Gradishar *et al.*, 2005].

La conoscenza biochimica del tumore, con l'evidenza di bersagli cellulari specifici ha accelerato la formulazione e sperimentazione di sistemi direzionati. La letteratura è ricca di studi di formulazione e somministrazione in modelli animali di differenti tumori [Feng et al., 2012; Brannon-Peppas and Blanchette, 2012; Parhi et al., 2012; Shapira et al., 2011]. In **Tabella 3** sono riportati alcuni recenti sviluppi (trovare una tabella con in generale nanoparticelle con farmaci antitumorali con e senza direzionanti e non necessariamente di PLGA) [Fukumori and Ichikawa, 2006].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Therapeutic purpose	passive and active targeting	passive drug targeting	passive and estrogen-receptor targeting	passive and pH-dependent drug targeting	intracellular drug delivery	macrophage-mediated chemotherapy	chemotherapy to overcome multidrug resistance	cancer therapy	cancer therapy	passive and active targeting
Particle size (nm)	100–200	118	250–300	61	250–300	139	288	100–200	200–250	50–100/32
Preparation	extrusion	coprecipitation	solvent displacement	self-assembly	ionic gelation	emulsion polymerization	emulsion polymerization	double emulsion	high-pressure homogenized	self-formation
Characterization	biodistribution, extravasation, survival	drug content, antitumor effect, plasma concentration	cell uptake, intracellular distribution, localization	pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity	cytostatic activity, drug release, CLSM	macrophage-mediated cytotoxicity	cell growth inhibition, release	entrapment efficiency, size, ζ potential (–9 mV), release	antitumor activity	biodistribution/transfection
Delivery agent	amphotericin B/doxorubicin	irinotecan	tamoxifen	doxorubicin	doxorubicin	doxorubicin	doxorubicin, cyclosporin A	tumor recrosist factor- α	bovine seminal ribonuclease	doxorubicin/DNA
(bonding mode)	entrapment, surface adsorption	non-covalent	non-covalent	non-covalent	ion complexation	non-covalent	entrapment, surface adsorption	solid dispersion	adsorption	non-covalent
Core structure (main component)	liposome egg PC	polymeric matrix PLA, PEG-PPG-PEG	polymeric matrix poly(ϵ -caprolactone) (MW: 14.8 kDa)	polymeric matrix pullulan acetate/sulfonamide conjugate	polymeric matrix chitosan	polymeric matrix PACA	polymeric matrix PACA	polymeric matrix PEGylated PHDCA	polymeric matrix PLA	polymeric matrix PEG-poly(aspartic acid)/PEG-PLA/PEG-poly(lysine)
(additive)	cholesterol				TPP, type-B gelatin, polyphosphoric acid or dextran sulfate			HSA, BSA		
Surface property and component	DSPE-PEG/DSPE-PEG-monoclonal antibody/DSPE-PEG-transferrin	PEG-PPG-PEG	pluronic F-68					PEG		PEG
(bonding mode)	DSPE-anchored	embedded	adsorption					pendant		
Reference	[46]	[53]	[54, 55]	[56]	[57]	[58]	[59]	[60]	[61]	[62]

Tabella 3: Nanoparticelle in studio per il drug delivery di antitumorali [Fukumori and Ichikawa, 2006].

Leucemia linfoide cronica

Tra le leucemie più comuni nell'uomo vi è la leucemia linfatica cronica (LLC). La LLC è una malattia clonale caratterizzata da proliferazione e progressivo accumulo di linfociti B. Dal sangue periferico i linfociti B migrano nei compartimenti tissutali (midollo, linfonodi, milza) dove ricevono uno stimolo proliferativo, in parte prodotto dalla interazione tra il recettore per l'antigene (BCR= B-cell receptor) presente sulla superficie cellulare e l'antigene presentato dalle cellule del microambiente, ed in parte direttamente in seguito alla interazione con il microambiente. Le cellule quindi migrano nel sangue periferico dove entrano in uno stato non proliferativo e possono andare incontro ad apoptosi (morte cellulare programmata) o ricircolare nei tessuti dove di nuovo ricevono uno stimolo alla proliferazione. Il risultato è l'aumento del numero dei linfociti nel sangue periferico (leucocitosi con linfocitosi assoluta), l'aumento delle dimensioni dei linfonodi al collo, alle ascelle, all'inguine (linfadenomegalia), l'aumento delle dimensioni della milza (splenomegalia).

E' la più frequente delle leucemie, infatti rappresenta il 25 % di tutte le leucemie dell' adulto ed e' tipicamente una malattia dell' anziano (età media 63 anni). La malattia ha molto spesso un inizio del tutto asintomatico e la diagnosi viene posta casualmente, in corso di esami di routine, in cui viene riscontrato un aumento della conta dei linfociti nel sangue periferico.

Più in dettaglio, LLC ha eziologia complessa. E' una patologia caratterizzata dalla differente proliferazione, attivazione e maturazione dei linfociti B CD5⁺ [Pekarsky et al., 2010; Chiorazzi et al., 2005; Ghia et al., 2007] e si presenta in due forme differenti, una aggressiva ed una indolente. Tale eterogenicità è dipesa da differenti mutazioni registrate a livello della regione variabile (V) della catena pesante (H) V_H dei geni che codificano per l'Immunoglobulina IgVH, nell'espressione del cluster di differenziazione CD38⁺, nell'espressione della tirosin chinasi ZAP-70, come nella possibile presenza di delezioni come la 13q14.3 presente in più del 50% dei casi, ma anche 11q22-23, 17p13 e 6q21 [Kröber et al., 2002; Chiorazzi et al., 2005]. Il cursus della patologia nei pazienti affetti dalla forma indolente (poco reattiva) è molto lungo e la prognosi è benigna, le principali manifestazioni riguardano una limitata espressione della tirosin chinasi ZAP-70 e mutazioni a carico dei geni IgVH oltre che delezione 13q14 [Pekarsky et al., 2010; Döhner et al., 2000]. Al contrario invece, la forma aggressiva presenta una prognosi infausta e lo sviluppo è particolarmente veloce con un esito fatale, in essa si riscontrano elevati livelli della tirosin chinasi ZAP-70 ed assenza di mutazioni a carico dei geni IgVH. Riguardo alla patogenesi della forma indolente, alcuni studi hanno potuto confermare che a contribuirvi in maniera rilevante vi è, a livello della delezione 13q14, l'eliminazione di un cluster di geni codificanti due microRNA il miR-15a e il miR-16-1, riscontrata nel 66% dei casi. La mancata espressione dei due microRNA è risultata inversamente proporzionale all'espressione di uno dei loro target la BCL2 una famiglia di geni che presenta attività anti-apoptotiche. I risultati hanno confermato che la repressione della BCL2 da parte di questi microRNA induce l'apoptosi nelle cellule leucemiche confermando l'importanza nell'attività oncosoppressiva da parte del miR-15a e miR-16-1 [Calin et al.,

2009; Cimmino et al., 2005]. Ulteriori studi riguardo alla delezione 13q14 hanno potuto confermare che oltre ad essere mancante l'espressione dei due microRNA, risulta inoltre assente l'espressione di un gene codificante per 221 amminoacidi il DLEU7 che sembrerebbe svolgere un'attività rilevante nell'oncosoppressione cooperando con il miR-15a ed il miR-16-1 [Palamarchuk et al., 2010]. Il DLEU7 infatti sembra essere strettamente collegato all'inibizione dell'espressione dell'NF- κ B fattore pro-oncogeno attivato a sua volta dall'espressione transgenica di uno dei membri che costituiscono la superfamiglia del TNF tumor necrosis factor, l'APRIL [Pekarsky et al., 2007; Haiat et al., 2006]. Diversi studi hanno confermato l'espressione dell'APRIL in varie forme tumorali a livello delle cellule B; il suo legame riguarda principalmente due recettore, il BCMA l'antigene di maturazione delle cellule B ed il TACI entrambi membri della superfamiglia dei recettori per il TNF. Mentre il BCMA è espresso nelle cellule mature B e T, il TACI viene riscontrato a livello delle cellule T attivate ed in alcune sottopopolazioni delle cellule B; entrambi giocano un ruolo importante nel processo di attivazione della via dell'NF- κ B mediante l'interazione con un fattore il TRAFs. Studi recenti hanno dimostrato che l'espressione della DLEU7 inibisce 5 volte l'attivazione dell'NF- κ B mediata dalla BCMA e 4 quella dell'NF- κ B mediata dalla TACI confermando l'importanza della DLEU7 accanto al miR-15a e miR-16-1 nell'attività oncosoppressiva e di conseguenza la loro delezione risulta un fattore di promozione della patogenesi della leucemia linfoide cronica [Pekarsky et al., 2010].

Per quanto riguarda invece la manifestazione della leucemia linfatica cronica in forma aggressiva, essa è strettamente legata all'espressione di un gene pro-oncogeno il TCL1 (T cell leukemia/lymphoma 1), identificato come target della traslocazione ed inversione a livello dell'aberrazione cromosomiale 14q32.1, diversi studi hanno dimostrato che tale gene è largamente espresso a livello delle cellule B in tutti i loro stadi dello sviluppo tranne che a livello maturo ed in forma minore nelle cellule T [Virgilio et al., 1994]. L'attività pro-oncogena del gene TCL1 si manifesta quale attivatore della via PI3K-Akt(PKB), la protein-chinasi akt infatti, codificata dall'oncogene AKT, gioca un ruolo importante nella regolazione di diversi segnali coinvolti nella proliferazione, nella sopravvivenza e nella morte in molte cellule tra cui le B e T [Chan et al., 1999]. Alcuni studi hanno dimostrato l'inibizione della trascrizione dell' activator protein 1 (AP-1), che induce l'apoptosi mediante l'attivazione di alcuni geni pro-apoptotici, da parte della TCL1 che interagisce su alcuni siti specifici della AP-1, il c-Jun, il c-Fos e il JunB, comportando una deficienza nell'apoptosi e di conseguenza la sopravvivenza delle cellule leucemiche [Pekarsky et al., 2008].

A fronte della complessa eziologia e dello sviluppo della patologia nelle sue differenti forme, sono state negli anni elaborate diverse strategie di trattamento della leucemia linfatica cronica.

A partire dagli anni 60 e per i successivi 40 anni, la terapia di elezione nel trattamento della leucemia linfatica cronica è stata rappresentata dall'impiego del clorambucile [Keating, 2001; Robak, 2005], un agente alchilante che svolge un'attività pro-apoptotica in diverse cellule tumorali determinando alterazioni nella sintesi e nella duplicazione degli acidi nucleici. E' stato utilizzato sia da solo che in associazione [Keating, 2001]. Con il passare degli anni, grazie all'avanzamento dei progressi scientifici si è accostata alla cura della leucemia una nuova classe di farmaci, gli analoghi nucleosidici, un gruppo di

agenti citotossici che ha mostrato una certa attività sulle cellule leucemiche, inducendone l'apoptosi mediante l'interferenza nella sintesi degli acidi nucleici, interagendo con gli enzimi coinvolti nell'attività della adenosina e deossiadenosina [Robak, 2005]. Tra i farmaci afferenti a questa classe che trovano maggior impiego nella terapia vi sono la fludarabina, la cladribina e la pento statina. Diversi studi hanno confermato l'impiego degli analoghi purinici in pazienti pretrattati mediante agenti alchilanti che hanno mostrato ricadute o refrattarietà alla terapia confermandone l'utilizzo come terapia standard di seconda scelta [Robak and Kasznicki, 2002]. L'impiego inoltre degli analoghi purinici come terapia primaria nella cura della leucemia linfatica cronica ha dimostrato la loro maggior attività se confrontati agli agenti alchilanti [Hallek and Eichhorst, 2004]; i tassi di risposta clinica restano però bassi. Per tale ragione si sono ricercate ulteriori strategie che comportassero un incremento nella terapia, a tale scopo l'impiego degli anticorpi monoclonali (MoAb) ha determinato un'evoluzione nella terapia delle neoplasie ematologiche incluso il linfoma Non-Hodgkin's e la leucemia linfatica cronica, attraverso un meccanismo che sfrutta l'espressione di alcuni antigeni di superficie cellulari quali CD19, CD20, CD22, CD23, CD52 [Robak, 2005], l'attivazione di alcuni segnali pro-apoptotici a livello intracellulare e l'attivazione della risposta immunitaria mediante sistemi del complemento [Faderl et al., 2006].

In tale panorama gli anticorpi monoclonali anti CD20 ed anti CD52, rispettivamente Rituximab ed Alemtuzumab, hanno mostrato una significativa attività rivolta alla leucemia linfatica cronica e costituiscono ad oggi la terapia d'elezione per questa patologia. Nel 1997 l'impiego di Rituximab è stato approvato dalla FDA per il trattamento del linfoma non Hodgkin delle cellule B, come pure nelle leucemie che colpiscono le medesime cellule.

Il suo meccanismo d'azione si esplica grazie al legame con il cluster di differenziazione 20 CD20, antigene largamente espresso nelle cellule B sane, leucemiche e nei linfomi, ciò determina diversi meccanismi di citotossicità cellulare sia complemento dipendente che citotossicità cellulo-mediata anticorpo dipendente, come anche processi apoptotici che comportano l'eliminazione della cellula [Robak et al., 2005].

Diversi studi ne hanno confermato l'impiego come trattamento di prima linea per pazienti affetti da leucemia linfatica cronica e da piccolo linfoma [Hainsworth et al., 2003; Byrd et al., 2001] sia come monoterapia che in associazione [Robak et al., 2005].

D'altro canto, pur se l'impiego di tale farmaco risulta promettente, i tassi di risposta alla terapia per la leucemia linfatica cronica recidiva lasciano a desiderare, soprattutto se comparati a quelli del linfoma follicolare non Hodgkin; alcuni studi hanno dimostrato una miglior efficacia in questo senso mediante l'impiego di alti dosaggi o un programma di dosaggio più intenso [Falder et al., 2006]. E' stato inoltre confermata la migliore attività del rituximab se combinato con alcuni agenti chemioterapeutici come la

fludarabina che determina una down-regulation delle proteine del complemento CD55 e CD59 [Falder et al., 2006; Alas et al., 2000; Keating, 2001].

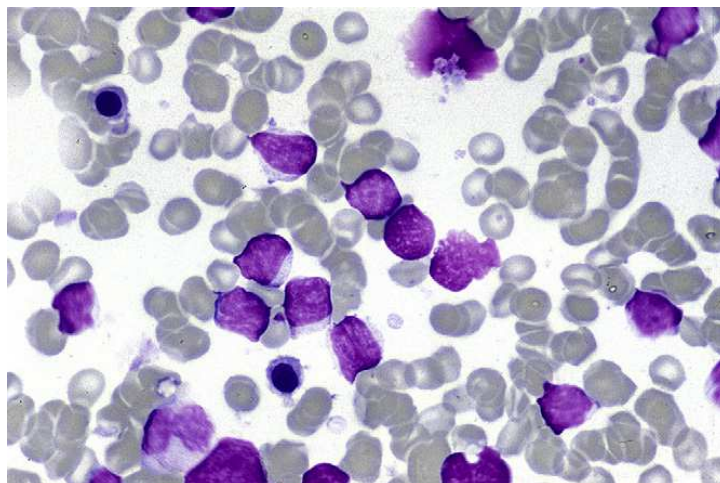


Figura 9: Immagine relativa ad un vetrino di sangue di paziente affetto da leucemia linfatica cronica, i linfociti sono evidenziati mediante la colorazione di May Grumwald Giemsa; appaiono le tipiche manifestazioni della patologia con linfociti di dimensioni piccolo-medie, la cromatina appare aggregata ed il citoplasma scarso [Matutes et al., 2010].

L'anticorpo monoclonale Alemtuzumab riconosce in maniera specifica l'antigene di superficie CD52, tale antigene viene espresso sui linfociti sani e malati ma anche sui monociti e sui linfociti natural killer. La sua attività farmacologica si esplica nella capacità di indurre la lisi cellulare mediante la citolisi complemento dipendente e la citotossicità cellulare anticorpo dipendente. Il suo impiego nella terapia della leucemia linfatica cronica è stato autorizzato nel 2001 per la terapia di pazienti refrattari al trattamento con agenti alchilanti. Al fine inoltre di aumentarne l'efficacia e di ottenere una miglior eradicazione della patologia residua sono state proposte terapie che vedono la combinazione dell' alemtuzumab con analoghi purinici, ciò anche perché i meccanismi di azione di questi farmaci non si sovrappongono ottenendo così l'eliminazione della resistenza crociata [Kennedy et al., 2002]. Pur inoltre presentando una buona risposta percentuale nel trattamento di pazienti refrattari alla terapia con analoghi purinici, il farmaco ha dimostrato una maggior efficacia nell'eliminazione delle cellule leucemiche dal sangue e dal midollo osseo, mentre risulta meno efficace nell'eradicare quelle dei linfonodi [Robak et al., 2005; Keating, 2001]. Importanti limitazioni riguardo all'impiego di tale anticorpo risultano nella comparsa di reazioni avverse come sindromi di tipo influenzale a causa della somministrazione per infusione, questo soprattutto nella prima settimana di somministrazione, tale limitazione viene by-passata mediante pre-medicazione prima del trattamento, riduzione al minimo dell'aumento della dose da somministrare o cambiando il tipo di somministrazione in sottocutanea anziché infusione endovenosa [Robak et al., 2005].

Oltre agli anti CD20 Rituximab ed anti CD52 Alemtuzumab, ulteriori studi sono in esecuzione per lo sfruttamento di ulteriori target specifici della leucemia linfatica cronica, anche mediante terapie di combinazione allo scopo di migliorare l'efficacia della terapia e la specificità del target; tra questi si annoverano l'epatuzumab antiCD22, il lumilixumab antiCD23, l'apolizumab per l'antigene umano leucocitario ID10, il bevacizumab contro il fattore di crescita VEGF, il Denileukin diftotox frammenti di tossina difterica fusi con Interleuchina-2 contro il CD25 antigene superficiale che lega l'IL-2 [Faderl et al., 2006] ma anche farmaci contro il CD40 [Grdisa, 2003].

Oltre ai su citati antigeni di superficie ad oggi sfruttati per il direzionamento alle cellule affette dalla leucemia linfatica cronica, sono allo studio innumerevoli altri target, di cui se ne riporta una panoramica in tabella, che in un prossimo futuro potranno essere sfruttati per ottenere un direzionamento sempre più specifico alle cellule leucemiche.

Chemokine receptors expressed by CLL cells.				
Receptor	Other names	Ligands	Expression in CLL	Presumed functions
CXCR3	CD182, GPR9	CXCL9, CXCL10, CXCL11	Low/intermediate, consistently expressed [54,61]	Th1 response, angiostasis, leukocyte recruitment, inflammation, integrin activation, cytoskeletal changes, and chemotactic migration
CXCR4	CD184, Fusin, HM89, LCR1, LESTR	CXCL12	High [11,12], downregulated by CXCL12 (receptor endocytosis) [11] and by BCR triggering [25]	Organogenesis, lymphopoiesis, hematopoiesis, cell migration and survival, angiogenesis
CXCR5	CD185, BLR1, MDR15	CXCL13	High [56]	B-cell migration, Th2 response, organogenesis (cooperative with the CCR7 receptor)
CCR7	CD197	CCL19, CCL21	Intermediate to high, correlates with lymphadenopathy [19,55]	T cell development in the thymus, lymph-node homing of naïve and regulatory T cells and dendritic cells

Table 2
Inducible chemokines expressed by activated CLL cells.

Chemokine	Other names	Receptor	Expression in CLL	Presumed functions
CCL3	MIP-1 α ; SCYA3; G0S19-1; LD78ALPHA	CCR1 and CCR5	After BCR-triggering and NLC co-culture [79], higher in ZAP-70 ⁺ CLL, Syk-dependent [25]	Inflammation, recruitment and activation of polymorphonuclear leukocytes, activated B cells: recruitment of T cells for T-B cell interactions
CCL4	MIP-1 β ; SCYA4	CCR5	Same as for CCL3	Same as for CCL3
CCL22	DC/B-CX, MDC, MDC (1-69), MGC34554, SCYA22	CCR4	After CD40 ligation	Recruitment of regulatory T cells (T _{reg})

Tabella 4: Rappresentazione schematica dei recettore delle chemiochine espressi e/o attivati nelle cellule affette da leucemia linfatica cronica ad oggi alla studio per il targeting della patologia [Burger, 2010].

Nutlin-3 come potenziale agente antitumorale

Tra i fattori che contribuiscono alla sopravvivenza delle cellule tumorali ed alla resistenza alla chemioterapia vi è la sovra espressione di un'oncoproteina, la MDM2 (murine double minute 2), fattore di inibizione della proteina pro-apoptotica p-53; tale espressione determina nelle cellule leucemiche la perdita della funzionalità della proteina p-53 che si manifesta con il mancato arresto del ciclo cellulare o dell'apoptosi, naturali risposte della cellula se esposta a stress di varia natura [Das et al., 2011].

Pertanto, molecole con selettiva attività antagonista nell'inibizione dell'interazione tra la proteina p-53 e l'oncoproteina MDM2, sono state proposte quali chemioterapici [Vassilev et al., 2004].

I Nutlin si inseriscono proprio in questo contesto. In generale, i farmaci afferenti a questa classe presentano una struttura analoga al cis-imidazolo con sostituenti idrofobici in grado di legarsi alla tasca di

legame per la proteina p-53 presente sulla superficie dell'oncoproteina MDM2 in modo enantio-specifico mimando il legame di tre residui amminoacidici della p-53: la leucina 26, il triptofano 23 e la fenilalanina 19 [Popowicz, et al., 2011]. I composti identificati risultano tre (Nutlin-1, Nutlin-2, Nutlin-3) con una potenza di inibizione del legame p-53/MDM2 compreso nell'ordine di 100-300 nanomolare. Tra di essi quello che ha dimostrato maggior efficacia è il Nutlin-3, un cis-4,5 diidroimidazolo con quattro sostituenti, a sua volta caratterizzato da due enantiomeri, il Nutlin-3a ed il Nutlin-3b; la potenza del Nutlin-3a si è dimostrata 150 volte maggiore rispetto al Nutlin-3b nell'allontanare la proteina p-53 dal suo complesso con l'oncoproteina MDM2.

Piccole differenze strutturali della parte idrofila della molecola sono responsabili della diversa potenza di legame del Nutlin-3a, nello specifico i due sostituenti para-clorofenilici si legano alle due tasche di legame per la proteina p-53 presenti sulla MDM2 (Trp23 e Leu26), mentre il terzo fenile sostituito raggiunge indirettamente la tasca della Phe19 mediante un gruppo orto-isopropossi [Popowicz, et al., 2011; Shangary and Wang, 2009]. L'anello para-clorofenilico in posizione 5 si lega in profondità nella tasca costituita dal Trp23, il secondo sostituente para-clorofenilico si lega mediante la posizione 4 del suo anello alla tasca costituita dalla Leu26. Alcuni studi hanno confermato che l'impiego di un alogeno, come nel caso dei due sostituenti para-clorofenilici del Nutlin-3a, risulta importante nel riempimento di una tasca di legame sulla MDM2 lasciata invece libera dall'anello indolico del Trp23 della proteina p-53, determinando un significativo aumento di efficacia nell'inibizione della MDM2. Il quarto sostituente imidazolico invece non penetra direttamente all'interno della tasca per la p-53, ma interagisce con la tasca della Phe19 vicino alla Met62 della catena laterale per la MDM2.

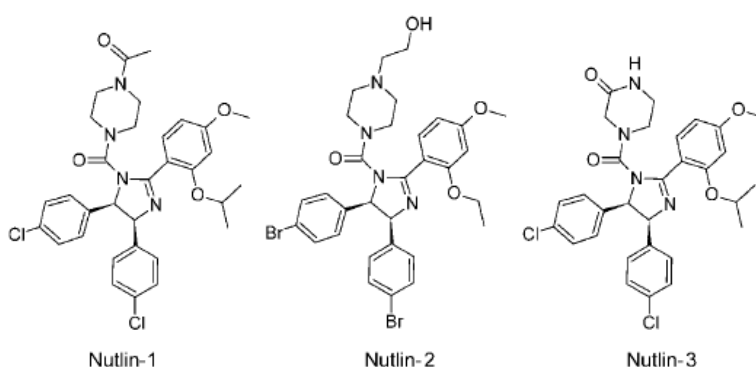


Figura 10: Confronto tra le strutture molecolari del Nutlin-1, Nutlin-2, Nutlin-3 [Popowicz, et al., 2011].

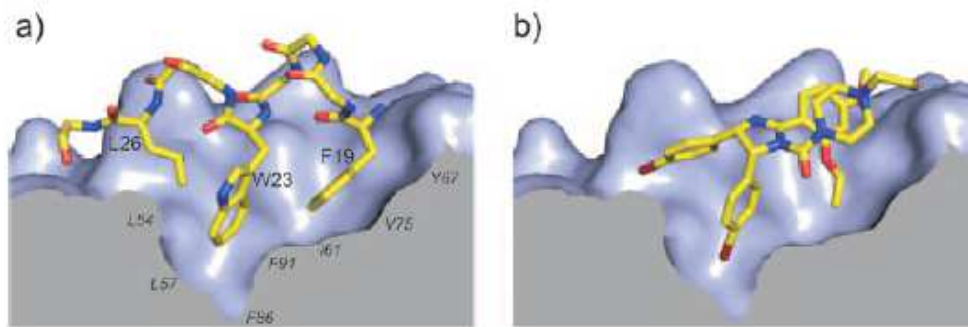


Figura 11: Rappresentazioni a) complesso tra la MDM2 e la p-53, b) Nutlin-2 e p-53 (combinazione di colori: C giallo, Br rosso scuro, F celeste, I porpora, N blu, O rosso) [Popowicz, et al., 2011].

Grazie all'interazione su citata dei sostituenti del Nutlin nelle tasche di legame per la p-53 presenti sulla MDM2, la proteina p-53 viene stabilizzata e si accumula nei nuclei delle cellule comportando l'attivazione della via apoptotica e l'arresto del ciclo cellulare.

Alla luce di tali risultati, il ripristino della funzione alterata della proteina p-53 si configura come una nuova strategia nella cura per diverse patologie tumorali che affliggono il nostro organismo e gli studi rivolti in maniera specifica alla cura dei tumori sanguigni come la leucemia linfatica cronica [Kojima et al., 2006; Secchiero et al., 2006], sembrano confermare l'impiego del Nutlin, soprattutto del Nutlin-3a come promettente strumento terapeutico.

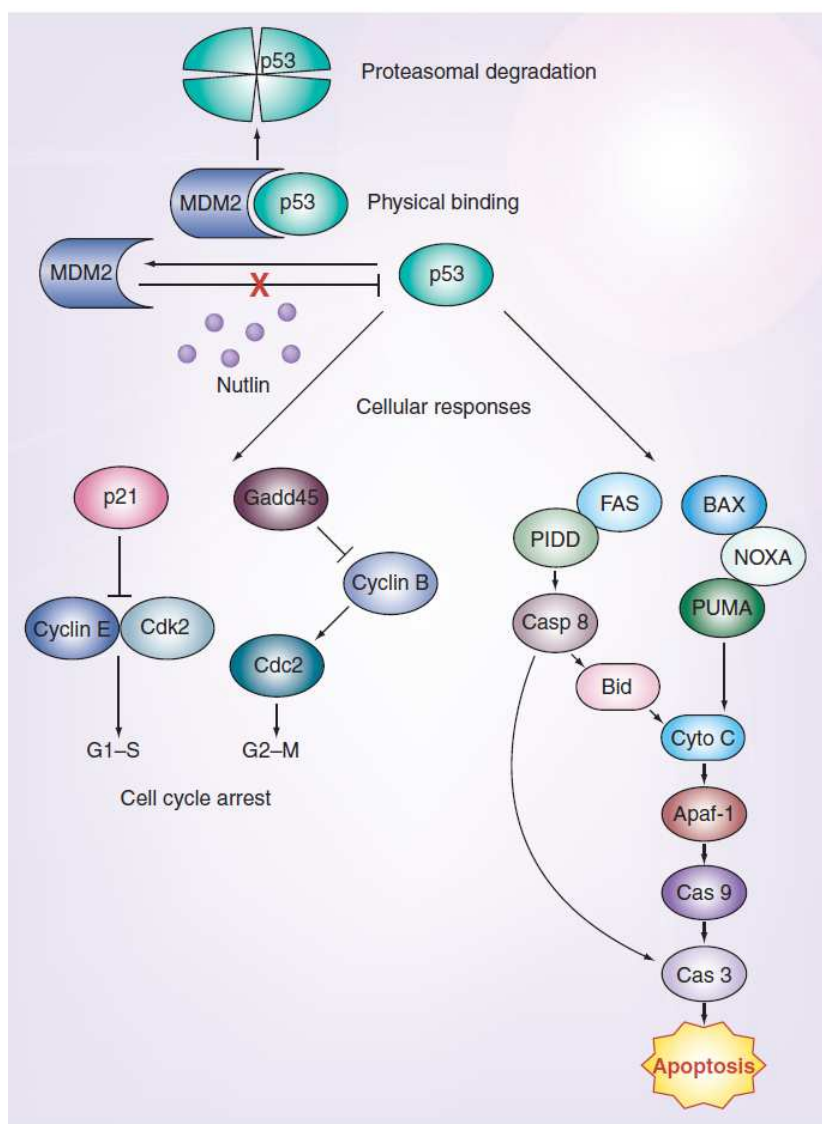


Figura 12: Rappresentazione schematica dell'inibizione della proteina p-53 mediata dall'interazione con l'oncoproteina MDM2 e stabilizzazione della proteina p-53 mediante l'impiego di Nutlin con la conseguente attivazione della via apoptotica e dell'arresto del ciclo cellulare [Das et al., 2011].

Il Nutlin-3 però presenta diverse limitazioni, come la sua scarsa solubilità in ambiente acquoso (0,1 mg/ml in tampone acquoso), la scarsa biodisponibilità e la tossicità dose-dipendente; inoltre, dopo trattamento in modello animale, si osserva sofferenza a diversi organi non target, per la aspecificità del trattamento. Come molti farmaci antineoplastici, il Nutlin-3 è altresì substrato delle MRDP (multidrug-resistance proteins) [Das et al., 2011; Das and Sahoo, 2011], in particolare della glicoproteina P, proteina transmembrana in grado di pompare nell'ambiente extracellulare i farmaci che diffondono attraverso la membrana cellulare, con conseguente riduzione della efficacia terapeutica Nutlin-3 [Michaelis et al., 2009], limitata anche dalla intensa degradazione lisosomiale intracellulare. E' pertanto richiesta una dose

di attivo elevata per arrivare al desiderato effetto terapeutico, il che comporta la comparsa di diversi effetti di tossici ben descritti in *letteratura [Das and Sahoo, 2011]*.

In questo contesto, la veicolazione in vettori polimerici come le nanoparticelle può migliorare la somministrazione dell'attivo e la terapia by-passando le caratteristiche chimico-fisiche dell'attivo ostiche alla somministrazione e riducendone la dose da somministrare: infatti, il farmaco protetto nel sistema vettoriale, può circolare per tempi utili così da raggiungere il target ed essere ceduto solo dentro la cellula bersaglio; per arrivare a tale selettività, la nano particella polimerica può essere funzionalizzata con molecole ligando selettive che riconoscano specifici recettori espressi massivamente alla superficie delle cellule cancerose.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo impostato la nostra ricerca cercando di ottimizzare caricamento e rilascio del Nutlin-3 in nanoparticelle polimeriche opportunamente ingegnerizzate in superficie con l'anticorpo monoclonale Rituximab, diretto verso recettori di membrana sovraespressi sulla superficie delle cellule cancerose.

SCOPO del LAVORO

Considerando le problematiche relative alla diagnostica in vivo e alla somministrazione efficace e mirata di farmaci, e l'esperienza nella progettazione di sistemi nanometrici per la veicolazione ed il direccionamento di attivi maturato negli anni dal gruppo di ricerca di tecnologia farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita presso il quale ho svolto le mie ricerche, scopo della mia tesi è stato la progettazione, formulazione, caratterizzazione ed applicazione di sistemi nanoparticellari polimerici per la risoluzione di due diverse problematiche:

1) Visualizzazione in vivo di nanosistemi impiegati in diagnostica e nel rilascio di farmaci al sistema nervoso centrale (Diagnostica in vivo): una prima parte del progetto di ricerca ha riguardato l'allestimento di nanoparticelle polimeriche ingegnerizzate con sonde fluorescenti e con un eptapeptide progettato dal gruppo di ricerca con il quale collaboro che, se legato alla superficie di sistemi polimerici nanoparticellari, rende possibile l'attraversamento della barriera ematoencefalica. Scopo di questo studio sono state la progettazione e la validazione dei sistemi nanoparticellari quali vettori per diagnostica (*optical imaging*) al fine di poterne seguire in tempo reale la biodistribuzione, anche e soprattutto ottenendo un "Brain-Live Imaging", ovvero una visualizzazione "live" della capacità di targeting cerebrale; a tale scopo verranno allestiti studi in vivo su animale.

2) Applicazione delle nanoparticelle nella veicolazione e nel direccionamento di farmaci antitumorali: la seconda parte del progetto ha riguardato la progettazione, l'ottimizzazione e la caratterizzazione di nanoparticelle ottenute con la tecnica della emulsione semplice, impiegate successivamente per la veicolazione di un farmaco antitumorale (Nutlin-3) attivo contro le leucemia linfatica cronica. Inizialmente sono stati valutati parametri formulativi quali potenze e tempi di sonicazione, metodiche di purificazione e di caratterizzazione e condizioni di conservazione così da ottimizzare la formulazione. Successivamente si è tentata l'incapsulazione del Nutlin-3 e l'ingegnerizzazione dei sistemi per ottenere un direccionamento selettivo, coniugando sulla superficie un anticorpo monoclonale, il Rituximab, specificamente riconosciuto dalle cellule target.

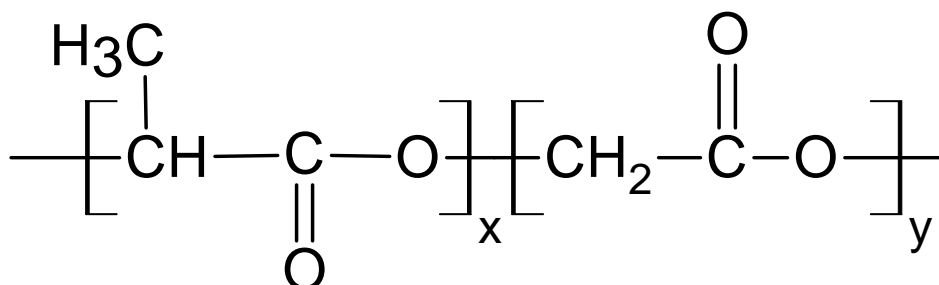
Tali nanosistemi sono stati testati in studi in vitro per valutare la capacità transfettiva dei vettori e l'efficacia del farmaco veicolato, e successivamente in vivo per valutarne la capacità direccionante e l'efficacia terapeutica.

MATERIALI

PLGA RG 503-H/PLGA RG 502-H

Acido poli (lattico-co-glicolico)

$(C_3H_4O_2)_x(C_2H_2O_2)_y$; MW 11000 g/mol; 4900 g/mol; densità 1.34; Boehringer Ingelheim



Co-polimero costituito da un'unità base di acido lattico (x) e di acido glicolico (y). Biocompatibile e biodegradabile è stato approvato dalla U.S. FDA per somministrazione parenterale ad uso umano. RG è la sigla che indica che l'acido lattico che compone il polimero è in forma racemica (R) e che l'altro monomero è l'acido glicolico (G). Il codice offre indicazioni circa la composizione del polimero: 50 specifica che il rapporto lattico/glicolico è 50:50; il terzo numero, di serie, indica il peso molecolare medio del polimero; H identifica la terminazione, ovvero la presenza del terminale carbossilico.

Aspetto: Polvere bianca priva di odore.

Solubilità: Solubile in diclorometano, acetato di etile, acetonitrile, cloroformio e acetone; insolubile in acqua e in metanolo.

Conservazione: -20°C, in contenitori ben chiusi.

Il polimero **PLGA RG503-H** presenta

- rapporto molare D,L lattico:glicolico compreso tra 48:52 e 52:48
- peso molecolare (MW)_i ≈ 11000 g/mol
- peso specifico 1.34 g/ml,
- viscosità: 0.32/0.44 dl/g in soluzione cloroformica 0.1%, r.t.
- T_g ≈ 45-50°C.
- gruppi carbossilici liberi (via titolazione acido-base)= 88.2 μmol/g di polimero
- impurezze; a) residui monometrici (max 0.5% di acido lattico e 0.5% di acido glicolico), b) residui acidi (min 3 mg KOH/g di polimero), c) solventi residui (max 0.1% di acetone, 0.089% di toluene, 0.1% solventi totali, d) metalli pesanti (max 10 ppm).

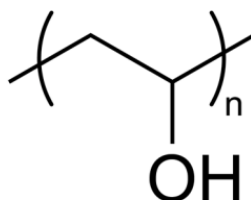
Il polimero **PLGA RG502-H** presenta

- rapporto molare D,L lattico:glicolico compreso tra 48:52 e 52:48

- peso molecolare (MW)_i ≈ 4900 g/mol
- peso specifico 1.34 g/ml.
- viscosità: 0.16/0.24 dl/g in soluzione cloroformica 0.1% r.t.
- T_g ≈ 42-46°C.
- gruppi carbossilici liberi (via titolazione acido-base)= 204 μmol/g di polimero
- impurezze; a) residui monomerici (max 0.5% di acido lattico e max 0.5% di acido glicolico), b) residui acidi (min 6mg KOH/g).

POLIVINILALCOL (PVA)

(C₂H₄O)_x; MW 15000 g/mol; densità 1.19-1.31 g/cm³; T_f 230°C; Sigma-Aldrich



È un omopolimero dell'alcol vinilico, impiegato come tensioattivo anionico per la stabilizzazione di emulsioni olio/acqua. Il suo utilizzo non è approvato dalla FDA nelle formulazioni farmaceutiche destinate ad essere somministrate per via parenterale.

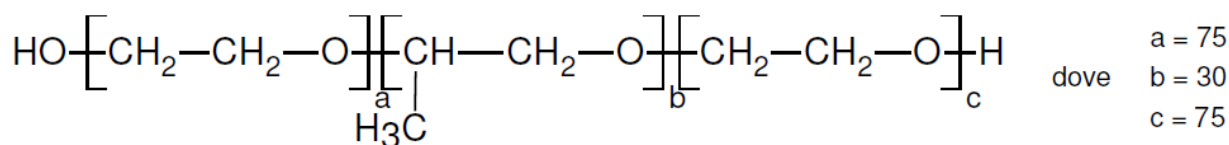
Aspetto: Polvere bianca priva di odore.

Solubilità: Solubile in acqua.

Conservazione: Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in luogo fresco, asciutto e ben ventilato, lontano da fonti di calore, scintille e fiamme.

PLURONIC F-68

$(C_3H_6O.C_2H_4O)_x$; MW 8400 g/mol; Tf 52°C; Sigma Aldrich



Il Pluronic F68 è un polimero derivato dal metossirano, utilizzato come tensioattivo anionico per preparare e stabilizzare emulsioni olio/acqua. Biocompatibile e biodegradabile. E' accettato dall'FDA per somministrazione parenterale.

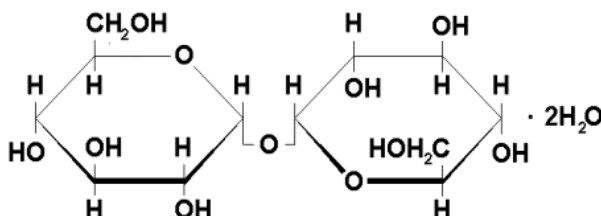
Aspetto: Solido bianco.

Solubilità: Solubile in acqua.

Conservazione: Immagazzinare in luogo fresco a temperatura ambiente. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

TREALOSIO DIIDRATO

$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$; MW 378.33 g/mol; Tf 97°C; densità 1.76 g/cm³; Sigma-Aldrich



E' un disaccaride costituito da un legame 1/1 tra due molecole di glucosio. E' impiegato come crioprotettore nel processo di liofilizzazione delle nanoparticelle.

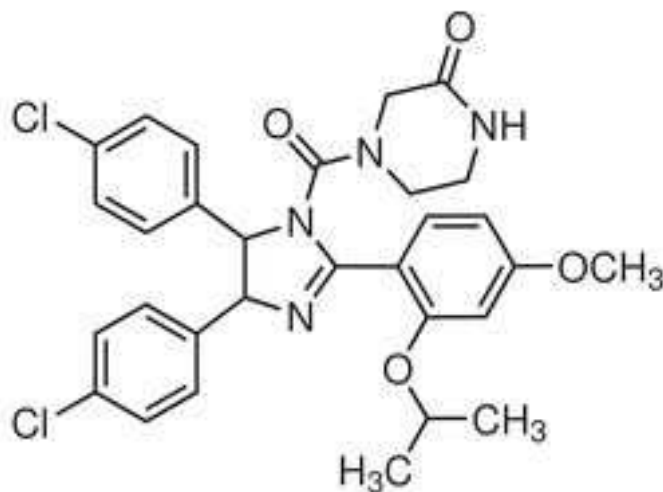
Aspetto: Polvere cristallina bianca

Solubilità: Solubile in acqua.

Conservazione: Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

NUTLIN 3

$C_{30}H_{30}Cl_2N_4O_4$; MW 581.5 g/mol; densità 1.363 g/cm³; Cayman Chemical



(±)-4-[4,5-bis-(4-clorofenil)-2-(2-isopropossi-4-metossi-fenil)-4,5-diidro-imidazolo-1-carbonil]-piperazin-2-one

Il Nutlin-3 è un farmaco antitumorale; è un potente inibitore dell'interazione tra p-53 e MDM2, con azione oncosoppressiva; induce inoltre l'espressione di geni regolatori della p-53. Non mostra attività in cellule con p-53 mutata.

Aspetto: Solido cristallino.

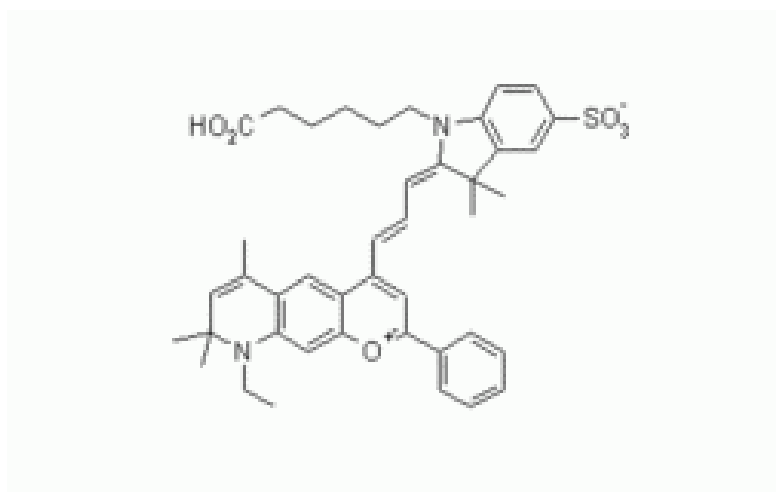
Solubilità: Il Nutlin-3 è solubile in etanolo, DMSO e dimetilformammide (\cong 25mg/ml).

La solubilità in tamponi acquosi è limitata. La solubilità in miscela etanolo: PBS1:10 (v/v) (pH 7.2) è di \cong 0.1 mg/ml. Normalmente viene solubilizzato in etanolo e successivamente diluito con il tampone acquoso prescelto.

Conservazione: -20°C, in recipienti ben chiusi, una volta aperto perde rapidamente di attività.

DY-675

$C_{44}H_{53}N_4O_5S$; MW 785.45 g/mol; Dyomics

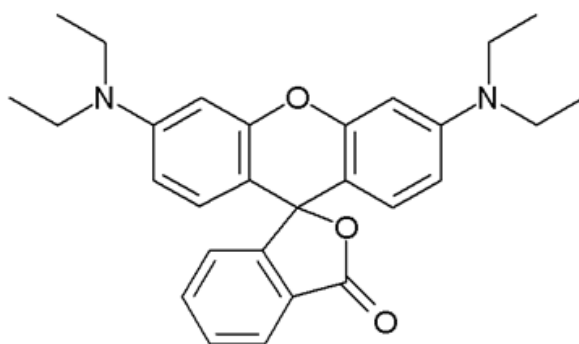


Marker fluorescente impiegato per studi di imaging, di microarray, di microscopia e gel elettroforesi. Presenta un picco di assorbimento a 674 nm e di emissione a 699 nm.

Solubilità: Solubile in metanolo, etanolo, dimetilsolfossido e dimetilformamide.

RODAMINA B Base

$C_{28}H_{30}N_2O_3$; MW 442.56 g/mol; Tf 160°C; Sigma-Aldrich



Marcante utilizzato per studi in microscopia a fluorescenza e confocale.

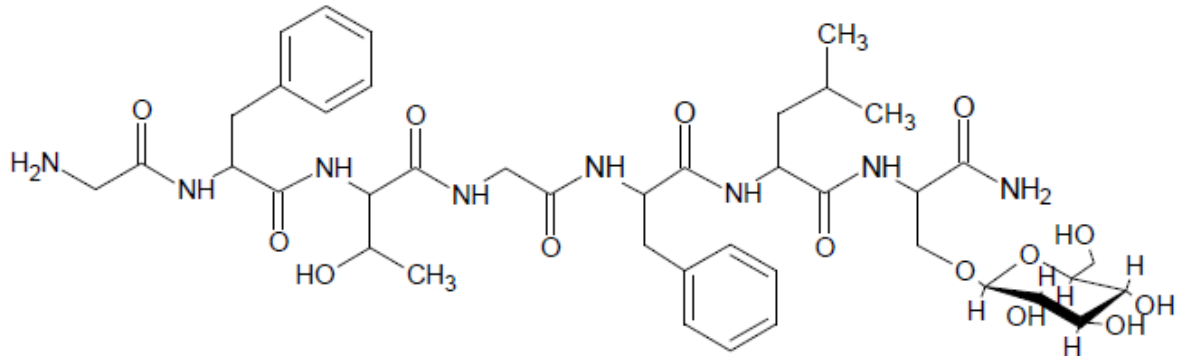
Aspetto: Povere di colore rosa o rosa-rosso

Solubilità: Solubile in etanolo, metanolo, diclorometano e acqua.

Conservazione: Immagazzinare a 4°C. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato, al riparo dalla luce.

PEPTIDE g7

$C_{41}H_{60}N_8O_{14}$; MW 888.96 g/mol



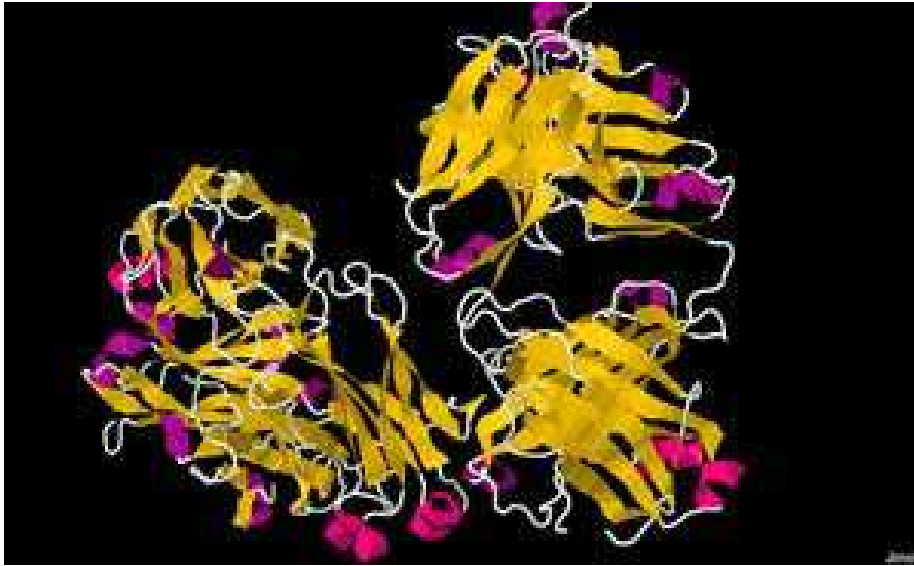
E' un peptide simil-opioide di sintesi [Costantino et al., 2005] formato da 7 amminoacidi di cui una serina glicosilata, in grado di promuovere il passaggio attraverso la BBB

Aspetto: Fine polvere bianca.

Conservazione: Immagazzinare in pallone da reazione a 4°C, ben chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

RITUXIMAB

C₆₄₁₆H₉₈₇₄N₁₆₈₈O₁₉₈₇S₄₄; MW 143859.7 g/mol; Roche



Il Rituximab (Rituxan®, Mabthera®), è un farmaco appartenente alla classe degli anticorpi monoclonali. Si utilizza per il trattamento del tipo più diffuso di linfoma non Hodgkin di grado basso (a cellule B). Il rituximab si lega a una proteina che si chiama CD20 e che si trova sia sulla superficie dei linfociti B maligni sia sulla superficie di quelli normali; tuttavia, l'organismo è in grado di sostituire rapidamente eventuali globuli bianchi normali danneggiati, riducendo in tal modo sensibilmente il rischio di effetti collaterali. In particolare, il dominio Fab del rituximab si lega all'antigene CD20 e attiva le funzioni effettrici del sistema immunitario con lo scopo di provocare la lisi delle cellule B tramite il dominio Fc. I meccanismi possibili della lisi cellulare comprendono la citotossicità complemento-dipendente (CDC) attraverso il legame con il C1q, e la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) mediata da uno o più recettori Fc g sulla superficie di granulociti, macrofagi e cellule NK.

Per la derivatizzazione di polimeri, coniugazione/modificazione superficiale delle nanoparticelle sono stati impiegati i seguenti reattivi:

- N-idrossi succinimide (NHS; $C_4H_5NO_3$; MW 115.09 g/mol, Tf 95-98°C; Sigma-Aldrich)
- N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodimide clorurato (EDC; $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$; MW 194.71 g/mol; Tf 113°C; Sigma-Aldrich)
- N,N'-Dicicloesilcarbodiimide (DCC; $C_{13}H_{22}N_2$; MW 206.33g/mol; Sigma-Aldrich)
- trimetilalluminio (C_3H_9Al ; MW 72.09 g/mol; Sigma-Aldrich)
- piperazina ($C_4H_{10}N_2$; MW 86.14 g/mol; Sigma-Aldrich)
- trietilammina ($C_6H_{15}N$; MW 101.19 g/mol; densità 0.726 g/ml; Sigma-Aldrich)

Nella derivatizzazione dei polimeri e nella preparazione dei sistemi sono stati utilizzati diversi solventi:

- acetone (C_3H_6O , MW 58 g/mol; Te 56.2 °C Sigma-Aldrich)
- diclorometano (CH_2Cl_2 , 85 g/mol; Te 40 °C Sigma-Aldrich)
- 1,4-Diossano Anidro ($C_4H_8O_2$; MW 88.11 g/mol; Te 101 °C; Sigma-Aldrich)
- dimetilsolfossido anidro (C_2H_6OS ; MW 78.13 g/mol; DMSO; Te 189 °C; Sigma-Aldrich)

Sono stati allestiti diversi tamponi per la risospensione delle nanoparticelle. Per la loro preparazione sono stati impiegati:

- Acido 2 (N-morfolino) etansulfonico (MES; $C_6H_{13}NO_4 \cdot H_2O$; MW 195,2 g/mol; Tf 300°C; Sigma-Aldrich)
- fosfato di sodio dibasico monoidrato (Na_2HPO_4 ; MW 141.96 g/mol ; Tf 250 °C; Sigma Aldrich)
- diidrogeno fosfato di potassio (KH_2PO_4 ; MW 136.09 g/mol; Tf 253 °C; Sigma Aldrich)
- cloruro di sodio ($NaCl$; MW 58.44 g/mol; Tf 801 °C; Carlo Erba)

Tanti altri reattivi sono stati impiegati nei test in vitro (su cellula) o in vivo (su animale e tessuto) e, laddove possibile, sono riportate le indicazioni nella sezione risultati, durante la discussione.

METODI

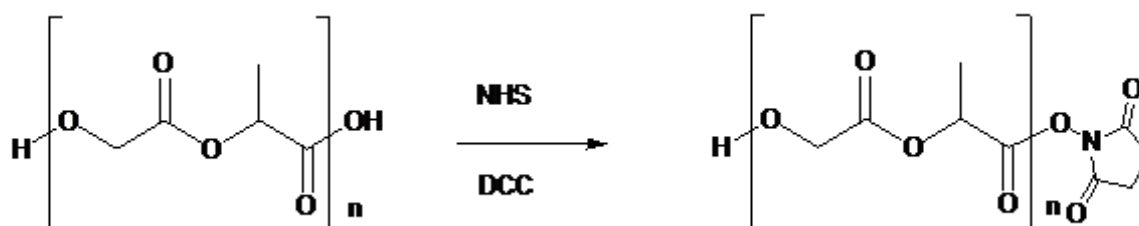
Ingegnerizzazione dei polimeri

Preliminarmente sono stati preparati tutti i reattivi ed i polimeri da impiegare nella formulazione dei sistemi. Ogni qualvolta si è resa necessaria la sintesi dei polimeri modificati, sono state allestite le seguenti reazioni di coniugazione, e i polimeri ottenuti sono stati identificati via NMR, spettroscopia di massa o caratterizzazione fluorimetrica, quantificandone la resa.

Per gli studi di optical imaging, il PLGA RG 503 H è stato modificato con il peptide g7, per attuare l'attraversamento della BBB e il direccionamento al cervello, e con il DY-675, la sonda indagata e proposta per l'applicazione.

Per gli studi in vitro di applicazione delle nanoparticelle nella terapia antitumorale è stato utilizzato il polimero PLGA RG 502 H modificati con Rodamina B base, tracciabile alla microscopia a fluorescenza e confocale.

Primariamente sono stati attivati i gruppi reattivi (gruppi carbossilici) del PLGA per formazione dell'estere succinimmidico.



RG 503 H	PM~11000	88 μmoli	1.000 g	RG 502 H	PM~5000	204 μmoli	1.000 g
NHS	PM 115.09	105.6 μmoli	0.012 g	NHS	PM~115.09	244.8 μmoli	0.028 g
DCC	PM 206.33	105.6 μmoli	0.022 g	DCC	PM 206.33	244.8 μmoli	0.050 g
Diossano anidro			15 ml	Diossano anidro			15 ml

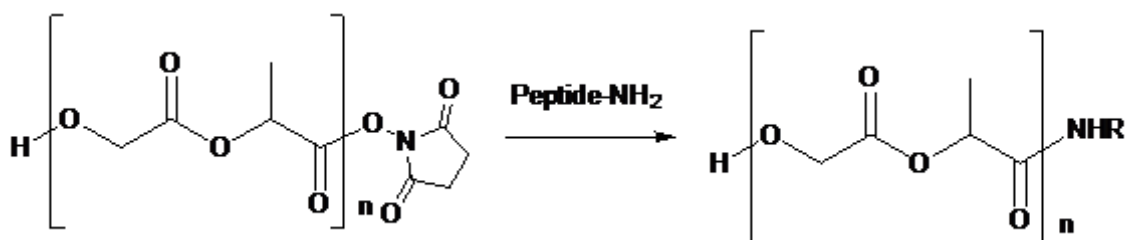
Per attivare i terminali carbossilici del polimero, si procede sciogliendo il PLGA in 15 ml di diossano anidro; si raffredda a 10°C l'ambiente di reazione con bagno ad acqua, e successivamente si aggiungono nell'ordine N-idrossisuccinimide (NHS) e dicicloesilcarbodiimide (DCC). La reazione viene mantenuta per 4 ore a r.t., sotto continua agitazione magnetica. La sospensione viene filtrata sotto vuoto ed il polimero (PLGA-NHS) viene sottoposto a precipitazione con etere anidro. Si ri-solubilizza il polimero in poco diossano anidro e si riprecipita con etere (si ripete 2 volte).

Il grado di esterificazione del polimero con NHS è di 50-60 μmoli NHS/g di polimero RG503H e 110-130 μmoli NHS/g di polimero RG502H . Questo è stato calcolato attraverso la spettroscopia ¹H-

NMR in CDCl_3 , valutando l'area sottesa tra il picco di un multipletto a 2.95 ppm e di un altro multipletto a 1.80-1.90 ppm, corrispondenti rispettivamente ai protoni dell'NHS e a quelli dei gruppi metilici del polimero.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 1.7 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-PLGA}$), 2.95 (2H, s, NHS), 4.9 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-PLGA}$), 5.3 (1H, m, CH-PLGA).

Derivatizzazione del PLGA 503 H con il peptide g7



RG503H-NHS		88 μmoli	1 g
Peptide g7	PM 889	66 μmoli (0,75 eq)	0.058 g
TEA*	PM 101.19 $\delta = 0.726$ g/ml	99 μmoli (1,5 eq)	14 μL
DMSO			5+2 ml

* In queste reazioni è richiesto l'impiego di Trietilamina per basicare l'ambiente e rendere quindi disponibile il gruppo amminico del peptide o del marker per l'attacco del nucleofilo. E' necessario tamponare il pH perché dopo il processo di sintesi peptidica in fase solida, il peptide g7 viene isolato come sale dell'acido trifluoroacetico.

Il polimero è in grado di reagire, a livello del suo gruppo carbossilico attivato, con il gruppo amminico primario terminale del peptide g7 formando un legame ammidico. Le moli di peptide di trietilamina (TEA) utilizzate sono calcolate in rapporto a quelle del polimero. Il polimero attivato viene disciolto in 5 ml di dimetilsolfossido (DMSO) e posto in pallone di reazione, sotto agitazione elettromagnetica; il peptide, solubilizzato in 2ml dello stesso solvente e basicato con trietilamina (in eccesso rispetto al polimero), viene addizionato al polimero solubilizzato nel pallone di reazione; dopo aver addizionato trietilamina fino ad un massimo di 2.5-3 equivalenti totali, la reazione procede a r.t per 7 ore, sempre sotto agitazione elettromagnetica.

Al termine della reazione, si precipita il polimero versando la soluzione in etere anidro. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante solubilizzazione in DCM (l'ambiente viene acidificato con 2 gocce di etere saturo di HCl per neutralizzare l'eccesso di trietilamina) e precipitazione con MeOH (due cicli successivi); infine viene solubilizzato in DCM e concentrato a pressione ridotta con rotavapor.

¹H-NMR (DMSO-d6): δ (ppm) 1.7 (3H, s, CH₃-PLGA), 4.9 (2H, m, CH₂-PLGA), 5.3 (1H, m, CH-PLGA), 7.3 (0.146H (RG502H); 0.076H (RG503H), m, H aromatici fenilalanina).

Resa di derivatizzazione 30% per entrambi i polimeri, calcolata in base ai picchi del ¹H-NMR.

Derivatizzazione del PLGA 503 H con il marker fluorescente DY-675

RG503H-NHS		88 μ mol	0,1g
DY-675	PM 785,45	7,6 μ mol (0,86 eq)	0,06 g
TEA*	PM 101.19 $\delta = 0.726$ g/ml	15,2 μ mol (1,72 eq)	2,2 μ L
DMSO			5+2 ml

Il polimero è in grado di reagire, a livello del suo gruppo carbossilico attivato, con il gruppo amminico primario terminale del marker fluorescente DY-675, formando un legame ammidico, seguendo lo stesso procedimento adottato nel capitolo precedente. Anche in questo caso le moli di marker utilizzate sono calcolate in rapporto a quelle del polimero.

In breve, il polimero attivato (100 mg) viene disciolto in 1 ml di dimetilsolfossido anidro (DMSO) tramite agitazione elettromagnetica e addizionato di trietilamina e DY-675 amino-derivato. La soluzione è mantenuta sotto agitazione per 7 ore a temperatura ambiente.

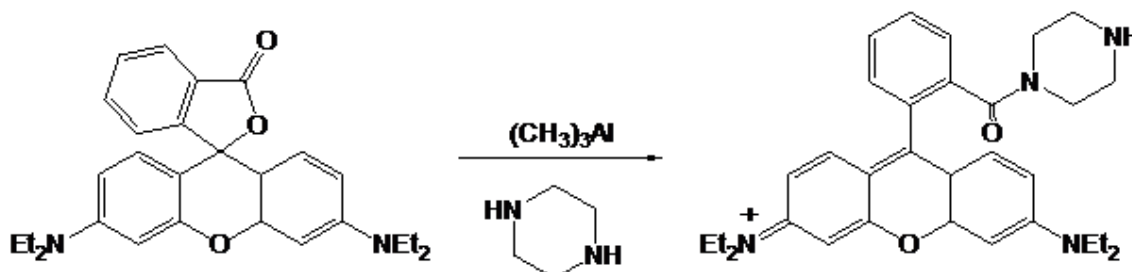
Al termine della reazione si precipita il polimero versando la soluzione del polimero stesso in etere anidro (circa 50 ml) posto in una beuta. Il prodotto precipita sul fondo sotto forma di olio. Si elimina l'etere dalla beuta, avendo cura di non eliminare anche la parte oleosa sottostante. Si risolubilizza l'olio con poco DCM e si aggiungono poche gocce di etere saturo di HCl (si sviluppa fumo) e subito dopo si precipita con metanolo. Si ri-solubilizza il precipitato con DCM e si trasferisce in pallone, riprendendo la beuta più volte per recuperare tutto il polimero e si evapora il solvente in rotavapor.

Le soluzioni organiche scartate dalla precipitazione sono state unite e portate a secco per valutare il colorante non reagito, mediante una lettura spettrofotometrica.

La resa è calcolata sulla base del log ϵ (log ϵ 2.04, DMC) del colorante a un massimo k (674.0 nm); la resa è dell'11.0%. Il polimero così ottenuto DY-PLGA è caratterizzato con spettroscopia ¹H NMR (DPX 200; Bruker, Rheinstetten, Germany) hanno mostrato i seguenti parametri: ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 1.7 (3H, s, CH₃-PLGA), 3.65 (m, CH₂-Dy-675), 4.9 (2H, m, CH₂-PLGA), 5.3 (1H, m, CH-PLGA).

Sintesi del PLGA RG 502 H-Rodamina

Modifica della Rodamina B base in Rodamina B piperazinamide



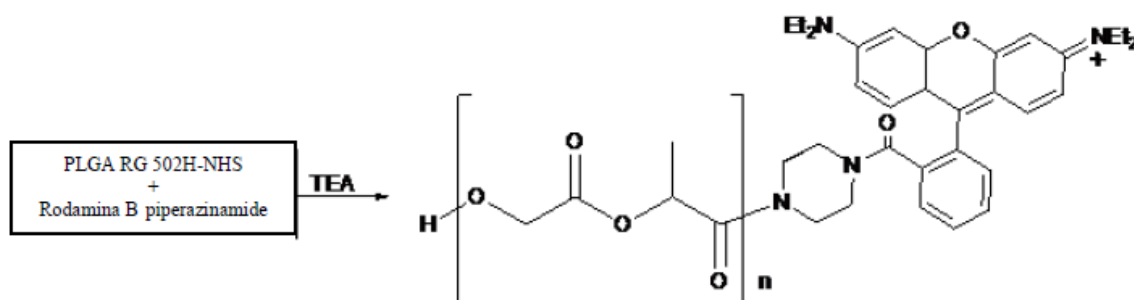
Rodamina B base	PM 442.56	5.65 mmoli	2.5 g
$(\text{CH}_3)_3\text{Al}$ soluzione in toluene 2M		11.3 mmoli	5.65 ml
Piperazina	PM 86	22.75 mmoli	1.956 g
HCl 0.1 N			
DCM anidro			20 ml

L'apparecchiatura impiegata è costituita da un pallone anidro a tre colli, occupati da un imbuto gocciolatore, un refrigerante con alla estremità un gorgogliatore e un raccordo con l'ingresso per l'azoto (indispensabile per il mantenimento di una atmosfera il più possibile anidra).

Alla piperazina solubilizzata in DCM anidro, viene addizionata goccia a goccia nell'arco di 4 min (per evitare un riscaldamento eccessivo) la soluzione di $(\text{CH}_3)_3\text{Al}$. La soluzione risultante viene mantenuta in agitazione per un'ora dopodiché la Rodamina B base solubilizzata in DCM viene addizionata goccia a goccia. La reazione viene condotta sotto riscaldamento a riflusso, mantenendo l'agitazione per una notte.

La mattina successiva si nota la formazione di un precipitato bruno. Si acidifica per aggiunta di HCl 0.1 N (fino a che non si interrompe lo sviluppo di gas). Il precipitato viene allontanato per filtrazione. La soluzione concentrata a pressione ridotta. Si riprende la soluzione concentrata con una soluzione all'1% di sodio bicarbonato e si lava con EtOAc. La fase acquosa viene acidificata nuovamente con HCl 1N e si estrae il prodotto con una miscela di IsoPrOH/DCM 2/1 fino a quando la soluzione acquosa diventa limpida. La frazione organica viene successivamente anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco con rotavapor. Il prodotto ottenuto viene cristallizzato da MeOH-Et₂O.

Modifica del PLGA con Rodamina B piperazinamide



RG502H-NHS		0.204 mmoli	1 g
Rodamina B piperazinamide	PM 511.3	0.204 mmoli	0.104 g
TEA ($\delta = 0.726$ g/ml)	PM 101.19	0.408 mmoli	57 μ l
DMSO anidro			5+2 ml

Il polimero attivato viene solubilizzato in 5 ml di DMSO sotto agitazione elettromagnetica; il colorante (Rodamina B piperazinamide), solubilizzato in 2 ml dello stesso solvente e basificato con TEA (in eccesso rispetto a quanto calcolato) è addizionato alla soluzione del polimero; viene addizionate TEA (fino ad un massimo di 2.5 equivalenti totali) e la reazione protratta sotto agitazione magnetica per 6 ore. Il polimero è successivamente precipitato in etere anidro. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante solubilizzazione in DCM (l'ambiente viene acidificato con 2 gocce di etere saturo di HCl) e precipitazione con MeOH (due cicli successivi); infine viene solubilizzato in DCM e concentrato a pressione ridotta con rotavapor.

Preparazione delle nanoparticelle

Per la preparazione delle nanoparticelle sono state utilizzate due tecniche differenti: la nanoprecipitazione e l'emulsione semplice. La nanoprecipitazione è la metodica adottata negli studi di formulazione e valutazione dell'impiego di nanoparticelle opportunamente modificate nell'optical imaging, mentre l'emulsione semplice diviene tecnica di elezione per migliorare l'efficacia di incapsulazione di farmaci poco formulabili come il Nutlin, l'antitumorale oggetto di studio.

Preparazione e recupero delle nanoparticelle PLGA-g7-DY-675

(nanoprecipitazione)

Le nanoparticelle DY-g7-PLGA sono state ottenute per nanoprecipitazione [Fessi et al. 1989]. Brevemente, i polimeri (g7-PLGA503H, DY-PLGA503H e PLGA503H) sono solubilizzati in acetone (8 ml) in rapporto di peso 1:1.5:1.5.

La soluzione organica è stata addizionata goccia a goccia a 25 ml di una soluzione acquosa di Pluronic F-68 (100 mg) e mantenuta sotto agitazione magnetica per 10 min a temperatura ambiente, per permettere l'evaporazione del solvente che determina la precipitazione del polimero e la formazione delle nanoparticelle. A nanoprecipitazione avvenuta, la sospensione viene posta in evaporatore rotante (30 °C x 30 min; ROTAVAPOR-Buchi R 114) per allontanare completamente il solvente organico. Il volume finale della preparazione è stato portato a 10 ml con acqua distillata. Le nanoparticelle sono state purificate per gel filtrazione su colonna di Sepharose (Sepharose CL 4B gel (160 ml), column 50 x 2 cm) utilizzando acqua come fase eluente; successivamente sono state riprese in acqua e liofilizzate (Lyovac GT-2, Leybold-Heraeus, Hanau, German) senza aggiunta di crioprotettore

Preparazione di nanoparticelle polimeriche in emulsione semplice

Ottimizzazione dei parametri formulativi

Inizialmente si è cercato di valutare le diverse variabili formulative così da ottimizzare la tecnica di formulazione. Le nanoparticelle sono state preparate mantenendo costanti alcuni parametri formulativi quali, il peso molecolare del polimero (abbiamo utilizzato il PLGA 502H perché già utilizzato per formulare nanoparticelle per doppia emulsione e nano precipitazione e quindi polimero ben conosciuto, versatile e ben solubile nei solventi richiesti per le diverse reazioni, anche di modificazione superficiale), il tipo, la concentrazione del surfattante (1% PVA), il rapporto tra la fase organica e la fase acquosa (1:6), mentre abbiamo variato parametri secondari come la potenza ed il tempo di sonicazione, e nella fase di congelamento/pre-liofilizzazione la concentrazione di trealosio aggiunta. Di fatto abbiamo allestito una emulsione semplice tra una fase organica interna (1 ml DCM) contenente il polimero (50 mg PLGA) e fase acquosa esterna contenente il tensioattivo (6 ml PVA 1%). L'emulsione è stata realizzata tramite sonicazione in bagno di ghiaccio, variando le condizioni di sonicazione: 100 watt per 30 sec (prep A), 70 watt per 1 min (prep B), 55 watt per 1 min (prep C), 55 Watt per 2 min (prep D), 55 Watt per 30 min (prep E), 40 Watt per 1 min (prep F). Le emulsioni sono state mantenute sotto agitazione elettromagnetica per 3 ore a temperatura ambiente e successivamente purificate tramite centrifuga a 15000 rpm per 10' a 4 °C. Il pellet nanoparticellare è stato risospeso in acqua. Le nanoparticelle purificate sono state liofilizzate

previa aggiunta di trealosio; sono stati studiati diversi rapporti in peso tra polimero e trealosio (1:0.3, 1:0.5; 1:1; 1:2; 1:3 m/m). Le nanoparticelle sono state successivamente liofilizzate e conservate in frigorifero al riparo dalla luce, in contenitori chiusi.

Le preparazioni sono state caratterizzate in due diversi momenti formulativi: sono infatti state caratterizzate le nanoemulsioni che danno idea della stabilità del preparato dopo sonicazione mediante l'ausilio della photon correlation spectroscopy ed in particolare acquisendo i parametri di diametro medio, di indice di polidispersione e di potenziale zeta e mediante microscopia confocale a luce riflessa. Dopo di che sono state caratterizzate le nanoparticelle purificate e risospese dopo liofilizzazione. Da tale studio è stato possibile standardizzare un processo formulativo, applicato alla formulazione di nanoparticelle per la veicolazione e il direccionamento dell'antitumorale Nutlin- 3.

Preparazione di nanoparticelle polimeriche in emulsione semplice per la veicolazione ed il direccionamento di Nutlin-3

Sono state allestite diverse formulazioni di nanoparticelle caricate con Nutlin-3 utilizzando lo stesso procedimento riportato nel capitolo precedente con le variabili ottimizzate; in particolare la sonicazione viene effettuata a 55 Watt e protratta per 1 min, mentre, per migliorare la liofilizzazione, viene addizionato trealosio in rapporto in peso 1:1 con il polimero. In particolare vengono allestite:

- nanoparticelle di PLGA senza farmaco (controllo); in questo caso sono allestite nanoparticelle partendo da 100 mg di PLGA 503H (**NP**) oppure miscelando PLGA 503H e PLGA 502H modificato con rodamina B piperazinamide in rapporto in peso 97:3 m/m, nel caso si vogliano ottenere nanoparticelle marcate con fluoro cromo (**NP-R**).

- nanoparticelle di PLGA caricate con Nutlin-3: anche in questo caso sono state allestite nanoparticelle caricate con il farmaco non marcate con fluorocromo (**NP-Nut**) e marcate con fluorocromo (97:3 m:m PLGA503H/PLGA 502H modificato con rodamina B piperazinamide; **NP-R-Nut**). Il farmaco (10 mg ovvero 10% w/w rispetto al polimero) è solubilizzato nei 3 ml di diclorometano, assieme al polimero.

- nanoparticelle di PLGA con e senza Nutlin-3 e modificate con Rituximab: le nanoparticelle allestite con e senza Nutlin e marcate o non marcate con fluorocromo sono state attivate in superficie dopo la loro purificazione per favorire la coniugazione con l'anticorpo monoclonale Rituximab. Le nanoparticelle sono state allestite come precedentemente descritto; se in presenza di farmaco, il Nutlin-3 è stato solubilizzato in diclorometano assieme al polimero. Se marcate con fluorocromo, il polimero PLGA 503H è stato miscelato con PLGA 502H modificato con rodamina B piperazinamide. Una volta purificate, le nanoparticelle pellettizzate sono state risospese, con l'ausilio di un bagno sonicante, in MES

0,1 M (pH 4.75-5) così da ottenere una concentrazione di ~ 10 mg di nanoparticelle/ml. Alla sospensione nanoparticellare sono stati aggiunti i reattivi di derivatizzazione; NHS solubilizzato in MES in rapporto in peso 1:1 rispetto al polimero di partenza impiegato per l'allestimento delle nanoparticelle ed EDC anch'esso solubilizzato in MES in rapporto in peso 3:1 rispetto al polimero di partenza. La reazione è mantenuta a r.t per 1 ora sotto continua agitazione elettromagnetica. Successivamente, la sospensione viene centrifugata per allontanare i residui di reazione che non hanno interagito (15000 rpm per 10 min a 4°C). Le nanoparticelle modificate sono state risospese in PBS pH 7.0, mediante l'ausilio di un bagno sonicante (Microson[®]) così da mantenere una concentrazione di nanoparticelle prossima a 10mg/ml.

Alla sospensione di nanoparticelle è stata addizionata la soluzione di Rituximab (10mg/ml) in rapporto 1:50 rispetto al polimero di partenza (es. 140 µl di soluzione di Rituximab corrispondono a 1,4 mg di anticorpo e vengono impiegati per preparazioni con 70 mg di PLGA di partenza 70:1,4=1:50). La reazione è stata protratta per 60 min a r.t. sotto continua agitazione elettromagnetica. Le nanoparticelle modificate con rituximab sono state purificate per centrifugazione (15000 rpm per 10' a 4°C) e risospese in acqua milliQ. Prima di essere congelate e liofilizzate abbiamo addizionato una soluzione acquosa di trealosio diidrato così da ottenere un rapporto in peso 1:1 con il polimero.

Sono state allestite seguendo questa procedura le preparazioni:

- Ab-NP** (nanoparticelle di PLGA funzionalizzate con Rituximab)
- Ab-NP-R** (nanoparticelle di PLGA marcate con fluorocromo e funzionalizzate con Rituximab);
- Ab-NP-Nut** (nanoparticelle di PLGA caricate con Nutlin e funzionalizzate con Rituximab);
- Ab-NP-R-Nut** (nanoparticelle di PLGA marcate con fluorocromo, caricate con farmaco e funzionalizzate con Rituximab).

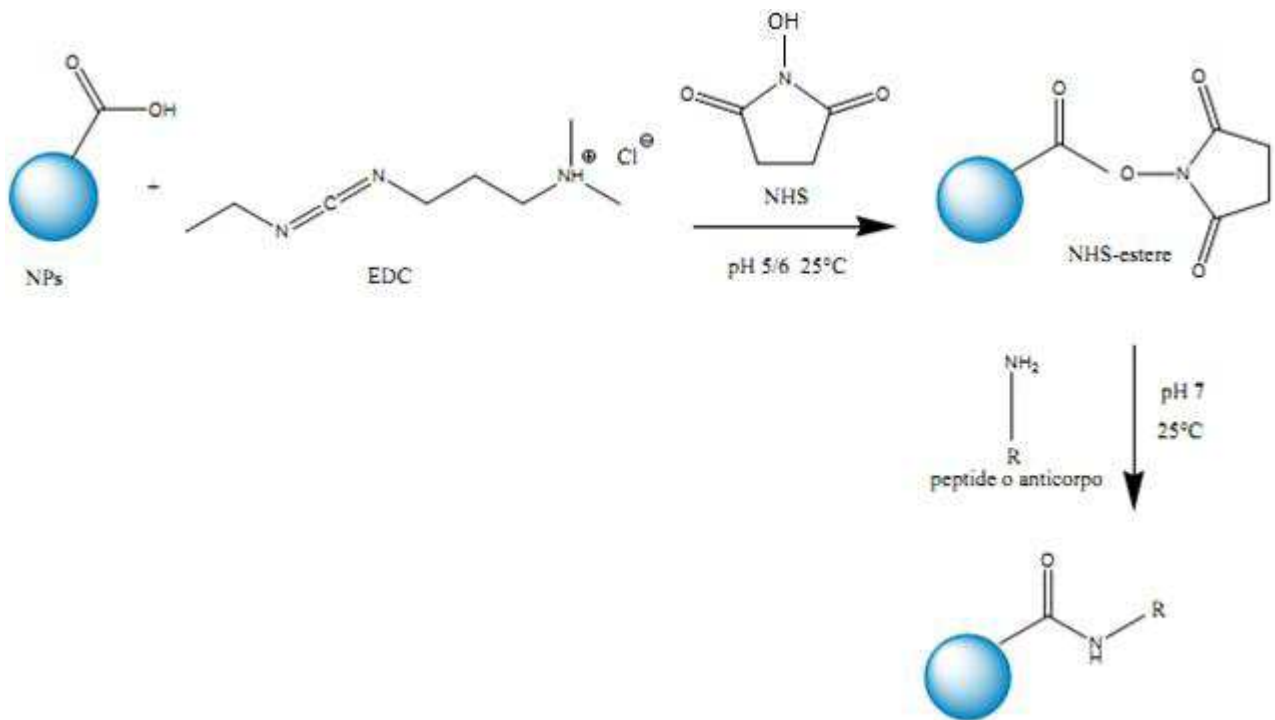


Figura 13: Reazione di derivatizzazione superficiale delle nanoparticelle.

Nota bene: Un importante aspetto tecnico da considerare per la buona riuscita della reazione di attivazione dei gruppi COOH del polimero, è la stabilità dei suoi intermedi e dei reagenti impiegati. L'EDC è infatti un composto altamente instabile in ambiente acquoso che quindi deve essere solubilizzato soltanto al momento dell'utilizzo; proprio per questa ragione si addiziona all'ambiente di reazione prima NHS e in un secondo momento la quantità di EDC, nonostante sia la molecola che reagisce per prima. Inoltre, benché l'estere succinimmidico (NHS-estere) sia sufficientemente stabile per portare a termine la reazione, questo tende facilmente a idrolizzare a seconda del pH dell'ambiente di reazione: l'NHS-estere ha una stabilità di 4-5 ore a pH 7, di 1 ora a pH 8 e di soli 10 min a pH 8.6. Quindi un aumento di pH comporta un incremento di reattività, ma anche una parallela destabilizzazione del composto [Staros et al., 1986]. Nel nostro caso si è scelto di utilizzare il tampone MES acidificato a pH di circa 5, per garantire stabilità all'intermedio nel corso della reazione, ottenendo così una buona attivazione delle catene polimeriche. Per la modifica superficiale il valore di pH non deve scendere troppo per evitare la disattivazione del gruppo amminico terminale (che protonandosi perderebbe carattere di nucleofilo), ma non deve nemmeno salire sopra 9 per non destabilizzare troppo l'NHS-estere; a tale scopo è stato impiegato il tampone fosfato a pH 7.0.

Caratterizzazione dei sistemi nanoparticellari

I sistemi nanoparticellari allestiti durante il mio dottorato sono stati opportunamente caratterizzati dal punto di vista chimico fisico; sono state applicate metodiche di scattering, microscopiche e spettroscopiche, per ottenere informazioni circa il diametro, la distribuzione dimensionale, la carica superficiale nell'intorno ionico considerato, la morfologia e la composizione.

Analisi dimensionale

I campioni sono stati analizzati mediante uno Zetasizer Nano ZS della Malvern Instruments (Malvern, UK; Laser 4 He-Ne, 633nm, Laser attenuator Automatic, transmission 100% to 0.0003, Detector Avalanche Photodiode, Q.E > 50% at 633nm). Tale strumento è fondamentale per ottenere informazioni sul diametro medio, sull'omogeneità del sistema, sulla distribuzione delle popolazioni nel campione e sulla misura del potenziale zeta.

La tecnica di riferimento per la determinazione dell'analisi dimensionale è la PCS (Photon Correlation Spectroscopy). Questa tecnica si basa sul principio per cui tutte le particelle in sospensione hanno un moto casuale in tutte le direzioni dello spazio, detto moto browniano. Esiste una relazione tra i movimenti browniani e la dimensione delle particelle: più la particella è grande, più il movimento è lento; più la particella è piccola più si muove velocemente. Tali moti possono essere descritti in modo quantitativo mediante il coefficiente di diffusione traslazionale (D), che è inversamente proporzionale al diametro della particella (d), in accordo con l'equazione di Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{KT}{3\pi \eta D}$$

dove:

D= coefficiente di diffusione traslazionale,

K= costante di Boltzman,

T= temperatura assoluta,

η = viscosità del mezzo,

d(H)= diametro idrodinamico o di Stokes, cioè il diametro che si riferisce a una particella che si muove in un fluido. Il coefficiente D delle particelle di una sospensione viene ricavato dallo strumento sulla base dell'intensità della luce diffusa dalla sospensione stessa. Quando una sospensione è attraversata da un raggio luminoso, generalmente un laser, una parte dei fotoni che

l'attraversano viene deviata dal cammino rettilineo verso tutte le direzioni dello spazio, dando origine alla luce diffusa. Se viene misurata l'intensità di questa luce in una data direzione si osserva che essa subisce delle variazioni che sono causate da moti browniani delle particelle. Tanto più le particelle sono veloci, e quindi piccole, tanto più le variazioni di intensità sono rapide; più la particella è grande e

minore sarà la sua velocità; tanto più alta sarà la temperatura, tanto più rapido sarà il movimento (a parità di dimensioni) perché sarà maggiore l'energia cinetica delle molecole di solvente.

Elaborando queste variazioni mediante una funzione matematica, detta "autocorrelazione", lo strumento riesce a calcolare il coefficiente D e quindi, dall'equazione precedente, il diametro medio delle particelle.

Utilizzando metodi matematici è inoltre possibile scomporre la funzione di autocorrelazione così da individuare le diverse popolazioni dimensionali del campione.

L'analisi è sempre stata condotta a temperatura ambiente (25°C), disponendo la sospensione nanoparticellare in cuvette di plastica a volume ridotto (700 μ l). Le analisi sono state condotte sulle nanoparticelle prima della purificazione, dopo purificazione e risospensione e dopo risospensione del liofilizzato. I diversi step di modifica sono stati altresì monitorati, L'analisi è stata effettuata diluendo tutti i campioni (10 μ l in 1 ml). Per ogni campione vengono effettuate almeno 3 misurazioni. Ogni campione è allestito in triplicato; i risultati sono ottenuti dalle media sulle tre preparazioni ed espresse come valore medio \pm la deviazione standard.

Analisi della carica superficiale (pot- ζ)

Anche la carica superficiale è di notevole importanza per la caratterizzazione dei sistemi particellari. E' possibile infatti avere informazioni riguardo alla stabilità del sistema ed è possibile valutare l'ipotetica interazione tra i componenti della formulazione e i farmaci caricati.

Per la valutazione della carica superficiale, 750 μ l di sospensione sono stati introdotti in una cella per microelettroforesi che è stata chiusa con appositi tappi ed introdotta nell'alloggiamento dello strumento.

Lo strumento inverte periodicamente il campo elettrico applicato tra i due elettrodi alle estremità della cella contenente il campione, consentendo di misurare il potenziale in qualsiasi punto e migliorare così l'affidabilità dell'analisi (Laser Doppler Velocimetry). Per la determinazione del pot- ζ , si abbinano tecniche quali la Laser Doppler Velocimetry a tecniche di light scattering. Di fatto, durante l'analisi, la cella è illuminata da due raggi laser che si intersecano. Le particelle sottoposte al campo elettrico si muovono, provocando lo scattering della luce. L'intensità della luce fluttuerà con una frequenza proporzionale alla velocità con la quale si muovono le particelle. Dalla misura di questa frequenza lo strumento calcola la velocità di movimento e, considerando il valore del campo applicato, viene calcolata la mobilità; da qui, utilizzando diverse teorie matematiche, viene calcolato il pot- ζ . Per ogni campione vengono effettuate almeno 2 misurazioni. Ogni campione è allestito in triplicato; i risultati sono ottenuti dalle media sulle tre preparazioni ed espresse come valore medio \pm la deviazione standard.

L'analisi del pot- ζ è stata condotta con l'analizzatore di particelle Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument), che utilizza come modalità di misura la tecnica, coperta da brevetto Malvern, M3-PALS (Phase Analysis Light Scattering) in combinazione all'effetto Doppler. Il campione posto in una cella per microelettroforesi, all'estremità della quale si applica un campo elettrico di valore noto. La cella viene illuminata da due raggi laser focalizzati che si intersecano. Le particelle sottoposte al campo elettrico si muoveranno provocando lo scattering della luce. L'intensità della luce fluttuerà con una frequenza proporzionale alla velocità con cui si muovono le particelle. Dalla misura di questa frequenza si calcola la velocità, usando l'equazione:

$$V = \mu_E E$$

dove:

V= velocità delle particelle,

μ_E = mobilità elettroforetica,

E= campo elettrico applicato.

Dividendo per il valore del campo elettrico applicato, il dato verrà espresso come mobilità elettroforetica:

$$V/E = \mu_E = Q(6\sigma a\eta)$$

dove:

η = viscosità del mezzo,

a= raggio della particella,

Q= carica effettiva della particella.

Per mezzi acquosi a 25°C, il programma fornito dalla Malvern Instrument correla la mobilità elettroforetica al pot- ζ secondo la seguente relazione: ogni unità di mobilità corrisponde a un pot- ζ di 12.85 mV.

Gli esperimenti sono, quindi, stati condotti a 25°C utilizzando come mezzo di dispersione acqua distillata (10 μ l di sospensione nanoparticellare in 1 ml di acqua). Come approssimazione del sistema reale a quello ideale si utilizza la teoria di Smulochwsky.

Per ogni campione sono state effettuate due misure del pot- ζ . Il risultato viene espresso come pot- ζ \pm la deviazione standard.

Analisi morfologica

L'analisi morfologica delle nanoparticelle è stata effettuata mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM XL-40 Philips). Il microscopio elettronico a scansione è un tipo di microscopio che non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni ma un fascio di elettroni. In particolare, un fascio di elettroni generato da una sorgente elettronica è accelerato e focalizzato da un sistema di lenti sul campione. Dall'interazione si originano radiazioni secondarie che sono rappresentate da elettroni secondari, raggi x, elettroni "backscattered" o retrodiffusi, catodo-luminescenza e che raccolte da opportuni detectors (rivelatore di elettroni secondari SED, rivelatore elettroni retro diffusi BSE) forniscono informazioni diverse. Gli elettroni secondari opportunamente rilevati forniscono informazioni circa la morfologia del campione. I campioni da analizzare sono stati preparati depositando una goccia di sospensione acquosa di nanoparticelle (5 mg/ml) su vetrino coprioggetti stabilmente adeso a portacampioni di alluminio (stab). Gli stab sono stati posti in essiccatore e i campioni essiccati prima dell'analisi. Una volta essiccati, i campioni sono stati sottoposti a metallizzazione (SEM Coating Unit E 500, Polaron Limited), che, attraverso la deposizione di un sottile strato di oro colloidale (10 nm) rende i campioni conduttivi e quindi analizzabili in alto vuoto.

Valutazione quali/quantitativa della coniugazione con Rituximab

Microscopia a forza atomica (AFM)

Per chiarire la morfologia e la struttura superficiale delle nanoparticelle, soprattutto quando modificate in superficie con Rituximab, le nanoparticelle sono state osservate al microscopio a forza atomica (AFM, Park Instruments, Sunnyvale, CA). L'analisi è effettuata a 20°C operando per non contatto ed utilizzando un cantiliver di silicone adatto alla modalità prescelta (high resolution noncontact "GOLDEN" Silicon Cantilevers NSG-11, NT-MDT, diametro punta=5–10 nm; Zelenograd, Moscow, Russia) con una durezza di circa 40 Nm⁻¹ e una frequenza di risonanza di circa 160 kHz. Dopo purificazione e liofilizzazione il campione è stato disperso in acqua distillata e depositato su mica (1 cm×1 cm); dopo 2 min dalla deposizione l'eccesso di acqua è stato rimosso con carta assorbente e il campione analizzato, ancora immerso in velo di liquido. Le immagini AFM sono state ottenute con una velocità di scansione di 1 Hz e processate utilizzando il software "ProScan Data Acquisition".

Spettroscopia elettronica per analisi chimiche ESCA

La spettroscopia ESCA o spettroscopia elettronica per analisi chimiche o spettroscopia elettronica per applicazioni chimiche, indicata con l'acronimo inglese ESCA (da electron spectroscopy for chemical analysis o electron spectroscopy for chemical applications), è un insieme di tecniche di spettroscopia fotoelettronica utilizzata per sondare le superfici dei materiali. La presenza di molecole di Rituximab sulla superficie delle nanoparticelle è stata dimostrata mediante spettroscopia elettronica per analisi chimica (ESCA), ed in particolare andando a detectare la presenza di atomi di azoto sulla superficie delle nanoparticelle, presente solo se vi è l'anticorpo Rituximab coniugato. L'analisi ESCA è stata eseguita con uno strumento XRC 1000 X-ray source analysis system (Spec. Nano Surface Analysis, Germania) munito di analizzatore emisferico di elettroni PHOIBOS 150 (Spec. Nano Surface Analysis, Germania), che sfrutta radiazioni $MgK\alpha_{1,2}$ ($E = 1253.6$ eV). Gli spettri sono stati registrati con modalità FAT (fixed retardation ratio) con energia di passaggio di 40 eV. La pressione nella camera di analisi del campione era ca. 10⁻⁹ mbar. I dati sono stati acquisiti ed elaborati tramite il software SpecsLab2.

Caratterizzazione delle nanoemulsioni

Utilizzando il sistema di lenti e gli obiettivi del microscopio confocale disponibile presso il Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti del nostro Ateneo, operando però in modalità a luce riflessa, sono state caratterizzate le nanoemulsioni ottenute durante lo studio formulativo di ottimizzazione delle preparazioni allestite con la tecnica dell'emulsione semplice. Tale studio ha permesso di valutare preventivamente la stabilità delle nanoemulsioni formatesi in seguito alla sonicazione con potenze e tempi differenti. A questo scopo un'aliquota di campione (nanoemulsione) è stato prelevato immediatamente a seguito della sonicazione e trasferito su un vetrino per essere osservato; questa operazione deve essere effettuata con estrema rapidità per evitare la destabilizzazione della nanoemulsione per allontanamento del solvente; tutto il processo è eseguito mantenendo il vetrino in contenitori ghiacciati.

Determinazione del PVA residuo

Siccome il PVA residuo, associato alle nanoparticelle può interferire con le caratteristiche chimico fisiche dei sistemi e con l'uptake cellulare, diviene importante saggiare la quantità di tale tensioattivo ancora presente nelle formulazioni dopo la purificazione. Il PVA residuo è determinato mediante metodo colorimetrico [Zambaux et al., 1993 e Zambaux et al., 1998] basato sulla formazione di un complesso colorato tra due gruppi ossidrilici adiacenti del PVA e una molecola di iodio di cui viene stimata

l'assorbanza per via spettrofotometrica a 690 nm. Brevemente, 10 mg di campione liofilizzato sono solubilizzati in 1 ml di DCM. Dopo aver aggiunto 4 ml di acqua distillata, il solvente organico è allontanato per agitazione a temperatura ambiente (circa 2 h). La sospensione viene filtrata con filtro di nitrato di cellulosa (per solventi) da 0,45 µm (Sartorius, Firenze, Italy) per rimuovere il polimero precipitato. La soluzione recuperata (1 ml) viene trattata con 2 ml di una soluzione 0.5 M di NaOH per 15 min a 60°C. Quindi la soluzione, riportata a temperatura ambiente, viene neutralizzata con 900 µl di una soluzione 1 N di HCL e il volume aggiustato a 5 ml (1.1 ml) con acqua distillata. A questa soluzione sono aggiunti 3 ml di una soluzione di acido bórico 0.65 M, 0.5 ml di una soluzione di I₂/KI (0.05 M/0.15M) e 1.5 ml di acqua distillata. La concentrazione di PVA è valutata per lettura spettrofotometrica a 690 nm, dopo 15 min di incubazione a temperatura ambiente. Preventivamente è stata allestita una curva di taratura partendo da concentrazioni note di PVA, nell'intervallo desiderato e nelle stesse condizioni sperimentali.

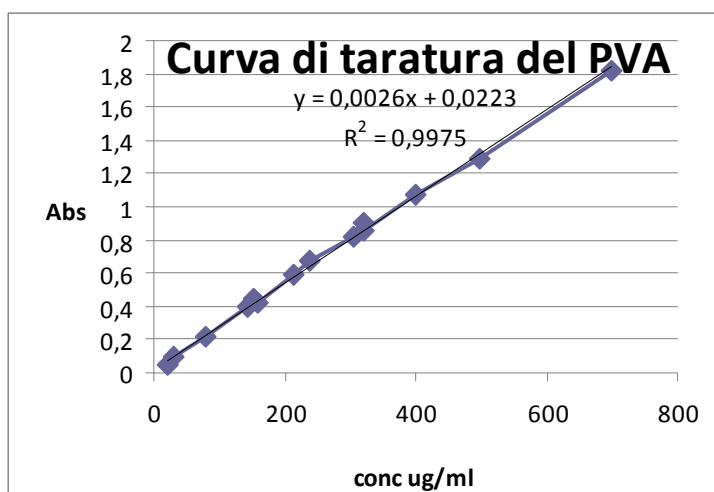


Figura 14: Curva di calibrazione del PVA.

Esperimenti in vitro ed in vivo

Diverse tecniche sono state allestite ed utilizzate per saggiare l'impiego delle nanoparticelle nell'optical imaging (esperimenti in vivo che prevedono la preparazione degli animali e il loro trattamento) e nella terapia antitumorale (esperimenti in vitro ed in vivo)

Esperimenti in vivo: optical imaging

Valutazione dei profili di eccitazione/emissione

I profili di eccitazione/emissione dei polimeri (PLGA, g7-PLGA, DY-PLGA) sono stati valutati mediante studi al microscopio confocale Confocal Microscope Leica DM IRE 2, Bannockburn, IL, USA; Leica Confocal System: scan head multiband 3 channels Leica TCS SP2 with AOBS, laser diode blu COH (405 nm/25 mW), Laser Ar (458 nm/5 mW) (476 nm/5 mW) (488 nm/20 mW) (496 nm/5 mW) (514 nm/20 mW), Laser HeNe (543 nm/1.2 mW), Laser HeNe (594 nm) (Orange), and Laser HeNe (633 nm/102 mW).

I profili di emissione sono stati valutati mediante scansione al microscopio confocale in funzione della variazione della lunghezza d'onda, dopo eccitazione a 514 e 633 nm (Ar Laser e Laser HeNe, rispettivamente) e registrando la variazione della intensità di emissione. Una quantità esatta (5 mg) del polimero (PLGA) o di uno dei coniugati polimero (g7-PLGA, DY-PLGA) è stata solubilizzata in DCM (5 ml) ed una goccia (circa 50 μ l) della soluzione organica è stata versata su un vetro coprioggetto. Dopo aver allontanato il solvente a temperatura ambiente, l'analisi confocale è stata effettuata sul residuo secco.

Le intensità di emissione dei polimeri sono state registrate sulla variazione della lunghezza d'onda, utilizzando due diversi laser di eccitazione, in almeno cinque regioni di interesse (ROI). Dopo eccitazione a 514 nm, i profili di emissione sono stati rilevati ogni 10 nm da 560 a 810 nm, mentre dopo eccitazione a 633 nm i profili di emissione sono stati valutati ogni 10 nm da 540 a 830 nm. Il profilo di eccitazione-emissione del DY-675 (DY), come dichiarato dal produttore (Dyomics GmbH) mostra un picco di massima eccitazione a 674 nm ed un picco massimo di emissione a 699 nm. Per evidenziare le possibili interferenze tra g7-PLGA e DY-PLGA, i profili di eccitazione-emissione di una miscela di g7-PLGA e DY-PLGA con lo stesso rapporto utilizzato per la preparazione delle nanoparticelle (1:1,5, w: w) (vedi Preparazione nanoparticelle" (DY-g7-PLGA)") sono stati analizzati nelle stesse condizioni sperimentali come sopra descritto.

Preparazione dei topi per gli esperimenti di optical imaging

I topi sono stati anestetizzati mediante un sistema di anestesia gassosa (Strumenti 2Biological, Besozzo, Varese, Italia), costituita da isoflurano misto a ossigeno e protossido di azoto. L'anestesia è stata applicata dopo aver introdotto il topo in una camera di pre-anestesia e successivamente collocato all'interno del eXplore Optix (Advanced Technologies Research, Montreal, Canada) con isoflurano in percentuale, rispettivamente, al 2% e all'1%. Un'immagine di controllo è stata acquisita prima del

trattamento degli animali. Successivamente, gli animali sono stati trattati con 1 ml di sospensione salina di DY-g7-NP (8 mg) tramite iniezione in vena caudale.

Esperimenti in vivo

In tutti gli esperimenti di imaging, è stato utilizzato per l'eccitazione un diodo laser pulsato con una frequenza di ripetizione di 80 MHz e una risoluzione temporale di 12 impulsi a 670 nm. L'emissione di fluorescenza è stato registrata a 700 nm e gli impulsi rilevati attraverso un fotomoltiplicatore. Sono state poi selezionate regioni di scansione di interesse (ROI) bidimensionali e la potenza del laser, il tempo di integrazione e gli step di scanning sono stati ottimizzati secondo il segnale emesso. I dati sono stati registrati come funzione dei point-spread temporali, e le immagini sono state ricostruite in intensità di fluorescenza. Prima della somministrazione del probe, i topi sono stati analizzati per ottenere immagini di background. L'intensità del segnale di background è stato registrato per ogni animale prima della somministrazione ed è stata sottratta da ogni immagine successiva all'acquisizione del segnale.

Studi in microscopia a fluorescenza

Alla fine dell'analisi (3 ore dopo la somministrazione delle sospensioni di NPs PLGA-g7-DY-675), i topi sono stati sacrificati. Successivamente, il cervello è stato sezionato in emisfero di destra, sinistra e frontale, e il cervelletto è stato isolato. Ogni tessuto congelato è stato tagliato in tutto il suo spessore tramite criotomo in slides di circa 5 μm (circa 40 vetrini per ogni cervello). I vetrini sono stati quindi fissati in MeOH assoluto e conservati a 4 C° per un periodo massimo di 24 ore, prima dell'esame al microscopio a fluorescenza. Per evidenziare le strutture cellulari, i vetrini sono stati trattati con DAPI (40-6-Diamidino-2-fenilindolo; Lab-Vision Corporation, Fremont, CA, USA), che è conosciuto per formare complessi fluorescenti con il doppio filamento del DNA [Xu et al., 1997]. Brevemente, i campioni sono stati colorati per 10 min con 50 μl di una soluzione DAPI (125 ng/ml), poi sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza (Axiophot, Zeiss, Germania Ovest, Olympus Analyzer) con eccitazione tri-band, per DAPI, FITC e TRICT e utilizzando un set di filtri per fluorescenza.

Gli studi di microscopia confocale sono stati effettuati utilizzando lo stesso strumento descritto in precedenza nella sezione "Valutazione dei profili di emissione" (microscopio confocale Leica DM IRE 2). In entrambi gli esperimenti di microscopia, gli spot rosso fluorescenti, dovuti al colorante fluorescente, sono stati considerati come indicatori significativi delle NPs PLGA-g7-DY-675.

Esperimenti in vitro: nanoparticelle veicolanti il Nutlin-3

Valutazione dell'efficienza di incapsulazione (EI) e del contenuto di Nutlin-3 nelle nanoparticelle

Il caricamento del farmaco nelle nanoparticelle è stato determinato direttamente ed utilizzando l'analisi HPLC in reverse phase (RP-HPLC) con modalità isocratica. È stato utilizzato uno strumento HPLC (JASCO Corp., Tokyo, Japan) composto da una pompa modello PU2089 munita di una valvola di iniezione con un loop da 50 µl (Model 7755-023, Rheodyne, Cotati, CA) e un detector UV/visible modello 1565 a lunghezza d'onda variabile. La separazione cromatografica è stata condotta in una colonna 10 cm x 4 mm, con diametro delle particelle di 3 µm ChromoSep C18 (Varian, Palo Alto, CA). La colonna è stata termostata a 30°C, la fase mobile è costituita da 45% K₂HPO₄, 35% acetonitrile e 20% metanolo. Il flusso impiegato è di 1 ml/min, la detection all'UV è settata a 260 nm.

Brevemente, a 5 mg di nanoparticelle liofilizzate sciolte in 1 ml di DCM sono aggiunti 5 ml di etanolo. La diffusione dell'etanolo nel DCM guida la precipitazione del polimero. La miscela ottenuta è stata filtrata con filtro 0.2 µm (Sartorius, Firenze, Italy) per rimuovere il residuo polimerico e la soluzione recuperata è stata analizzata per determinare la concentrazione del Nutlin-3 via RP-HPLC nelle condizioni precedentemente descritte. Il picco di eluizione del Nutlin-3 è quantificato previa costruzione di una curva di taratura ottenuta con concentrazioni note del farmaco nell'intervallo di interesse. Le analisi sono eseguite in triplicato. Il caricamento del farmaco è espresso come contenuto in farmaco (mg di Nutlin-3 incorporato in 100 mg di formulazione (farmaco incapsulato più polimero)) e come efficienza di incapsulazione (percentuale di farmaco stabilmente incorporato rispetto alla quantità iniziale utilizzata nella formulazione).

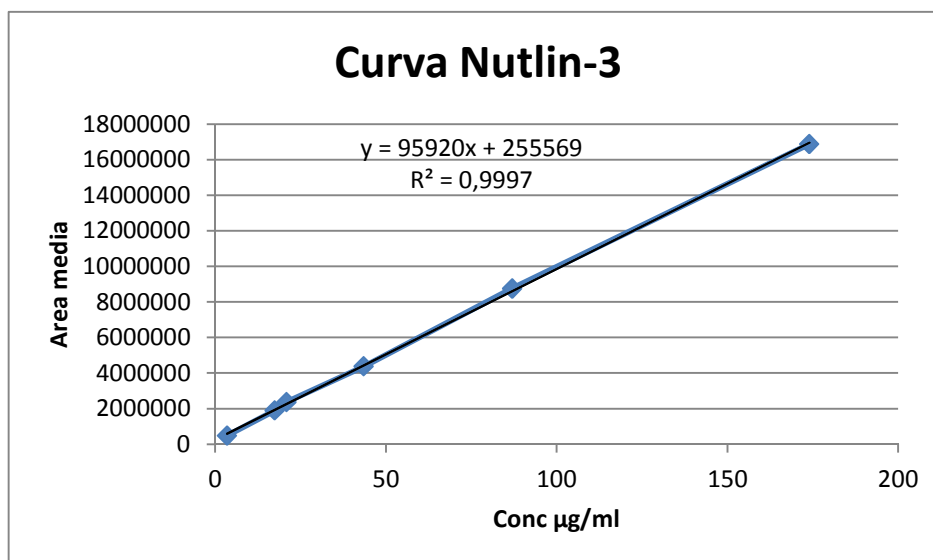


Figura 15: Curva di taratura ottenuta mediante l'HPLC Varian 9012.

Linee cellulari e analisi dell'uptake delle nanoparticelle

Le linee cellulari di leucemia umana JVM-2 e BJAB utilizzate per gli studi in vitro di valutazione dell'attività antileucemica del Nutlin-3 veicolato sono state fornite da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Breunschweig, Germany) e coltivate in RPMI-1640 (Lonza, Walkersville, MD) contenente il 10% in FBS (Gibco BRL, Gaihesburg, MD) e solo per JVM-2, glucosio 4.5 g/l, sodio piruvato 1 mM, sodio bicarbonato 1.5 g/l e HEPES 10 mM (tutti acquistati da Gibco). Per l'analisi citofluorimetrica ed in microscopia a fluorescenza, 1×10^6 cellule/ml sono state trattate con le particelle marcate con fluorocromo, con e senza farmaco (NP-R, NP-R- Nut, 0.68 mg/ml). A differenti tempi testati, le cellule sono state lavate con PBS (tre lavaggi) per eliminare le nanoparticelle che non hanno interagito con le cellule e successivamente sottoposte ad analisi (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA). Per l'analisi microscopica, le cellule trattate sono state osservate con un microscopio a fluorescenza Axiophot (Zeiss, Oberlochen, Germany).

Analisi della vitalità cellulare, dell'apoptosi e del ciclo cellulare

Tali analisi sono state condotte transfettando le cellule con il campione NP-Nut (nanoparticelle caricate con il farmaco) in comparazione a una soluzione di farmaco non incapsulato, alla stessa concentrazione presente nelle nanoparticelle. Per controllo è stata saggiata anche la preparazione NP (nanoparticelle bianche). Dopo trattamento con NP-Nut e farmaco in soluzione, la vitalità cellulare è monitorata per più di 48 ore e valutata attraverso il saggio del Trypan-blue.

In parallelo il grado di apoptosi è quantificato dopo staining con Annessina V-FITC/propidio ioduro e seguita da analisi citofluorimetrica.

ANNEXIN V/PI test: la vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il kit Annessina V/PI (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Questo approccio permette di discriminare tra cellule apoptotiche e necrotiche. Le cellule apoptotiche sono positive all'annessinaV-FITC mentre non lo sono al PI. Le cellule necrotiche sono positive sia ad annessina che PI, mentre le cellule vive sono negative sia per annessina che PI. Brevemente, le cellule sono lavate due volte, centrifugate a 1000 rpm per 10 min e risospese in 50 μ l di tampone (Annexin V Binding Buffer)(Miltenyi Biotec, Germany). Quindi 5 μ l di soluzione di fluoresceina isotiocianato-Annessina V (FITC-Annesina) è stata addizionata alla sospensione cellulare. Dopo 15 min di incubazione a temperatura ambiente al riparo della luce, le cellule sono state lavate, centrifugate e risospese nel tampone fornito dalla ditta. Infine, 10 μ l di soluzione di PI vengono addizionati alla sospensione che viene immediatamente analizzata al citofluorimetro.

Per l'analisi del profilo del ciclo cellulare, le cellule sono state incubate con bromodeossiuridina (50 μ M) (BrdU, Sigma Aldrich) a 37°C per 1 ora, quindi trattate con l'anticorpo anti-BrdU (BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) e il complesso visualizzato per reazione con anticorpo secondario coniugato con FITC (Beckman Coulter, Marsiglia, Francia). Dopo un successivo trattamento con 50 mg/ml di propidio ioduro, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro.

Analisi statistica

I risultati sugli studi in vitro sono ottenuti da tre differenti ripetuti esperimenti e riportati come valore medio \pm la relativa deviazione standard e analizzati per la significatività statistica con i tests del t-Student e il Wilcoxon-Mann-Whitney della somma dei ranghi. Le differenze sono considerate significative quando $p < 0.05$.

RISULTATI
E
DISCUSSIONE

Sezione 1: Applicazione delle nanoparticelle; visualizzazione in vivo di nanosistemi impiegati in diagnostica e nel rilascio di farmaci al sistema nervoso centrale

Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle PLGA-g7-DY-675

L'allestimento delle nanoparticelle è avvenuto mediante la tecnica della nanoprecipitazione [Fessi et al., 1989].

Si sono quindi allestiti diversi lotti di nanoparticelle, caratterizzati da dimensioni omogenee (circa 200 nm), carica superficiale blandamente negativa (-20/25 mV) e con indici di polidispersione minori di 0.04, ad indicare una distribuzione dimensionale omogenea.

Questi risultati indicano chiaramente che la modifica superficiale delle nanoparticelle con il peptide direzionante (g7) e con il DY-675 non altera l'integrità e le caratteristiche superficiali della nanoparticelle, in confronto con altre nanoparticelle non modificate, preparate in precedenza nel nostro laboratorio, caratterizzate da dimensioni, PDI e carica superficiale paragonabili.

Dimensioni e carica superficiale

In particolare, la caratterizzazione dimensionale si è avvalsa della tecnica del light scattering ed è stata eseguita ad ogni step di modifica delle nanoparticelle.

Il diametro medio e l'indice di polidispersione è stato ottenuto analizzando un'aliquota di 10 µl di sospensione di nanoparticelle PLGA-g7-DY-675 diluita a 1 ml con acqua distillata.

La carica superficiale, espressa come $\text{pot-}\zeta$, è stato valutata su nanoparticelle in sospensione in un fluido simil-fisiologico composto da NaCl 128 mM, NaH_2PO_4 2.4 mM, NaHCO_3 29.0 mM, KCl 4.2 mM, CaCl_2 1.5 mM 165 mg, MgCl_2 0.9 mM e D-glucosio 9 mM, impiegato generalmente negli studi in vivo al fine di ottenere una soluzione acquosa isotonica e isomolare a $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$.

Lo strumento impiegato Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) è stato impiegato con laser 4 mW He-Ne, 633 nm, Laser attenuator Automatic, trasmissione da 100 a 0.0003%, Detector Avalanche photodiode, Q.E > 50% a 633 nm e temperatura settata a 25°C. I risultati ottenuti sono stati normalizzati rispetto a una soluzione standard di polistirene.

	Z-Average nm (\pm S.D.)	PDI (\pm S.D.)	Peak 1 nm (\pm S.D.)	pot- ζ mV(\pm S.D.)
NP	153 \pm 15	0.07 \pm 0.01	165 \pm 18	-19 \pm 1.1
NP-g7	176 \pm 16	0.06 \pm 0.02	190 \pm 16	-6 \pm 1
Np-g7-DY-675	186 \pm 17	0.04 \pm 0.02	193 \pm 16	-21 \pm 1

Tabella 5: Analisi dimensionale e di carica superficiale delle diverse formulazioni prima della purificazione.

I campioni sono stati analizzati prima e dopo la purificazione ottenuta per centrifugazione.

In particolare, come viene mostrato nella **Tabella 5**, tutte le preparazioni presentano, prima della purificazione, diametri medi prossimi ai 200 nm e quindi compatibili con la somministrazione parenterale.

Le popolazioni nanoparticellari risultano particolarmente omogenee con valori di PDI inferiori a 0,1 confermando la natura monomodale e monodispersa delle preparazioni, un'ulteriore riprova inoltre viene fornita dai valori di analisi distributiva (Peak 1) che risultano coincidere con quelli di diametro medio, sottolineando la riproducibilità della tecnica formulativa.

Per quanto riguarda la carica superficiale delle nanoparticelle (pot- ζ), i valori registrati risultano negativi, in accordo con la presenza di gruppi carbossilici del PLGA esposti sulla superficie delle nanoparticelle.

La modifica con g7 e con DY-675, rispetto a nanoparticelle non modificate, non incide significativamente sulle dimensioni medie delle nanoparticelle (Δ di +23 nm e di +33 nm, rispettivamente), mentre blandamente sulla carica superficiale (Δ di +13 e -2 mV, rispettivamente) a conferma della presenza di molecole coniugate in superficie.

A seguito della purificazione, le nanoparticelle presentano valori di diametro medio prossimi a quelli ottenuti in precedenza anche se in alcuni casi si registrano fenomeni di aggregazione, soprattutto nelle preparazione maggiormente derivatizzate, come viene sottolineato dall'aumento dei valori di PDI che mostrano popolazioni particellari più eterogenee delle precedenti ma comunque accettabili per la somministrazione in vivo.

Il pot- ζ risulta invece significativamente meno negativo dei valori acquisiti prima della centrifuga. Soprattutto in confronto con nanoparticelle non modificate, questo dato può essere spiegato supponendo la presenza di tensioattivo, anche se in minime tracce, stabilmente adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle e che maschera le cariche negative dei gruppi funzionali carbossilici residui del PLGA.

	Z-Average nm (\pm S.D.)	PDI (\pm S.D.)	Peak 1 nm (\pm S.D.)	pot- ζ mV (\pm S.D.)
NP	188 \pm 31	0.28 \pm 0.05	175 \pm 28	-30 \pm 2
NP-g7	207 \pm 28	0.22 \pm 0.02	205 \pm 20	-5 \pm 1
Np-g7-DY-675	186 \pm 11	0.04 \pm 0.01	306 \pm 10	-5 \pm 1

Tabella 6: Analisi dimensionale e di carica superficiale delle preparazioni purificate.

Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione morfologica è avvenuta mediante l'impiego della microscopia elettronica a scansione SEM utilizzando un microscopio XL-40 Philips, Eindhoven, Netherlands, che ha confermato la formazione di nanoparticelle di forma sferica e superficie abbastanza regolare.

Come è evidente dalle immagini al SEM (**Figura 16 e 17**) In confronto alle nanoparticelle non modificate, le NPs-g7-DY675 non mostrano differenze significative in termini di aspetto della superficie, forma, aggregazione, né fenomeni di fusione, mancata o parziale formazione.

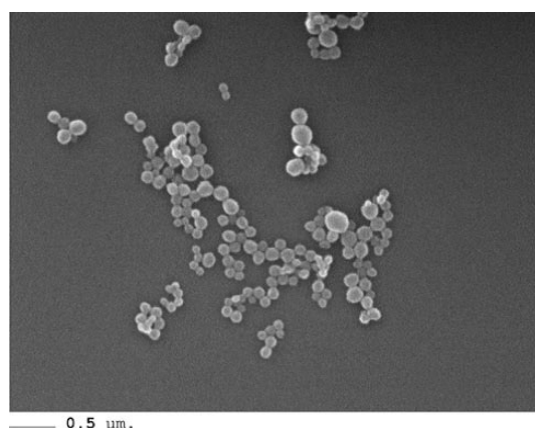


Figura 16: Immagine al SEM di nanoparticelle PLGA-g7-DY-675.

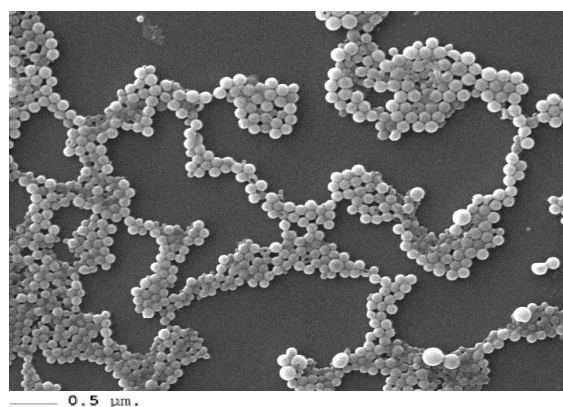


Figura 17: Immagine al SEM di nanoparticelle PLGA.

Profili di eccitazione ed emissione dei Polimeri

Tutti i polimeri utilizzati nella preparazione delle nanoparticelle utilizzate per gli studi in Optical Imaging sono stati caratterizzati acquisendo profili di eccitazione ed emissione dei singoli polimeri o dei polimeri in miscela.

Utilizzando le procedure esposte nella sezione dei Materiali e Metodi, le analisi hanno portato alla definizione di profili di emissione/eccitazione del PLGA, g7-PLGA e PLGA-DY675.

In particolare, dopo eccitazione a 514 nm, il PLGA e il g7-PLGA mostrano lo stesso profilo di emissione ed in particolare un picco singolo di emissione vicino a 580 nm (**Figura 18 A**). L'emissione del PLGA-DY675 è caratterizzata da due differenti picchi: un picco di emissione più debole a 580 nm e un picco di intensità molto maggiore a 700 nm (**Figura 18 B**). Il profilo di emissione della miscela di g7-PLGA e PLGA-DY675 in rapporto 1:1.5 (lo stesso utilizzato nella preparazione delle nanoparticelle) risulta completamente sovrapponibile a quello del PLGA-DY675, a dimostrazione della mancanza di una interferenza fluorimetrica tra i coniugati. Ovviamente l'intensità del picco di emissione è minore, in funzione della minor concentrazione del PLGA-DY675 nella miscela.

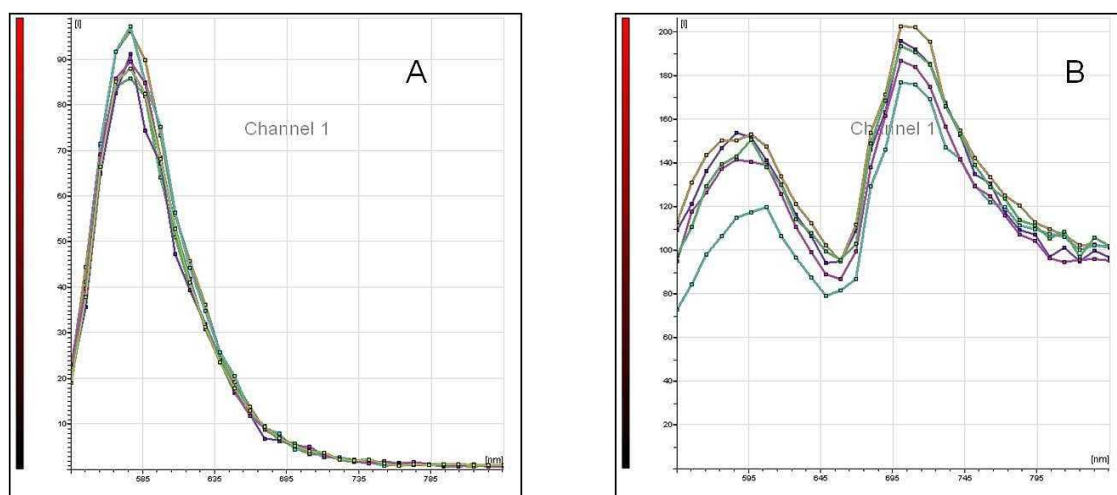


Figura 18 (A e B): Profili di emissione del PLGA, g7-PLGA (**A**) e PLGA-DY675, miscela del g7-PLGA e PLGA-DY675 in rapporti 1:1.5 (**B**) dopo eccitazione a 514 nm. Lo spettro è stato registrato ogni 10 nm. L'intensità di emissione del picco è rappresentata nella scala a barra rossa a sinistra dell'immagine (asse Y). Ogni singola banda corrisponde all'intensità della singola regione di interesse scelta e rappresenta l'intensità dell'emissione al variare della lunghezza d'onda (asse X).

Al contrario, l'eccitazione a 633 nm del PLGA e del g7-PLGA non ha prodotto alcun tipo di spettro di emissione in un range analizzato tra 660 nm e 820 nm (**Figura 19 A**). A questa lunghezza d'onda, solamente il PLGA-DY675 mostra un intenso picco di emissione a 700 nm (**Figura 19 B**). La presenza di

un unico picco di emissione è stata registrata anche per la miscela di polimeri (g7-PLGA e PLGA-DY675, rapporto 1:1.5).

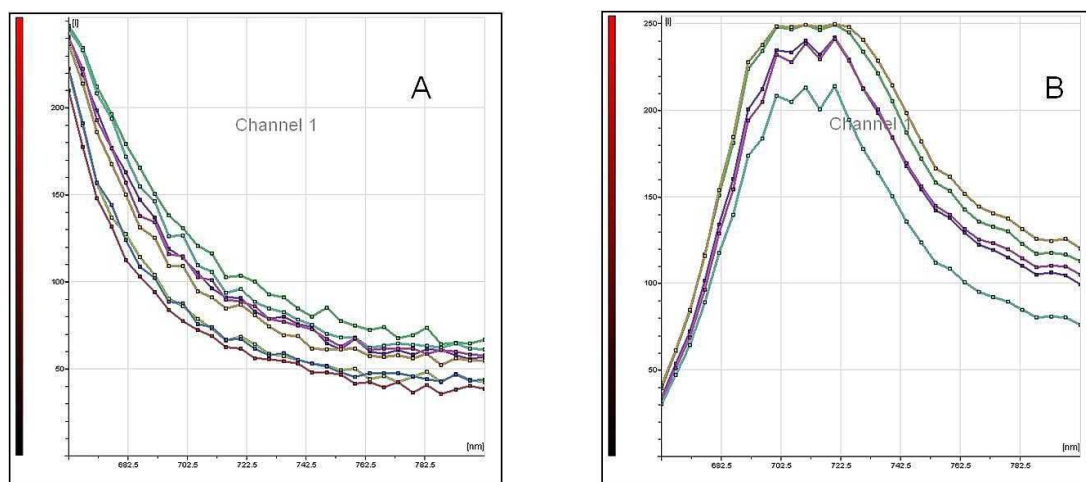


Figura 19 (A e B): Profili di emissione del PLGA, g7-PLGA (A) e PLGA-DY675, miscela del g7-PLGA e PLGA-DY675 in rapporti 1:1.5 (B) dopo eccitazione a 633 nm. Lo spettro è stato registrato ogni 5 nm. L'intensità di emissione del picco è rappresentata nella scala a barra rossa a sinistra dell'immagine (asse Y). Ogni singola banda corrisponde all'intensità della singola regione di interesse scelta e rappresenta l'intensità dell'emissione al variare della lunghezza d'onda (asse X).

Questi risultati indicano chiaramente che il PLGA-DY-675 può essere facilmente visualizzato in vivo tramite tecniche come optical imaging o microscopie a fluorescenza o confocali. I profili di eccitazione ed emissione mostrano infatti un intenso e ben identificabile picco a 700 nm (dopo eccitazione a 514 e 633 nm) che può essere attribuito al probe (DY-675) stabilmente e covalentemente coniugato con il polimero. Inoltre, è interessante notare, come la miscela dei polimeri, in termini di intensità e presenza di picchi di emissione, non crei alcuna interferenza di segnali, permettendo quindi di evitare ogni possibile falso positivo.

Somministrazione in vivo e studi di imaging

Per la somministrazione *in vivo* sono stati impiegati topi di sesso femminile del tipo Balb/c di 20 g l'uno e di età di 6 settimane (Harlan Laboratories San Pietro al Natisone, Udine, Italy) mantenuti con diete a bassa fluorescenza e in assenza di contaminanti patogeni.

Prima della somministrazione delle nanoparticelle, gli animali sono stati anestetizzati con una miscela a base di isoflurano, ossigeno e protossido di azoto, procedura eseguita in una camera di pre-anestesia.

Successivamente i topi sono stati rasati a livello addominale per evitare i fenomeni di *scattering* della luce dovuti alla presenza di peluria e sono stati posti nell'apposito alloggiamento dell'eXplore Optix (Advanced Research Technologies, Montreal, Canada) con una percentuale di isoflurano del 2%.

Prima della somministrazione, è stata acquisita, per ogni topo, un'immagine *total body prescan*, la cui intensità è stata impiegata come bianco per le immagini acquisite dopo l'iniezione.

Le nanoparticelle PLGA-g7-DY-675 sono state quindi risospese in soluzione salina somministrate ai topi tramite somministrazione in vena caudale.

Le immagini sono state acquisite impiegando per l'eccitazione un laser diodo a 670 nm e frequenza di ripetizione di 80 MHz, registrando l'emissione di fluorescenza a 700nm mediante un fotomoltiplicatore e un sistema di misurazione dei fotoni correlato al tempo.

In particolare, l'attenzione si è concentrata su due regioni di interesse, quella addominale e quella cerebrale, ricostruendo le immagini come intensità di fluorescenza contro emivita di fluorescenza.

La biodistribuzione delle nanoparticelle PLGA-g7-DY-675 è stata definita, acquisendo immagini a tempi definiti, ed in particolare immediatamente dopo l'iniezione, a un'ora e a due ore dopo la somministrazione.

Le immagini mostrano la tipica distribuzione delle nanoparticelle nel torrente circolatorio, con una particolare localizzazione, dopo pochi minuti dall'iniezione, a livello degli organi particolarmente irrorati quali polmoni e reni (**Figura 20**, t=0).

A tempi maggiori, (**Figura 20**, t=1-2) si osserva un'interessante localizzazione delle nanoparticelle a livello della regione addominale a dimostrazione della tendenza all'accumulo, tipica di sistemi nanoparticellari non stabilizzati, in organi del sistema Reticolo Endoteliale (RES), in particolare, a livello epatico e splenico, visibile in **Figura 20**, t=2h. Bisogna infatti ricordare che questa tipologia di nanoparticelle non è stabilizzata né resa stealth (tramite Pegilazione); di conseguenza la naturale tendenza ad essere riconosciute come non-self da parte degli organi del RES porta ad un accumulo delle nanoparticelle in questi compartimenti e ad una conseguente diminuzione della capacità di targeting in termini quantitativi.

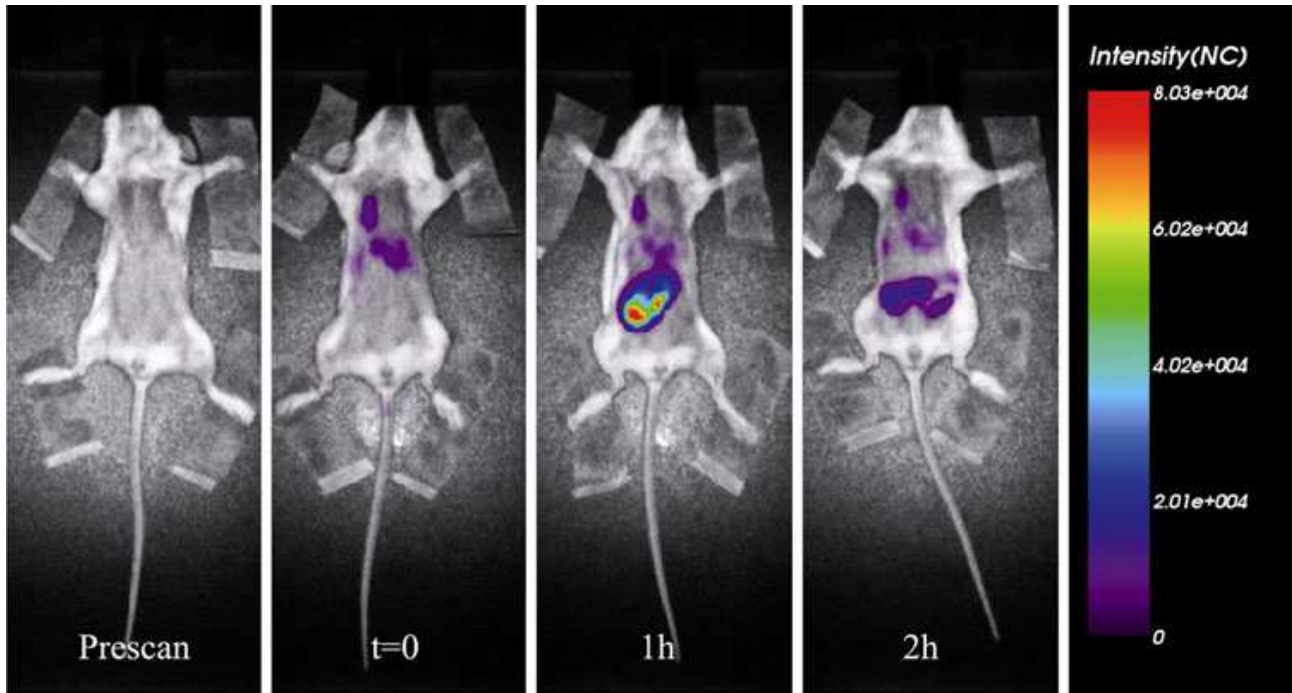


Figura 20: Biodistribuzione delle nanoparticelle NPs PLGA-g7-DY-675 total body esclusa la regione cerebrale. Le immagini sono state normalizzate al prescan, si nota ad 1 ora la spiccata intensità di fluorescenza a livello addominale.

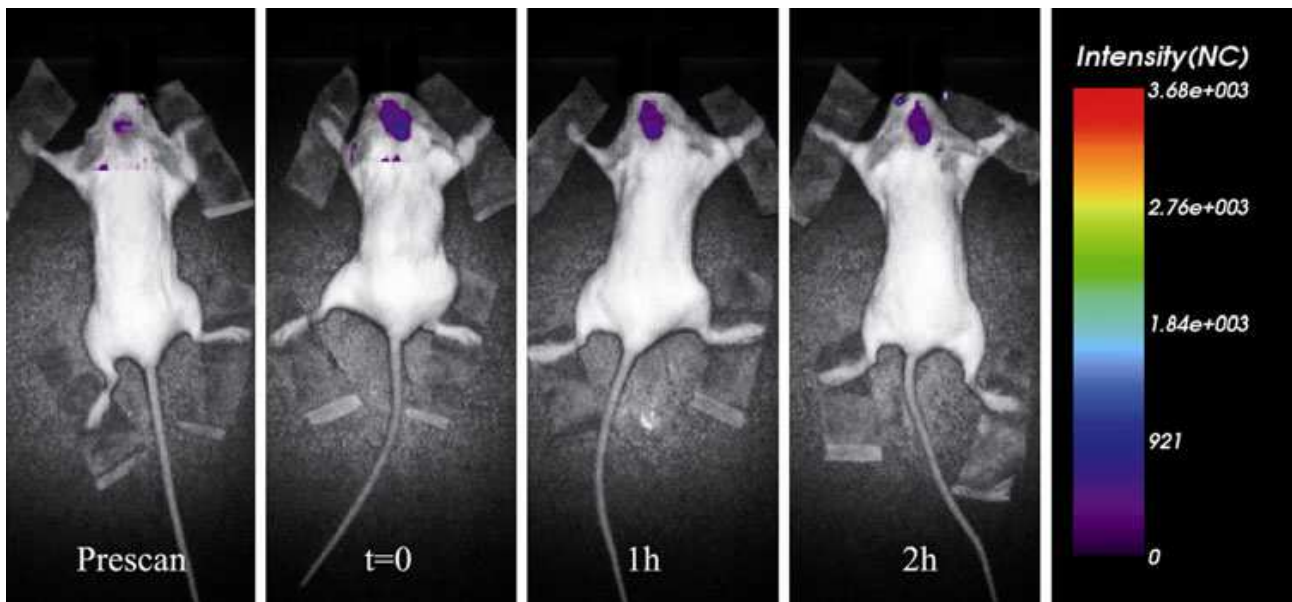


Figura 21: Biodistribuzione delle nanoparticelle NPs PLGA-g7-DY-675 a livello cerebrale. Le immagini sono state normalizzate al prescan, si nota la costante intensità di fluorescenza nella regione in esame immediatamente dopo la somministrazione fino a 2 ore dalla somministrazione.

Il dato sicuramente più significativo di questo studio deriva dall'analisi della zona cerebrale, visibile in **Figura 21**. Come chiaramente mostrato dalle immagini, una importante localizzazione delle Nps PLGA-g7-DY-675 a livello cerebrale è evidente a tempi brevissimi, già dopo alcuni minuti dopo la somministrazione (**Figura 21**, t=0) fino a tempi di circa due ore dopo la somministrazione (**Figura 21**, t=2h). Questa localizzazione a livello del SNC conferma una serie di studi ottenuti in precedenza [Vergoni et al., 2009; Tosi et al., 2010; Tosi et al., 2007; Tosi et al., 2011] in cui si è chiaramente dimostrata la capacità delle nanoparticelle modificate con il peptide g7, di attraversare la BEE.

Questo studio permette un avanzamento della ricerca, in quanto, utilizzando un polimero modificato con DY675, probe visibile in Optical Imaging, dà la possibilità di seguire e tracciare non solo la biodistribuzione “live” delle nanoparticelle, evidenziando eventuali siti di accumulo e di deposito, ma anche un Brain-Live Imaging, ovvero una visualizzazione “live” della capacità di targeting cerebrale.

Questa tecnica, che quindi mostra vantaggi nell'analisi “live” della capacità di targeting al SNC, non permette però una visualizzazione in dettaglio (ovvero a livello microscopico) della localizzazione delle nanoparticelle nei tessuti.

Di conseguenza, col fine di ottenere una completa analisi (live e microscopica) degli esperimenti, come esposto nel capitolo seguente, è necessario accoppiare una tecnica di microscopia a fluorescenza o confocale, effettuata su tessuti fissati e non, dopo sacrificio degli animali e estrazione e trattamento degli organi di interesse.

Studi di microscopia confocale e a fluorescenza

Gli studi sono stati effettuati sugli organi cerebrali prelevati dai topi Bulb/c impiegati per le analisi di optical imaging a 3 ore dalla somministrazione dei nanosistemi.

La microscopia a fluorescenza mostra le nanoparticelle vicine alle strutture nucleari nelle cellule del parenchima cerebrale. Questo dato viene confermato dalle analisi al microscopio confocali che mostrano la presenza delle NPs PLGA-g7-DY-675, evidenziate da spot di colore rosso all'interno delle cellule cerebrali, mentre si può osservare la tipica colorazione blu del DAPI impiegato per marcare i nuclei cellulari.

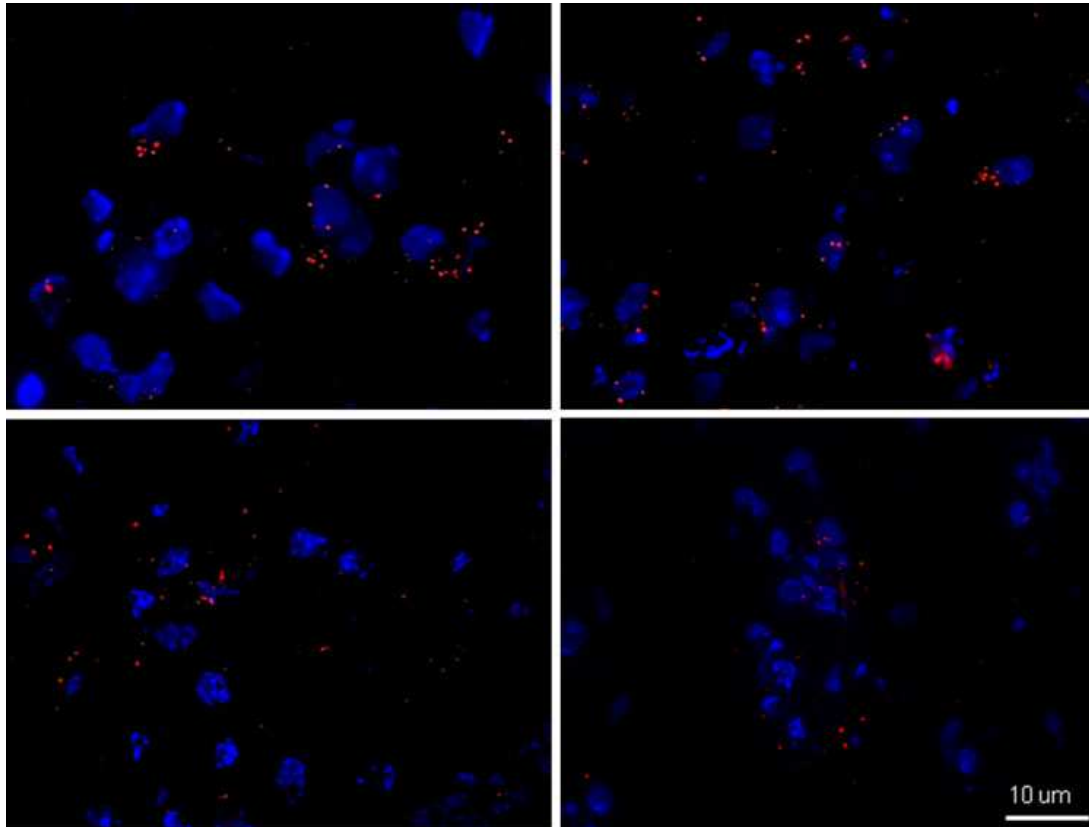


Figura 22: Immagini delle regioni cerebrali dei topi osservate mediante il microscopio a fluorescenza dopo 3 ore dalla somministrazione delle Np-g7-DY-675. Gli spot blu sono ascrivibili al DAPI colorante impiegato per marcare i nuclei cerebrali, mentre gli spot rossi sono derivanti dalla presenza del fluorocromo DY-675 coniugato sulla superficie nanoparticellare.

In **Figura 22**, le immagini al microscopio a fluorescenza indicano chiaramente la localizzazione delle nanoparticelle all'interno del parenchima cerebrale e non all'interno di vasi, quindi incluse nel SNC.

Oltre a confermare questi dati, la microscopia confocale ha permesso un'analisi ancora più accurata riguardo alla localizzazione all'interno del parenchima, come evidenziato in **Figura 23**. L'analisi lungo il piano z (quindi nello spazio del campione) permette infatti di considerare in tutta la sua tridimensionalità il campione, evitando di incorrere in falsi positivi e analizzando con accuratezza la posizione delle nanoparticelle rispetto ai nuclei cerebrali o ad altre strutture cerebrali.

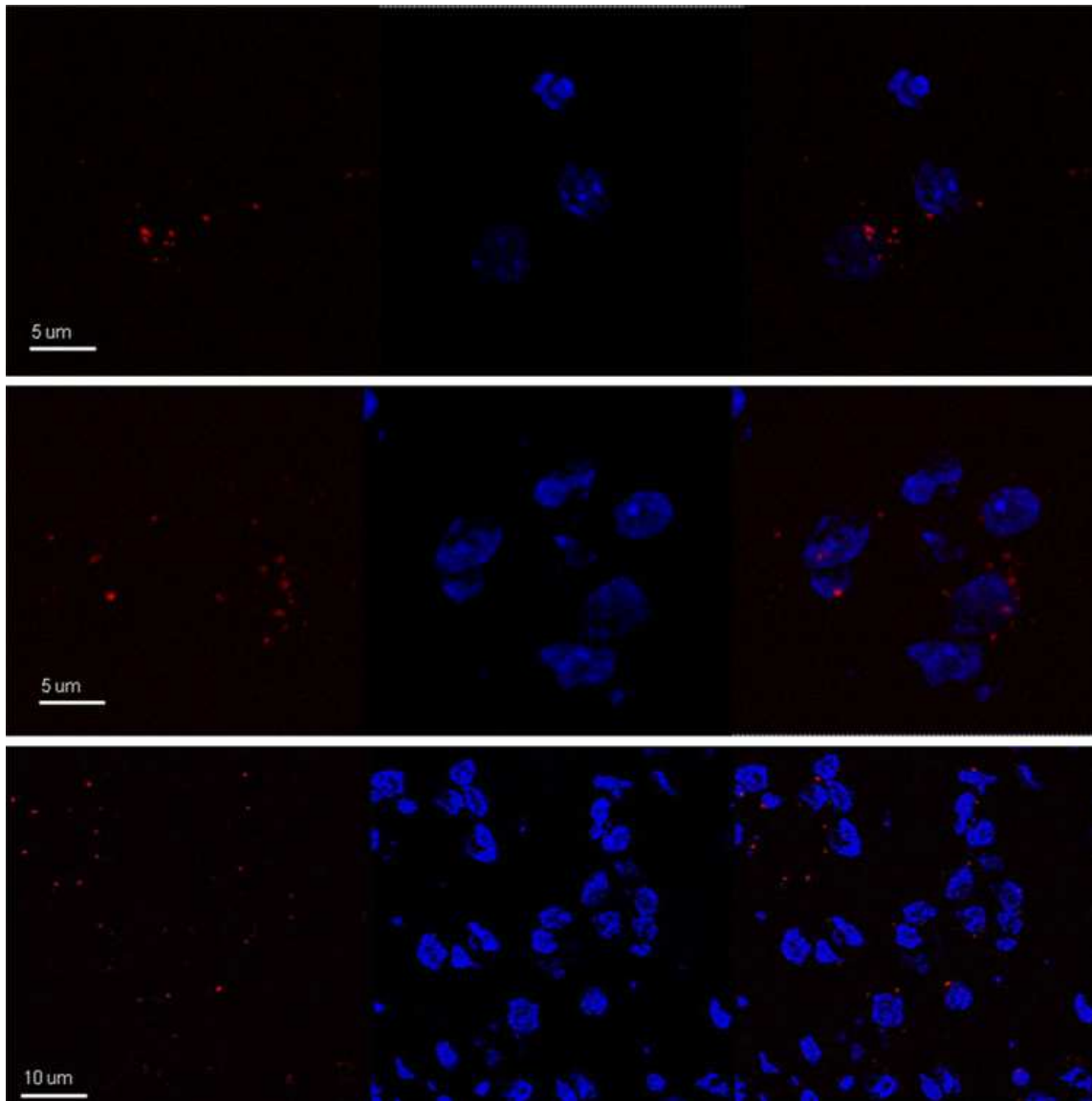


Figura 23: Immagini delle regioni cerebrali dei topi osservate mediante il microscopio confocale dopo 3 ore dalla somministrazione delle nanoparticelle PLGA-g7-DY-675. Gli spot blu sono ascrivibili al DAPI colorante impiegato per marcare i nuclei cerebrali, mentre gli spot rossi sono derivanti dalla presenza del fluorocromo DY-675 coniugato sulla superficie nano particellare. In ogni sequenza sono rappresentate partendo da sinistra: le nanoparticelle PLGA-g7-DY-675, i nuclei del parenchima cerebrale e la sovrapposizione di entrambe le immagini che sottolinea la presenza dei nanosistemi nella regione cerebrale.

Sezione 2: Applicazione delle nanoparticelle nella veicolazione e nel direzionamento di farmaci antitumorali

Studi preliminari di ottimizzazione dei parametri formulativi:

nanoparticelle ottenute per emulsione semplice

Per individuare le condizioni formulative ottimali all'allestimento di formulazioni nanoparticellari stabili e con caratteristiche chimico-fisiche idonee alla modificazione superficiale ed alla somministrazione, è stato allestito uno studio tecnologico volto ad indagare alcune variabili preparative. Considerando le caratteristiche chimico-fisiche del farmaco antitumorale oggetto dello studio, il Nutlin-3, e soprattutto la sua scarsa solubilità in acqua e nei tamponi acquosi e la buona solubilità in DCM, si è focalizzata l'attenzione sulla tecnica della emulsione semplice; infatti tale tecnica è facilmente allestibile in laboratorio, ben applicabile per polimeri come i poliesteri (come appunto PLA e PLGA), scalabile, e soprattutto ottimizzabile agendo su più variabili, sia legate al polimero che alla formulazione. Partendo da questi presupposti sono state allestite nanoparticelle di PLGA variando potenze e tempi di sonicazione, così da valutare l'incidenza sulle dimensioni, sulla stabilità della sospensione, sulla omogeneità. Anche il tensioattivo da utilizzare nella formulazione riveste particolare importanza, così come il rapporto polimero/tensioattivo e i volumi tra fase interna e fase esterna. Nei nostri studi è stato utilizzato il PVA, soluzione all'1%, mantenendo costante il rapporto PLGA/PVA (50mg/60mg) e anche quello tra i volumi, fase interna/fase esterna (rapporto 1/6).

Le preparazioni allestite sono le seguenti:

SAMPLES	OUTPUT OF SONICATION (W)	TIME OF SONICATION (second)
A	100	30
B	70	60
C	55	60
D	55	120
E	55	30
F	40	60

Le preparazioni sono state caratterizzate in due diversi momenti formulativi. Inizialmente sono state valutate le nanoemulsioni che indirizzano sulla stabilità del preparato, subito dopo la sonicazione; l'analisi è stata effettuata mediante l'ausilio della PCS (photon correlation spectroscopy) acquisendo i parametri di diametro medio (Z-Average), di indice di polidispersione (PDI) di potenziale zeta ($\text{pot-}\zeta$) e mediante il microscopio confocale utilizzato in modalità luce riflessa.

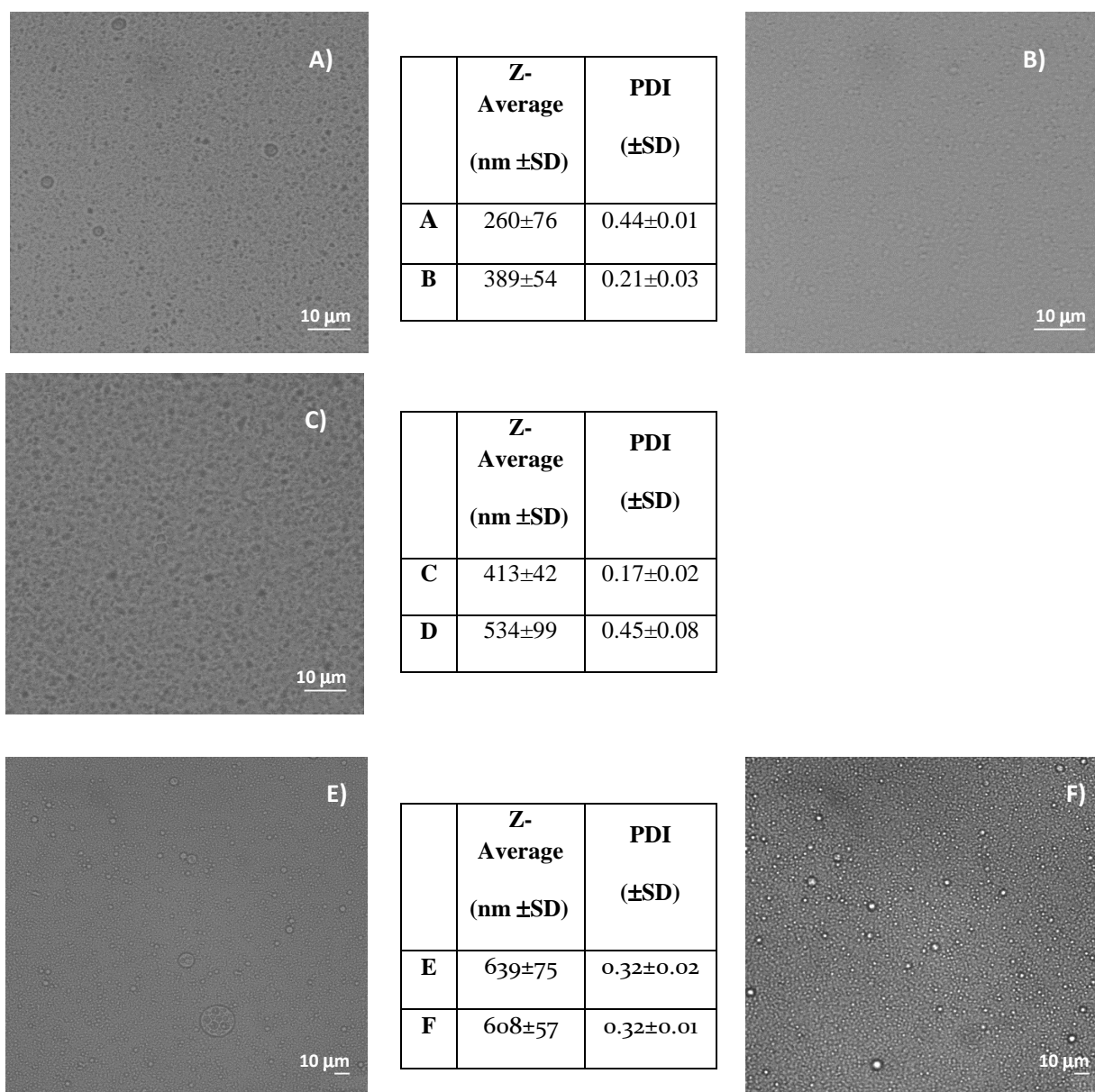


Figura 24: Studio delle nanoemulsioni.

Al microscopio confocale a luce riflessa la nanoemulsione ottenuta con sonicazione a 100 Watt è caratterizzata da goccioline disperse con diametro medio di circa 260 nm ma indice di polidispersione abbastanza elevato, segno di eterogeneità, presumibilmente causata dalle drastiche condizioni energetiche

che inducono anche un notevole e poco controllabile surriscaldamento del preparato. Diminuendo le potenze di sonicazione, come nelle preparazioni B e C, aumentano i diametri medi ma le nanoemulsioni risultano omogenee, monodisperse e stabili. Se diminuiamo la potenza di sonicazione sotto 50 Watt come nella preparazione F (40 Watt per 1 min), la nanoemulsione, pur abbastanza omogenea, mostra goccioline con dimensioni che divengono via via maggiori. Stesso comportamento lo si osserva quando si abbassa il tempo di sonicazione a 30 sec mantenendo costante la potenza a 55 Watt (campione E), apparentemente la condizione di potenza idonea alle nostre esigenze. Aumentando i tempi di sonicazione a 2 min invece si assiste ad un notevole incremento della dispersività del preparato (campione D) (**Figura 24**).

Le nanoparticelle, ottenute per evaporazione del solvente dalle nanoemulsioni appena testate e mantenute in agitazione elettromagnetica, sono state purificate per ultracentrifugazione variando i parametri del processo; in particolare sono state testate diverse velocità e tempi di centrifugazione, applicandole al preparato C, quale ipotetico preparato “lead”, per le indicazioni fornite dalle nanoemulsioni. Dopo la centrifugazione, il “pellet nanoparticellare” è stato risospeso e sottoposto ad analisi PCS per valutare la sospendibilità e il mantenimento delle caratteristiche dei preparati, nonché è stato valutato il contenuto di PVA residuo, ovvero di PVA rimasto nella formulazione dopo purificazione rispetto al PVA pesato.

	Z-Average nm (\pm S.D.)	PDI (\pm S.D.)	D(i)10 nm (\pm S.D.)	D(i)50 nm (\pm S.D.)	D(i)90 nm (\pm S.D.)	pot- ζ mV (\pm S.D.)	% PVA residuo (\pm S.D.)	Resa % (\pm S.D.)
Pre-centrifuga	190 \pm 21	0.09 \pm 0.02	131 \pm 8	198 \pm 12	307 \pm 12	-0.2 \pm 0.01		
13500 RPM 10 min	189 \pm 51	0.22 \pm 0.02	121 \pm 43	223 \pm 52	300 \pm 32	-0.4 \pm 0.02	17.3 \pm 2	51 \pm 6
15000 RPM 10 min	195 \pm 24	0.04 \pm 0.01	145 \pm 10	199 \pm 9	279 \pm 12	-0.6 \pm 0.2	10.5 \pm 1.1	78 \pm 4
17500 RPM 10 min	195 \pm 26	0.1 \pm 0.01	132 \pm 13	203 \pm 15	261 \pm 23	-3.8 \pm 1.1	10.1 \pm 0.2	75 \pm 3
22000 RPM 10 min	187 \pm 63	0.31 \pm 0.03	123 \pm 44	226 \pm 52	356 \pm 38	-2.2 \pm 0.2	6.8 \pm 0.3	79 \pm 3

Tabella 7: Analisi PCS, PVA residuo (%) e Resa della preparazione C purificata per ultracentrifugazione impiegando velocità diverse (13000, 15000, 17500, 22000 RPM) per 10 min a 4°C.

Il diametro medio, così come la dispersività dei nostri sistemi ri-sospesi non discosta dai valori osservati prima della purificazione/centrifugazione, per velocità comprese tra 13500 e 17500 rpm (**Tabella 7**). Nei preparati purificati a 15000 e 17500 rpm è presente una discreta quantità di PVA residuo che si attesta su valori prossimi al 10%; se è vero che tali condizioni operative non permettono

l'allontanamento completo degli additivi di preparazione e quindi la purificazione efficace, è altresì indubbio che la presenza di PVA facilita la ri-sospensione dei preparati e ne garantisce la stabilità, impedendone l'aggregazione, nonostante il potenziale superficiale prossimo alla neutralità. Anzi, il valore di $\text{pot-}\zeta$ solo leggermente negativo, è proprio ascrivibile al PVA adsorbito (o addirittura mescolato a formare la matrice polimerica) che maschera i gruppi carbossilici liberi del PLGA. La resa si mantiene intorno al 80% circa (**Tabella 7**).

Aumentando la velocità di centrifugazione si ha un notevole miglioramento nella purificazione dei sistemi ma diviene sempre più difficoltosa la ri-sospensione del pellet, come indica l'incremento del PDI nella formulazione purificata a 22000 rpm; questo dato conferma l'importanza del PVA nella ri-sospensione, specie quando le velocità di centrifugazione portano alla formazione di un pellet più compatto. Infatti, anche se le caratteristiche medie vengono mantenute, accanto a particelle ben riospese, permangono aggregati, difficilmente separabili (**Tabella 7**).

Se applichiamo una velocità di centrifugazione inferiore a 15000 rpm, invece, la capacità di purificazione decresce esponenzialmente (PVA residuo prossimo al 18%), così come la resa, ovvero la quantità di nanoparticelle recuperate e liofilizzate, che si attesta su valori prossimi al 50% (**Tabella 7**).

Sulla base dei risultati ottenuti, tutte le preparazioni precedentemente allestite (A, B, C, D, E, F) sono state purificate sottoponendo a centrifugazione a 15000 rpm per 10 min; in **Tabella 8** sono riportati i dati PCS prima e dopo purificazione ed il valore di PVA residuo.

		Z-Average nm (\pm S.D.)	PDI (\pm S.D.)	D(i)10 nm (\pm S.D.)	D(i)50 nm (\pm S.D.)	D(i)90 nm (\pm S.D.)	pot- ζ mV (\pm S.D.)	% PVA residuo (\pm S.D.)	resa % (\pm S.D.)
A	Pre cent	148 \pm 12	0.05 \pm 0.01	107 \pm 11	153 \pm 10	222 \pm 12	-0.2 \pm 0.01		
	Post cent	159 \pm 19	0.1 \pm 0.02	108 \pm 13	164 \pm 15	252 \pm 8	-0.1 \pm 0.01	11.1 \pm 1	60 \pm 4
B	Pre cent	170 \pm 17	0.06 \pm 0.03	126 \pm 14	176 \pm 17	267 \pm 27	-6.1 \pm 4.5		
	Post cent	172 \pm 20	0.15 \pm 0.09	105 \pm 27	139 \pm 18	291 \pm 25	-3.4 \pm 1.3	10.5 \pm 0.4	64 \pm 2
C	Pre cent	190 \pm 21	0.09 \pm 0.02	131 \pm 8	198 \pm 12	307 \pm 12	-0.2 \pm 0.01		
	Post cent	195 \pm 24	0.09 \pm 0.01	145 \pm 10	199 \pm 9	279 \pm 12	-0.6 \pm 0.2	10.5 \pm 1.1	78 \pm 4
D	Pre centr	182 \pm 21	0.08 \pm 0.01	125 \pm 15	189 \pm 16	291 \pm 12	-0.9 \pm 0.5		
	Post cent	184 \pm 12	0.04 \pm 0.04	135 \pm 14	189 \pm 16	270 \pm 21	-0.4 \pm 0.1	9.4 \pm 0.4	81 \pm 2
E	Pre cent	268 \pm 27	0.26 \pm 0.07	149 \pm 21	245 \pm 47	393 \pm 93	-14.1 \pm 2.1		
	Post cent	245 \pm 21	0.23 \pm 0.02	167 \pm 11	228 \pm 12	316 \pm 42	-11 \pm 6	9.1 \pm 1	74 \pm 4
F	Pre cent	329 \pm 7	0.33 \pm 0.03	153 \pm 19	243 \pm 21	390 \pm 72	-5.6 \pm 0.9		
	Post cent	348 \pm 14	0.43 \pm 0.01	169 \pm 31	232 \pm 37	406 \pm 62	-8.9 \pm 2.2	8.7 \pm 1.2	75 \pm 5

Tabella 8: Studio dei campioni pre e post centrifuga.

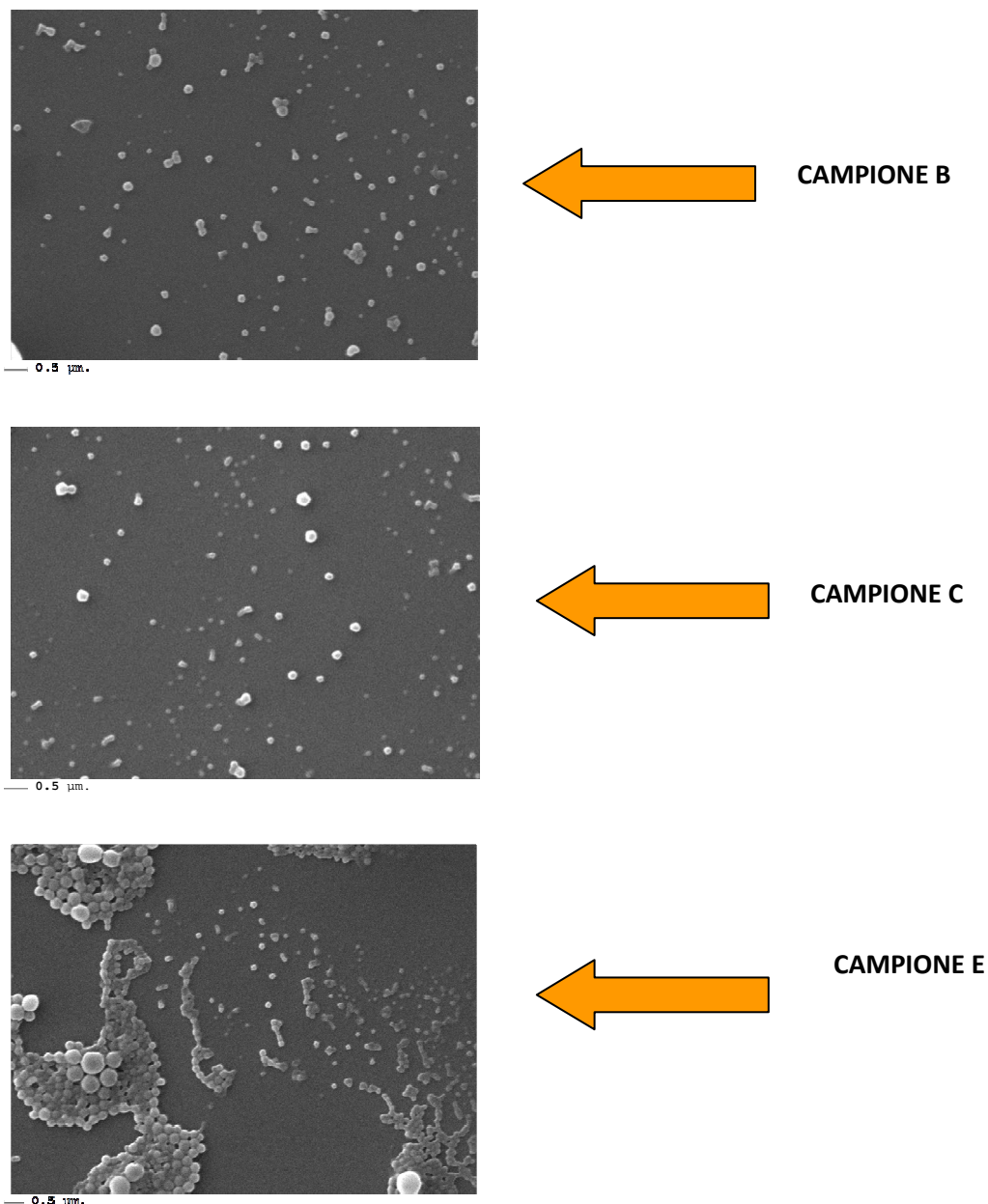


Figura 25: Immagini SEM relative ai campioni B, C e E purificati.

L'analisi PCS sui campioni non purificati mostra la formazione di nanoparticelle con caratteristiche dimensionali dipendenti dalle condizioni applicate durante la sonicazione. Condizioni di sonicazione spinta a 100-70 Watt producono nanoparticelle con diametro medio prossimo a 150-170 (campione A e B); occorre però fare attenzione ai tempi di sonicazione in quanto si assiste ad un rapido e violento riscaldamento del preparato; anche utilizzando un bagno a ghiaccio, per il raffreddamento, non è possibile controllare tale parametro. Purtroppo, in considerazione dell'impiego dei sistemi quali carrier di farmaci, l'innalzamento violento della temperatura non è desiderabile. La scelta di utilizzare tempi di sonicazione

di 30 sec (preparazione A) non ha migliorato le condizioni di reazione; l'indice di polidispersione indica come, pur ottenendo particelle mediamente di poche centinaia di nanometri, il ridotto tempo di sonicazione produce sistemi polidispersi.

Inoltre, così come dimostrato dall'analisi delle nanoemulsioni, diminuendo la potenza di sonicazione sotto 50 Watt si ottengono sistemi ampiamente distribuiti e con diametri superiori a 350 nm (campione F). Applicando una potenza di sonicazione di 55 Watt si ottengono sistemi riproducibili e con dimensioni adatte alla veicolazione. In particolare, se la sonicazione è protratta per 1-2 minuti i sistemi mostrano diametro medio inferiore a 200 nm e PDI inferiore a 0.1 (campioni C e D). Diminuendo i tempi di sonicazione (campione E), si formano sistemi nanoparticellari più eterodispersi e simili a quelli osservati per il campione F, con diametri medi superiori a 250 nm.

Come dimostrato dall'analisi PCS e dalle immagini SEM (analisi morfologica), tutti i campioni purificati a 15000 rpm per 10 min appaiono caratterizzati da particelle ben risospese e che mantengono le caratteristiche di formulazione (le stesse dei campioni non purificati). Il residuo di PVA, come precedentemente dimostrato, si attesta su valori prossimi al 10%. La resa, intesa come recupero dopo centrifugazione appare prossima all'80 % in tutti i preparati (si osservano solo leggere variazioni) tranne che nelle preparazioni A e B, dove si osserva una diminuzione attorno a valori prossimi al 65-70%, presumibilmente per la difficoltà di pellettizzare la frazione più piccola dimensionalmente (che per i preparati in oggetto è distribuita attorno a 100 nm) senza spingere sulle condizioni di centrifugazione.

Un altro parametro importante nello studio formulativo, è la conservazione dei preparati. Per stabilizzare la formulazione nanoparticellare, si procede con la liofilizzazione. La liofilizzazione è stata condotta previa aggiunta di trealosio, un crioprotettore in grado di preservare la stabilità, in particolare impedendo l'aggregazione e la rottura dei piccoli sistemi polimerici durante la fase di congelamento e di liofilizzazione vera e propria (processo di sublimazione). In questo studio preliminare abbiamo cercato di identificare la concentrazione di trealosio minima per poter garantire la stabilità e la ri-sospensibilità dei nostri preparati liofilizzati. Le condizioni testate ed i risultati ottenuti, anche in questo caso su tutti i campioni allestiti, anche se con particolare interesse rivolto al campione C, sono riportati in **Tabella 9**.

Campioni	PLGA/Treal.	Z-Average±S.D. (nm)	PDI±S.D.	D50±S.D. (nm)	D90±S.D. (nm)	Pot-Z ±S.D. (mV)
A	/	532±71	0.54±0.08			-0.4±0.2
A1	1:1	552±12	0.50±0.13			-0.1±0.1
A2	1:0.5	1146±613	0.79±0.28			-1.7±1.1
A3	1:0.3	519±116	0.53±0.13			-0.5±0.2
B	/	2018±2204	0.73±0.37			-9.5±4.6
B1	1:1	2968±266	0.91±0.12			-1.2±0.1
B2	1:0.5	493±43	0.48±0.07			-4.3±0.3
B3	1:0.3	936±545	0.48±0.07			-4.3±0.3
C	/	384±15	0.44±0.06	271±139	339±190	-1.0±0.4
C1	1:1	303±60	0.39±0.07	191±20	348±46	-0.1±0.1
C2	1:0.5	319±35	0.28±0.13	215±90	362±119	-1.0±0.5
C3	1:0.3	477±178	0.73±0.37	293±194	496±280	-0.1±0.0
D	/	649±195	0.58±0.13			-0.5±0.3
D2	1:1	370±138	0.40±0.05	239±33	454±13	-0.0±0.1
D3	1:0.5	733±50	0.50±0.11			1.3±0.5
E	/	483±42	0.46±0.02			-1.7±1.0
E1	1:1	572±12	0.32±0.06			-6.1±0.2
E2	1:0.5	878±14	0.21±0.21			-0.8±0.4
F	/	1102±21	0.85±0.16			-1.7±0.3
F1	1:1	1180±307	0.73±0.36			-0.4±0.2
F2	1:0.5	1668±381	0.93±0.09			-1.3±0.5

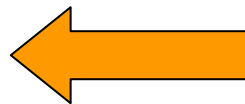
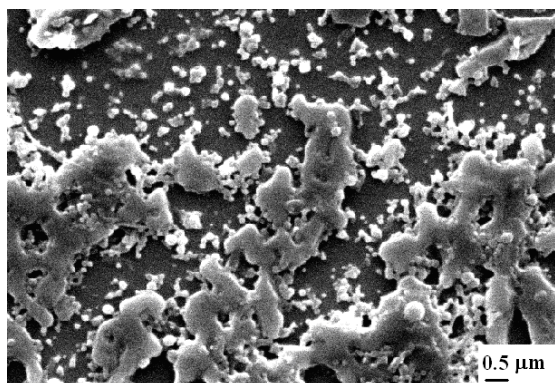
Tabella 9: Ri-sospensione dei campioni liofilizzati; analisi PCS e resa %. I liofilizzati sono stati ottenuti previa aggiunta di trealosio in diversi rapporti con il polimero.

I liofilizzati sono stati risospesi e caratterizzati mediante PCS per valutare la risospensibilità, la stabilità, la distribuzione dimensionale e la carica superficiale; sono stati valutati anche i cambiamenti morfologici mediante analisi al SEM (**Figura 26**).

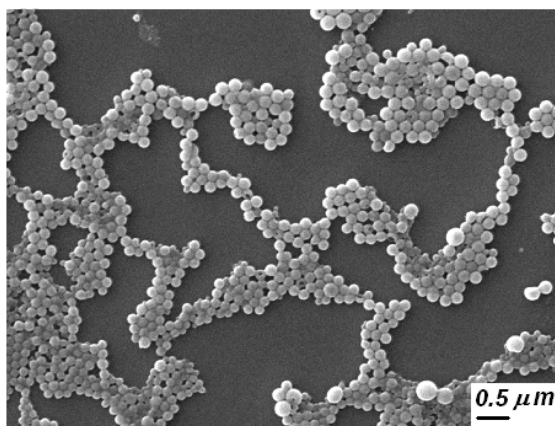
Le analisi condotte alla PCS sono di scarsa qualità, identificando la difficoltà dello strumento nella valutazione del campione. Pertanto, i dati devono essere considerati come indicativi del campione e non valutati in termini assoluti. Questo accade per tutti i preparati ad esclusione dei campioni C e D (solo con rapporto PLGA/trealosio 1:1), che vengono analizzati con buona qualità dei risultati, implicando la

corretta applicazione degli algoritmi per la determinazione del diametro medio e dei valori di distribuzione.

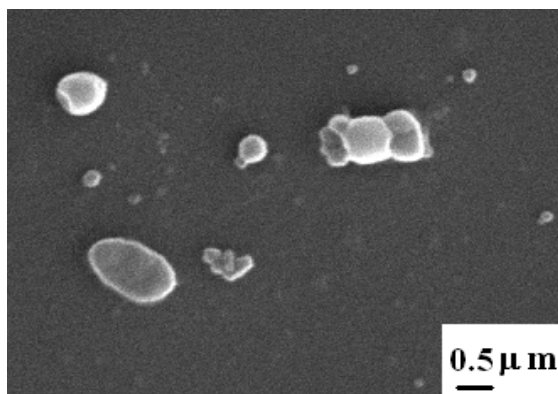
Se consideriamo la liofilizzazione condotta senza l'aggiunta di crioprotettore, è evidente come tutte le preparazioni testate mostrino difficoltà nella ri-sospensione. I PDI sono elevati, maggiori a 0.5, indicando sistemi polidispersi e polimodali. Le preparazioni A e B, sono difficilmente ri-sospese anche quando liofilizzate con trealosio. Considerando rapporti in peso PLGA/trealosio fino a 1:1 non è possibile riottenere i sistemi di partenza, dopo liofilizzazione; la risospensione eseguita con il supporto di un bagno sonicante non riproduce i sistemi purificati, indicando che probabilmente, durante la liofilizzazione sono intervenuti fenomeni di aggregazione e fusione che hanno destabilizzato i campioni. Anche l'analisi morfologica conferma tali dati (**Figura 26**). D'altra parte queste preparazioni, purificate, erano caratterizzate da sistemi molto piccoli, con potenziale superficiale prossimo alla neutralità ed elevata tendenza alla aggregazione. Il campione F, che da purificato era caratterizzato da particelle dimensionalmente molto polidisperse, dopo liofilizzazione in presenza di trealosio appare caratterizzato da formazioni micrometriche irregolari, probabilmente aggregati difficilmente ri-sospensibili (**Figura 26**). Solo le preparazioni C e D, liofilizzate in presenza di trealosio, si ri-sospendono con discreta facilità, almeno fino a che il rapporto PLGA/trealosio è prossimo a 1:1. Il PDI risulta maggiore rispetto alle preparazioni purificate, così come il diametro medio, che però si attesta su valori prossimi a 300 nm, ancora accettabili.



CAMPIONE A



CAMPIONE C



CAMPIONE F

Figura 26: Immagini SEM dei campioni A, C e F liofilizzati in presenza di trealosio rapporto PLGA/trealosio 1:1 in peso).

Sulla base di questi studi, la preparazione C ottenuta per sonicazione a 55 Watt per 1 min (tempo di sonicazione inferiore rispetto alla D e quindi condizione da preferire per l'impatto del processo di sonicazione, che altro non è che una cavitazione, quindi un metodo altamente energetico ma indispensabile per indurre la formazione di nanoemulsioni), centrifugata per la purificazione a 15000 rpm per 10 min a 4 °C e conservata dopo liofilizzazione con aggiunta di trealosio come crioprotettore in

rapporto 1:1 con il PLGA, è stata confermata come preparazione “lead” per i successivi studi di veicolazione del Nutlin-3.

Nanoparticelle polimeriche per la veicolazione di Nutlin 3

Caratterizzazione chimico-fisica delle nanoparticelle

La composizione e le caratteristiche delle diverse nanoparticelle allestite, caricate e non caricate con Nutlin-3, sono riportate in **Tabella 10**. Il metodo utilizzato nella formulazione fa riferimento alla preparazione C ottimizzata nella fase preliminare.

Le nanoparticelle caricate e non caricate con il farmaco, con e senza il marcante fluorescente (3% p/p) (NP, NP-R NP-Nut, NP-R–Nut), appaiono sferiche, caratterizzate da una superficie uniforme ed omogenea, con distribuzione monomodale e monodispersa ($PDI < 0.1$) (**Tabella 10** e **Figura 27**). Il diametro medio idrodinamico (Z-Average, ottenuto all’analisi PCS) delle nanoparticelle è compreso tra 170 e 190 nm, inferiore rispetto a quello delle nanoparticelle ingegnerizzate in superficie con l’anticorpo monoclonale Rituximab, caricate o non caricate con il farmaco, marcate o non marcate con il fluorocromo (Ab-NP, Ab-NP-R, Ab-NP-Nut, Ab-NP-R-Nut); tali nanoparticelle mostrano infatti dimensioni superiori a 200 nm o comunque comprese tra 200 e 270 nm con una più ampia distribuzione dimensionale ($PDI > 0.1$).

Sia il campione di nanoparticelle di solo PLGA (NP) che il campione caricato con il farmaco (NP-Nut) sono state facilmente ri-sospese dopo purificazione; le immagini al SEM dimostrano l’omogeneità di tali preparati (**Figura 27a** e **27b**, rispettivamente); questi campioni appaiono ben purificati e caratterizzati da strutture sferiche stabili, ben separate, formate e compatte, con una superficie sufficientemente liscia. Le immagini SEM delle nanoparticelle ingegnerizzate in superficie con Rituximab descrivono delle strutture eterogenee invischiata in materiale non formato, presumibilmente ascrivibile a tensioattivo e reattivi impiegati nella reazione di coniugazione e non completamente rimossi durante il processo di purificazione. L’indagine al SEM, con una risoluzione che si attesta attorno a 15000x (i nostri campioni facilmente destabilizzano quando investiti dal fascio elettronico incidente), suggerisce che le nanoparticelle ingegnerizzate con anticorpo (Ab-NP e soprattutto Ab-NP-Nut) sono caratterizzate da superfici complicate, disomogenee e non continue (**Figure 27c** e **27d**, rispettivamente) .

Campione	Composizione [% p/p]	Z-Average ^a (±S.D.) (nm)	PDI	pot- ζ^a (±S.D.) (mV)	% PVA Residuo (±S.D.)	Efficienza di incapsulazione ^b [E.E.] (±S.D.) (%)	Contenuto in farmaco ^c (%)
NP	PLGA [100%]	179 (14)	0.04 (0.003)	-13 (3)	6.7 (0.3)		
NP-R	PLGA [97%]	189 (11)	0.09 (0.004)	- 1 (5)	6.1 (0.2)		
	PLGA-L [3%]						
NP-Nut	PLGA [100%]	189 (15)	0.08 (0.02)	-3 (1)	6.7 (0.3)	59 (7)	5.0 (0.7)
NP-R-Nut	PLGA [97%]	179 (14)	0.08 (0.02)	- 6 (9)	6.9 (0.4)	86 (15)	7 (1.3)
	PLGA-L [3%]						
Ab-NP	PLGA [100%]	212 (14)	0.18 (0.02)	- 12 (2)	4.5 (0.4)		
Ab- NP-R	PLGA [97%]	275 (44)	0.20 (0.02)	-10 (5)	4.8 (0.2)		
	PLGA-L [3%]						
Ab-NP-Nut	PLGA [100%]	223 (16)	0.12 (0.02)	- 10 (4)	3.4 (0.2)	44 (8)	4.0 (0.8)
Ab-NP-R-Nut	PLGA [97%]	211 (32)	0.14 (0.02)	- 11(4)	3.2 (0.3)	75 (13)	6.3 (1.2)
	PLGA-L [3%]						

Tabella 10: Proprietà chimico-fisiche e tecnologiche dei campioni.

^aValore medio \pm S.D. ($n = 4$).^bEfficienza di incapsulazione percentuale determinata come rapporto tra il farmaco incapsulato e quello utilizzato nella formulazione per cento (%). Valore medio \pm S.D. ($n = 4$).^cContenuto di farmaco percentuale espresso come rapporto tra farmaco incapsulato e massa totale della formulazione (nanoparticelle + farmaco incorporato) per cento (%). Valore medio \pm S.D. ($n = 4$). PDI: indice di polidispersione;

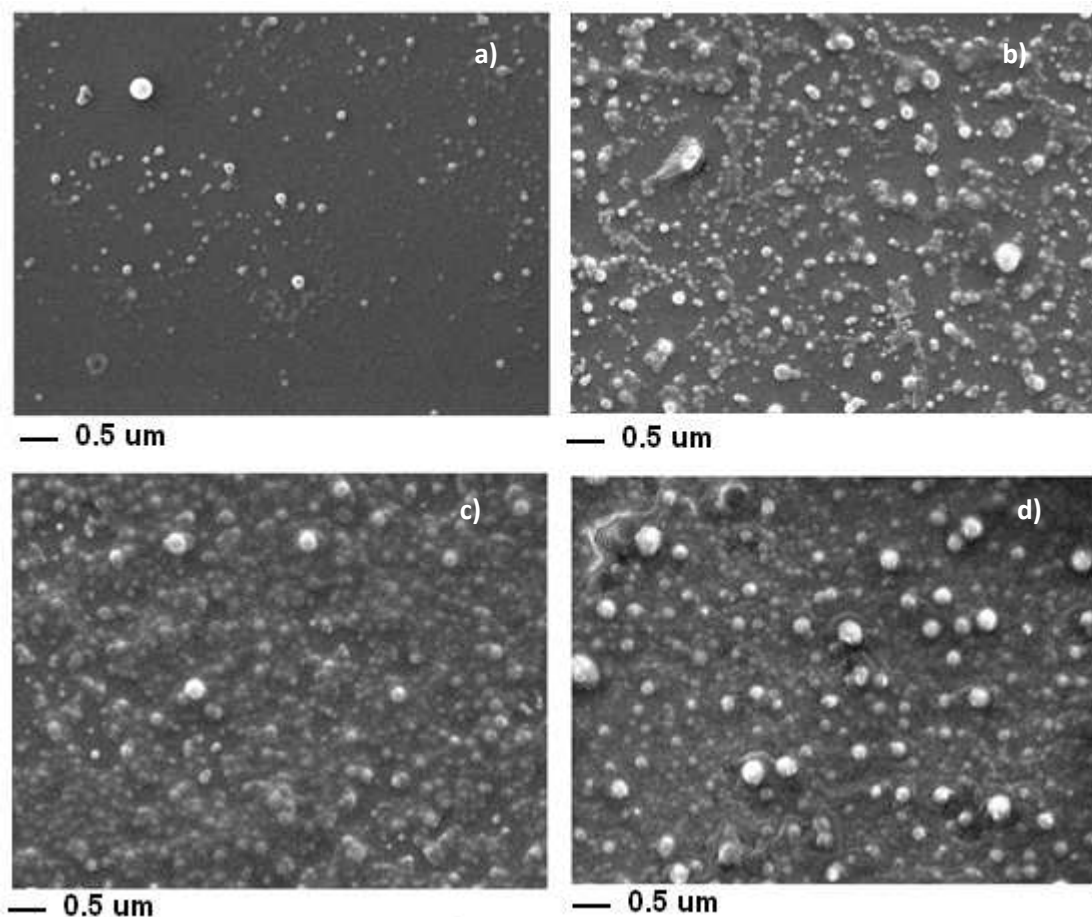


Figura 27: Immagini SEM dei campioni a) NP, b) NP-Nut, c) Ab-NP and d) Ab-NP-Nut.

Le nanoparticelle di PLGA non caricate e non modificate (NP) mostrano superficie negative, con potenziale zeta che si attesta attorno a -13 mV; la superficie negativa è riconducibile alla presenza di gruppi carbossilici liberi del polimero PLGA. Il potenziale zeta ($\text{pot-}\zeta$) delle nanoparticelle caricate con farmaco, modificate e non con fluorocromo (NP-Nut, NP-R e NP-R-Nut) si attesta su valori meno negativi e maggiormente dispersi, se confrontati a quelli relativi alle nanoparticelle bianche (NP), e, in generale, tendenti alla neutralità. Probabilmente il residuo di PVA ancora presente nella preparazione, così come la Rodamina B piperazina ancorata alla superficie e il Nutlin-3 in parte adsorbito rendono meno negativa la superficie delle nanoparticelle, mascherando in parte i gruppi carbossilici del polimero. Questa ipotesi è supportata dal fatto che alcuni studi precedentemente condotti hanno dimostrato che nanoparticelle di PLGA RG503H, non modificate e preparate senza PVA presentano un $\text{pot-}\zeta$ di circa -60 mV, mentre quando allestite in presenza di PVA il potenziale diviene meno negativo raggiungendo valori prossimi alla neutralità [Costantino et al., 2006].

Il valore di $\text{pot-}\zeta$ misurato sulla superficie delle nanoparticelle ingegnerizzate con l'anticorpo (Rituximab) è invece simile a quello delle nanoparticelle di PLGA bianche. Il valore di PVA residuo, che sicuramente influenza notevolmente l'intorno ionico delle nanoparticelle e appiattisce le differenze, è simile in tutte le preparazioni e compatibile con la tecnica e le condizioni impiegate per la purificazione (circa 5-6% p/p calcolato rispetto al polimero). Le differenze dimensionali e di $\text{pot-}\zeta$ osservate tra le nanoparticelle modificate e non modificate possono essere considerate una evidenza della localizzazione delle molecole di anticorpo (Rituximab) sulla superficie dei vettori.

L'evidenza della avvenuta coniugazione dell'anticorpo sulla superficie delle nanoparticelle è stata dimostrata utilizzando la microscopia a forza atomica AFM, comparando le immagini ottenute e relative al campione NP (nanoparticelle bianche) con quelle relative al campione di nanoparticelle ingegnerizzate (Ab-NP). In **Figura 28** sono riportate le immagini topografiche e "error signal" dei campioni che rivelano dettagliatamente le alterazioni sulla superficie delle nanoparticelle, attraverso variazioni dei contrasti legati agli spostamenti di fase che intercorrono durante l'analisi. L'immagine topografica (anche indicata "height images") mostra strutture ben definite, confermando che le nanoparticelle bianche (campione NP) sono formate da strutture ben separate mentre il campione Ab-NP è caratterizzato da aggregati di particelle irregolari. In accordo con i dati di PCS, il diametro delle nanoparticelle bianche, ottenuto analizzando con un programma di analisi le immagini delle nanoparticelle acquisite, è prossimo a 150–200 nm; l'altezza di queste particelle correla con il diametro, dimostrando che le nanoparticelle di PLGA sono stabili se deposte su mica e sufficientemente rigide da sopportare l'analisi mediante AFM, senza alterare il proprio stato (e quindi senza fornire artefatti).

Il campione Ab-Np è invece caratterizzato da nanoparticelle disorganizzate, difficili da analizzare, con contorno irregolare e diametro medio distribuito in ampio intervallo (100-300 nm). L'altezza di tali nanoparticelle non correla con i relativi diametri (altezza $\sim 0.1 \mu\text{m}$ e diametri $\sim 0.3 \mu\text{m}$). In più la superficie delle nanoparticelle ingegnerizzate (Ab-NP) appare rugosa ed eterogenea, con la chiara e distinta presenza di lacune e aree con differente deposizione di materiale e complessità (come indicato dalle frecce nell'immagine "error signal").

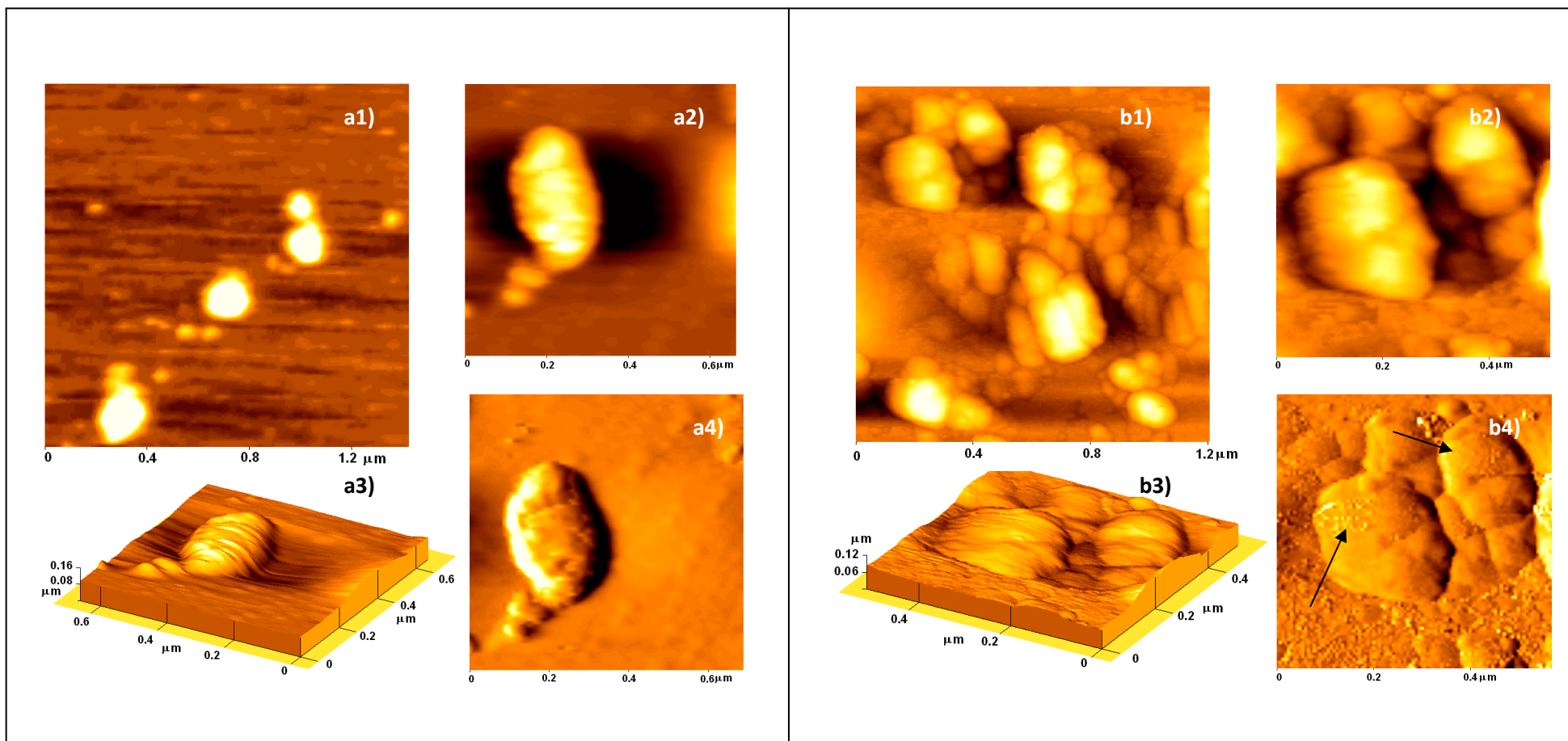
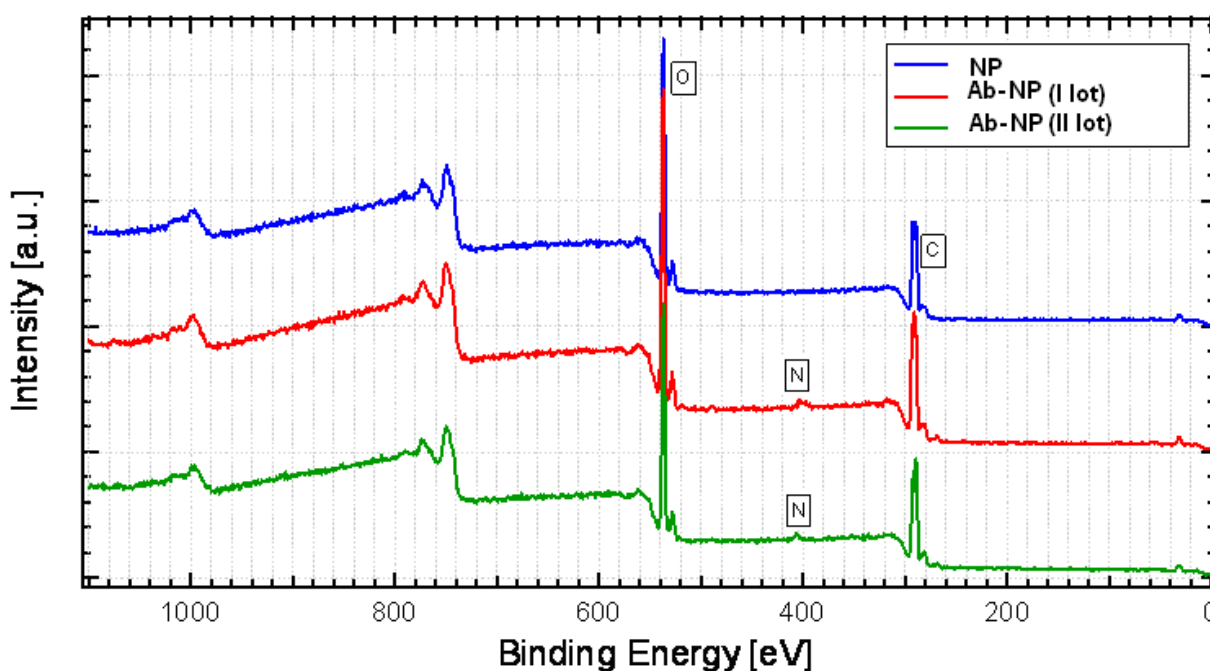


Figura 28: Analisi AFM dei campioni NP e Ab-NP. Immagini di a) NP e b) Ab-NP; 1) immagini topografiche, 2) ingrandimenti delle immagini topografiche; 3) elaborazione 3D; 4) ingrandimento delle immagini “Error Signal”. Le frecce indicano le alterazioni sulla superficie delle nanoparticelle ingegnerizzate.

Per cercare di quantificare la coniugazione, è stata effettuata l'analisi ESCA (**Figura 29**). Mentre le nanoparticelle bianche, non modificate (campione NP) non mostrano alcun segnale relativo alla presenza di N negli strati più superficiali (la penetrazione del raggio incidente è molto bassa), gli spettri ottenuti dall'analisi delle nanoparticelle coniugate con anticorpo mostrano il segnale dell'N indicando la presenza del ligando sulla superficie di sistemi. Se l'anticorpo rivestisse completamente la superficie delle nanoparticelle, il rapporto teorico (aspettato) N/C, calcolato considerando la formula chimica del Rituximab, sarebbe di circa 0.26. Utilizzando la stessa approssimazione, il valore N/C ottenuto dall'analisi ESCA delle nanoparticelle Ab-NP testate è vicino a 0.019, che corrisponde ad una copertura/coniugazione di circa il $7.4 \pm 0.6\%$.



	O 1s [at. %]	C 1s	N 1s	% of DERIVATIZATION
NP	37.8	62.2		
Ab-NP (I lot)	35.9	62.0	1.1	6.8
Ab-NP (II lot)	34.5	62.0	1.3	8.0

Figura 29: Analisi ESCA dei campioni NP e Ab-NP. Le analisi sono condotte su due differenti lotti di Ab-NP.

Il contenuto di Nutlin-3 nelle nanoparticelle del campione NP-Nut è di 5.0 ± 0.7 mg/100 mg di formulazione e l'efficienza di incapsulazione (EE) è di circa 59 ± 7 %; le stesse nanoparticelle ottenute formulando con una percentuale minima di polimero marcato con fluorocromo per gli studi

in vitro (campione NP-R-Nut) mostrano un contenuto e una EE approssimativamente di 7 ± 1.3 mg/100 mg di formulazione e $86 \pm 15\%$, rispettivamente, dimostrando una discreta variabilità.

La capacità di caricamento diminuisce a 4.0 ± 0.8 mg/100 mg di formulazione (EE di circa $44 \pm 8\%$) nelle nanoparticelle caricate e coniugate con Rituximab (Ab-NP-Nut). Questa diminuzione potrebbe essere la conseguenza della diffusione del farmaco verso la fase esterna della emulsione sia durante i ripetuti e lunghi processi di modifica che prevedono l'impiego di volumi importanti di tamponi per tempi lunghi (più di 2 h in tampone MES) sia durante il processo di purificazione (più lavaggi in acqua distillata). Anche in questo caso però, Ab-NP-R-Nut mostra un contenuto in farmaco maggiore rispetto a quello delle corrispondenti preparazioni funzionalizzate con anticorpo ma non marcate con fluorocromo (**Tabella 10**).

Capacità di veicolare il farmaco; studi in vitro

In parallelo alla caratterizzazione chimico-fisica e tecnologica dei campioni si è valutata l'attività antileucemica in vitro, testando inizialmente la capacità delle nanoparticelle di veicolare e rilasciare il farmaco. Per questi studi sono state impiegate le nanoparticelle caricate con Nutlin-3, con e senza fluorocromo, non modificate con anticorpo, ovvero i campioni NP, NP-R, NP-Nut ed NP-R-Nut. Sono stati utilizzati due modelli cellulari di leucemia; la linea cellulare JVM2 caratterizzata dall'espressione della proteina p53 non mutata (wild type) e la linea cellulare BJAB con p53 mutata.

La capacità di interazione ed uptake è stata testata utilizzando la citofluorimetria e la microscopia a fluorescenza (**Figura 30**), e trasfettando con le nanoparticelle marcate con fluorocromo (NP-R e NP-R-Nut). Il marcante funziona da sonda per le nanoparticelle, offrendo un metodo sensibile per valutare qualitativamente l'interazione nanoparticella-cellula. In particolare, l'analisi citofluorimetrica permette di monitorare la cinetica di ingresso delle nanoparticelle nelle cellule, che come si vede, raggiunge il massimo dopo 48 ore circa, in entrambe le linee investigate (**Figura 30c**).

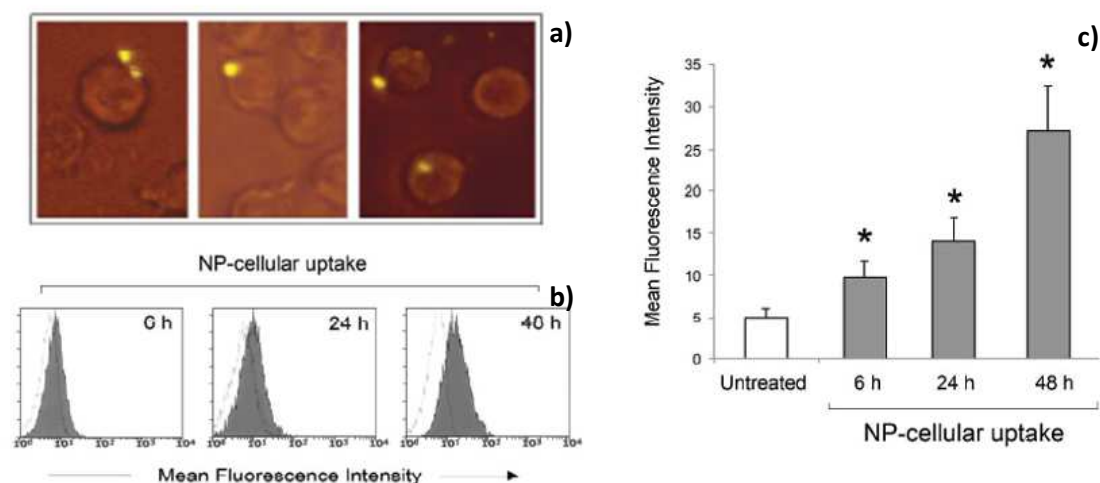


Figura 30: Uptake cellulare delle nanoparticelle nelle diverse linee cellulari. Le cellule JVM2 e BJAB sono coltivate in assenza (Untreated) e in presenza di NP-R. L'uptake è valutato con microscopia a fluorescenza (A) e citofluorimetria a tempi diversi (B e C). $P < 0.05$ rispetto al non trattato.

Per definire l'efficienza biologica e la specificità del Nutlin-3 rilasciato dalle nanoparticelle abbiamo valutato il suo effetto citotossico nelle due linee cellulari leucemiche transfettate. Per questi studi abbiamo utilizzato i campioni non marcati, ovvero il campione NP-Nut e, quale riferimento, il campione privo di farmaco (NP). Il trattamento con NP ha verificato l'assenza di tossicità data dal vettore alle concentrazioni testate (sono state testate fino a quantità superiori a 1 mg/ml) in entrambe le linee cellulari (JVM-2 e BJAB). Le stesse linee sono state sottoposte a trattamento con NP-Nut (680 $\mu\text{m}/\text{ml}$ -10 μM) e, per comparazione, trattate con una soluzione contenete la stessa quantità di Nutlin-3 (10 μM) (**Figura 31**). La citotossicità del farmaco è stata valutata analizzando non solo la vitalità cellulare (**Figura 31 A**), ma anche il livello di apoptosi (**Figura 31 B**) e la progressione del ciclo cellulare (**Figura 31 C**) a differenti tempi dopo il trattamento. I dati dimostrano come il farmaco venga rilasciato dalle nanoparticelle a livello cellulare, in quantità comparabile al farmaco libero, a suggerire che il sistema polimerico attua efficacemente la sua funzione di carrier; a) trasporta e stabilizza il farmaco (ricordiamo che il farmaco come tale è solubile solo in solventi organici e pertanto difficilmente somministrabile) per poi b) rilasciarlo in quantità adeguata all'azione terapeutica. Non solo. E' evidente come l'effetto del Nutlin-3 trasportato dalle nanoparticelle, che si manifesta con diminuzione delle vitalità cellulare, induzione dell'apoptosi e inibizione della progressione del ciclo cellulare, è selettivamente osservato nelle cellule p-53 wild type (JVM-2) mentre non si osserva nelle cellule con p-53 mutato (BJAB), confermando la specificità dell'azione citotossica del Nutlin-3.

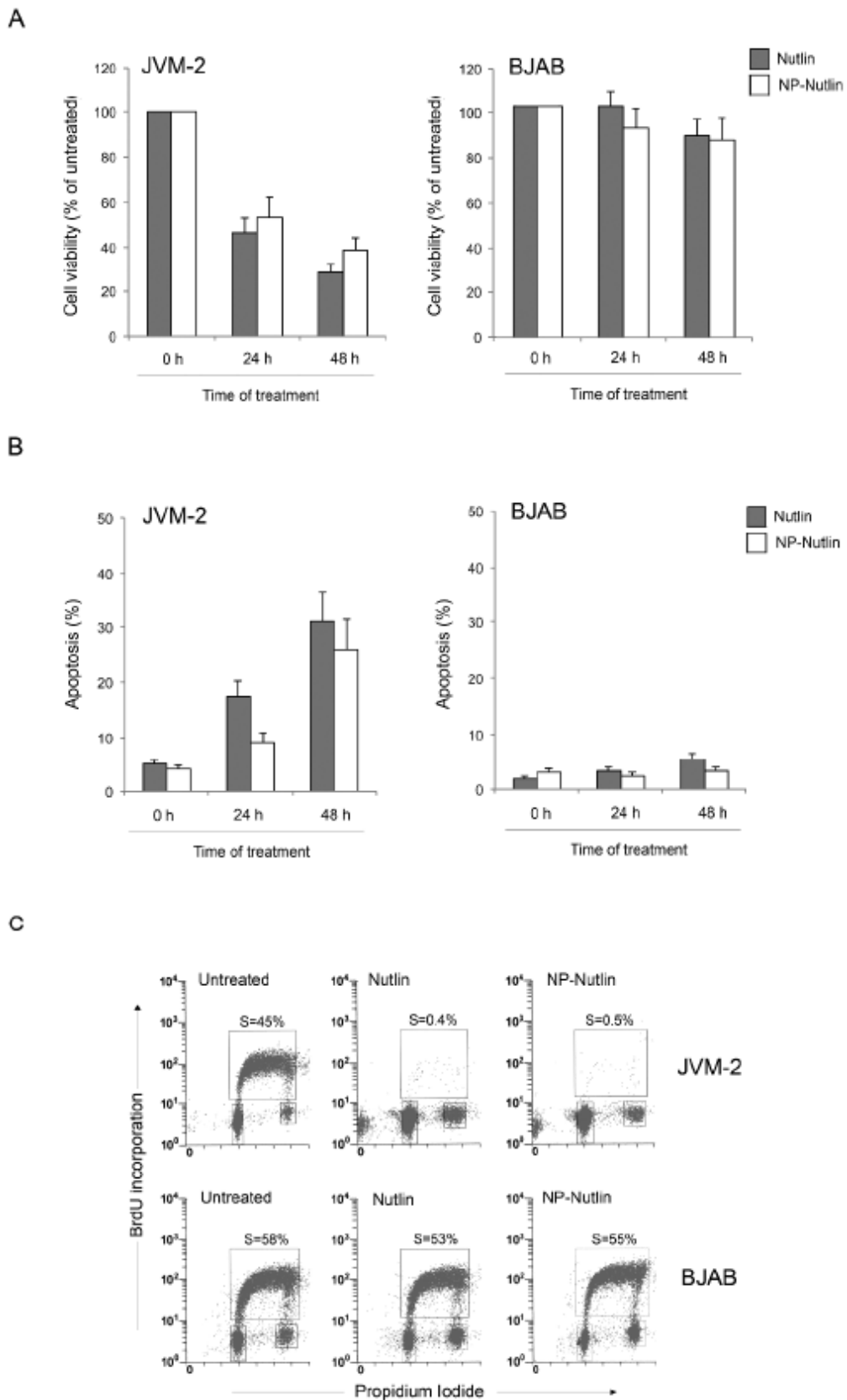


Figura 31: Rilascio del Nutlin-3 dalle nanoparticelle; mantenimento delle azione antileucemica. Le cellule sono trattate con soluzione di Nutlin-3 (10 mM) e nanoparticelle contenenti Nutlin-3 alla stessa concentrazione. In A) riduzione della vitalità cellulare dopo trattamento riportata come percentuale rispetto

al controllo, B) livelli di apoptosi determinati mediante staining con anessina/ propidio e successiva analisi citofluorimetrica, C) profili di ciclo cellulare ottenuti per citofluorimetria, dopo test BrdU. In ogni pannello, i quadrati delimitano le cellule in fase S del ciclo cellulare.

CONCLUSIONI

Nella prima parte di questo progetto di tesi è stata investigata la possibilità di seguire e tracciare la biodistribuzione *live* di nanosistemi targettizzanti al SNC mediante l'utilizzo di un polimero opportunamente modificato con un probe visibile in Optical Imaging, il DY-675.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la localizzazione delle nanoparticelle PLGA-g7-DY-675 a livello cerebrale già dopo pochi minuti dalla somministrazione, confermando che la sonda impiegata, ovvero il DY-675, è stata efficacemente e stabilmente coniugata alla nanoparticelle ingegnerizzate e targettizzate al cervello e che, pur essendo borderline tra il “far red” ed il “near infrared”, permette la tracciabilità in studi di Optical Imaging. Gli animali trattati con le nanoparticelle e osservati “live” infatti mostrano la localizzazione dei sistemi a livello cerebrale in tempi assolutamente comparabili con quelli già evidenziati da altri studi effettuati su tessuti di animali trattati e sacrificati, così come da test tossicologici.

Ragionevolmente possiamo concludere che i nostri studi hanno portato ad ottimizzare un buon strumento da utilizzare tal quale e/o per trasportare diagnostici al cervello, avanzando una concreta applicazione nel Brain-Live Imaging.

Gli studi eseguiti nella seconda parte della ricerca, hanno portato alla progettazione ed ottimizzazione di nanoparticelle ottenute con la tecnica della emulsione semplice; impiegando potenza e tempi di sonicazione brevi (55 watt, 1 minuto) si ottengono nanoemulsioni omogenee e stabili che si traducono in preparazioni nanoparticellari monodisperse e monomodali, con diametro prossimo a 200 nm. Centrifugazioni protratte per non meno di 10 minuti a 15000 rpm portano alla pellettizzazione e risospensione dei sistemi, purificati dagli additivi di reazione; l'impiego di trealosio in quantità minime (rapporto inferiore a 1:1 tra polimero e crioprotettore) consente la risospensione dopo liofilizzazione.

Sulla base di questi risultati, tali nanoparticelle sono state modificate in superficie con anticorpo monoclonale (Rituximab) ed impiegate per caricare un farmaco antitumorale, il Nutlin.

Le caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle caricate con Nutlin sono risultate promettenti per la successiva applicazione *in vivo*. In particolare, il diametro idrodinamico delle nanoparticelle si è attestato attorno a 200 nm, mentre il potenziale è risultato prossimo alla neutralità, condizioni favorevoli per prevenire l'*uptake* macrofagico *in vivo*. Quando le nanoparticelle sono coniugate con l'anticorpo, si osservano leggere differenze sia in termini di diametro medio che di carica superficiale; soprattutto, i sistemi targettizzati risultano maggiormente eterodispersi, dimostrando una maggior complessità delle preparazioni. Utilizzando tecniche avanzate di microscopia e l'analisi ESCA è stata definita sia qualitativamente che quantitativamente la coniugazione del Rituximab sulla superficie dei nanosistemi. In particolare i dati ESCA hanno suggerito che circa il 7% della superficie delle nanoparticelle è ricoperta da anticorpo, supportando

la possibilità di ottenere dei carriers abili al direccionamento del farmaco neoplastico alle cellule target.

Le nanoparticelle mostrano inoltre un efficiente caricamento; il contenuto in farmaco, per le nanoparticelle non modificate, si attesta a circa 5 mg/100 mg di formulazione con una efficienza di incapsulazione prossima al 60%; i valori risultano più alti quando le nanoparticelle sono modificate con fluorocromo. Invece, le ripetute centrifugazioni richieste per purificare i campioni targettizzati con anticorpo dall'ambiente di reazione, specialmente dal PVA e dai reattivi utilizzati durante il "coupling", giustificano la perdita di farmaco dai sistemi targettizzati e particolarmente stressati (le nanoparticelle coniugate con rituximab presentano un contenuto di farmaco di circa 4 mg/100 mg di formulazione, appunto inferiore rispetto alle particelle non modificate)

Studi *in vitro* hanno dimostrato come i sistemi siano abili nel trasferimento del farmaco alle cellule e come venga mantenuta l'attività antineoplastica del Nultin.

Studi *in vivo* sono in esecuzione per dimostrare la targettibilità del sistema e l'efficacia della veicolazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelwahed W , Degobert G, Stainmesse S, et al., *Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations*. Adv Dru Del Rev 58 (2006) 1688–1713.
- Alas S, Bonavida B, Emmanouilides C, *Potential of fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifylline and rituximab*. Antican Res 20(5A) (2000) 2961-2966.
- Alina Shapira A, Livneya Y D, Broxtermanc H J, et al., *Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance*. Dru Res Upd 14 (2011) 150– 163.
- Allémann E, Leroux J C, Gurny R, Doelker E. *In vitro extended-release proprieties of drug loaded poly(D-L-lactic acid) produced by salting out procedure*. Pharm Res 10 (1993) 1732-1737.
- Allémann E, *thesis No 2619*. University of Geneva (1989).
- Alonso M J, *Nanoparticulate drug carrier technology: Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*. S Cohen H Bernstein Eds (1996) 203–242.
- Arbo's P, Wirth M, Arangoa MA, et al., *Gantrez RAN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates*. J Cont Rel 83 (2002) 321-330.
- Auvillain M, Cavé G, Fessi H, et al., *Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques*. STP Pharma 5 (1989) 738–744.
- Bagalkot V, Zhang L, Levy-Nissenbaum E, et al., *Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bifluorescence resonance energy transfer*. Nano Lett 7 (2007) 3065–3070.
- Beck L R, Cowsar D R, Lewis, D H, *New long acting injectable microcapsule contraceptive system*. Am J Obstet Gynecol 135 (1979) 419.
- Beck L R, Cowsar D R, Lewis D H, et al., *New long acting injectable microcapsule system for administration of progesterone*. Fertil Steril 31 (1979) 545.
- Benelli P, Conti P, Genta I, et al., *Clonazepam microencapsulation in poly-D,L-lactide,co-glycolide microspheres*. J. Microenc 15 (1998) 431-443.
- Bindschaedler C, Gumy R, Doelker E. US Patent 4 (1990) 968 350.
- Birnbaum B T, Kosmala D J, Brannon-Peppas, L, *Effect of preparation solvent on the encapsulation and release of β -estradiol from PLGA microparticles*. Proc Int Symp Rel Bioact Mater 25 (1998) 152-153.
- Blanco M D, Alonso M J, *Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants*. Eu J Pharm Biopharm. 45 (1998) 285–294.
- Blanco M D, Alonso M J, *Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres*, Eu J Pharm Biopharm 43 (3) (1997) 287–294.
- Blanco M D, Sastre R L, Teijón C, et al., *Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) polymers*. Int J Pharm 326(1-2) (2006) 139-147.
- Bodmeier R, Chen H, *Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization*. J Control Rel 12 (1990) 223-233.

- Boury F, Ivanova T, Panaïotov I, et al., *Dynamic properties of poly(dl-lactide) and polyvinyl alcohol monolayers at the air/water and dichloromethane/water interfaces*. J Colloid Interf Sci 169 (1995) 380–392.
- Brannon-Peppas L, Blanchette J O, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Adv Dru Del Rev 64 (2012) 206–212.
- Brasnjevic I, Steinbusch H W M, Schmitz C, et al., *Delivery of peptide and protein drugs over the blood–brain barrier*. Progress in Neurobiology 87 (2009) 212–251.
- Burger J A, *Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): From understanding the basics towards therapeutic targeting*. Sem Canc Biolo 20 (2010) 424–430.
- Byrd JC, Murphy T, Howard RS, et al., *Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity*. J Clin Oncol 19(8) (2001) 2153-2164.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci USA 26 99(24) 2002 15524-15529.
- Camacho A I, Da Costa Martins R, Tamayo I, et al., *Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as innate immune system activators*. Vacc 29 (2011) 7130–7135.
- Cao Q, Li Z-B, Chen K, et al., *Evaluation of biodistribution and anti-tumor effect of a dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate in mice with breast cancer*. Eur J Nucl Med Mol Imaging 35 (2008) 1489–1498.
- Cavalier M, Benoit J P, Thies C, *The formulation and characterization of hydrocortisone of loaded poly(lactic acid) microspheres*. J Pharm Pharmacol 38 (1986) 249-253.
- Cha Y, Pitt C G, *The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester-microspheres*. J Control Rel 8 (1989) 259-265.
- Chacon M, Molpeceres J, Berges L, et al., *Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers*. Eur J Pharm Sci 8 (1999) 99–107.
- Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN, *AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation*. Annu Rev Biochem 68 (1999) 965-1014.
- Chen X, Plasencia C, Hou Y, et al., *Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery*. J Med Chem 48 (2005) 1098–1106.
- Chiorazzi N, Rai K R, Ferrarini M, *Chronic Lymphocytic Leukemia*, The New Engl J Med 352 (2005) 804-815.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A 27 102(39) 2005 13944-13949.
- Costantino L, Gandolfi F, Bossy-Nobs L, *Nanoparticulate drug carriers based on hybrid poly(D,L-lactide-co-glycolide)-dendron structures*. Biom 27 (2006) 4635–4645.
- Costantino L, Gandolfi F, Tosi G, et al., *Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood–brain barrier*. J Control Rel 108 (2005) 84– 96.

- Couvreur P, Barrat G, Fattal E, et al., *Nanocapsule technology*. Crit Rev Ther Drug Carr Syst 19 (2002) 99-134.
- Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. *Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends*. Eur J Pharm Biopharm 41 (1995) 2-13.
- Das M, Dilnawaz F, K Sahoo S K, *Targeted nutlin-3a loaded nanoparticles inhibiting p53-MDM2 interaction: novel strategy for breast cancer therapy*. Nanomed 6(3) (2011) 489–507.
- Das M, Sahoo S K, *Epithelial cell adhesion molecule targeted nutlin-3a loaded immunonanoparticles for cancer therapy*. Acta Biom 7 (2011) 355–369.
- Dash T K, Konkimalla V B, *Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review*. J Control Rel 158 (2012) 15–33.
- Desai M P, Labhasetwar V, Walter E, et al., *The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent*. Pharm Res 14 (1997) 1568-1573.
- Dijkmansa P A, Juffermans L J M, Musters R J P, et al., *Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy*. Eur J Echocard 5 (2004) 245-256.
- Dimitrova B, Ivanov IB, Nakache E, *Mass transport effects on the stability of emulsion films with acetic acid and acetone diffusing across the interface*. J Disp Sci Technol 9 (1988) 321-341.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med 343(26) (2000) 1910-1916.
- Dunn R L, *Pymeric drugs and drug delivery system*. Am Chem Soc (1991) 11-23.
- Durand A, Marie E, *Macromolecular surfactants for miniemulsion polymerization*. Adv Coll Interf Sci 150 (2009) 90-105.
- Ekins S, Xu J J, *Drug Efficacy, Safety, and Biologics Discovery: Emerging Technologies and Tools*. (2008) 241-242.
- Elzoghby A O, Samy W M, Elgindy N A, *Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems*. J Control Rel 157 (2012) 168–182.
- Ernsting M J, Murakami M, Undzys E, et al., *A docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticle outperforms the approved taxane nanoformulation, Abraxane, in mouse tumor models with significant control of metastase*. J Control Rel 162 (2012) 575–581.
- Faderl S, O'Brien S, Keating MJ, *Monoclonal antibody combinations in CLL: evolving strategies*. Best Pract Res Clin Haematol 19(4) (2006) 781-793.
- Feng L, Mumper R J, *A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery*. Article in press Cancer Letters (2012).
- Fessi H, Devissaguet J P, Puisieux F, *Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles*. US patent 5 (1992) 118 528.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J Ph, et al., *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. Int J Pharm 55 (1989) R1-R4.

- Florence A T, Whitehill D, *Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions*, J. Coll Interf Sci 79 (1) (1981) 243.
- Florence A T, Whitehill D, *The formulation and stability of multiple emulsions*. Int J Pharm 11 (1982) 277-308.
- Fukumori Y, Ichikawa H, *Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis*. Adv Pow Tech 17 (1) (2006) 1–28.
- Galindo-Rodriguez S, Allémann E, Fessi H, et al., *Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods*. Pharm Res 21 (2004) 1428–1439.
- Garcia-Contreras L, Abu-Izza, K, Robert Lu D, *Biodegradable cisplatin microspheres for direct brain injection: preparation and characterization*. Pharm Dev Technol 2 (1997) 53-65.
- Garti N, in Seiller M, Grossiord J L (Eds) *Multiple Emulsions: Structure, Properties and Applications*. Ed Santé Paris (1998) 81–116.
- Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, et al., *From normal to clonal B cells: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity*. Autoimm Rev 7 (2007) 127–131.
- Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, et al., *Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer*. J Clin Oncol 23 (31) (2005) 7794-7803.
- Grdisa M, *Influence of CD40 ligation on survival and apoptosis of B-CLL cells in vitro*, Leuk Res 27 (2003) 951–956.
- Grossiord J L, Seiller M, Silva-Cunha A, in Seiller M, Grossiord J L (Eds) *Multiple Emulsions: Structure, Properties and Applications*. Ed de Santé Paris (1998) 57–80.
- Guo J H, *Preparation method of biodegradable microspheres of bovine serum albumin loading efficiency and release profiles*. Drug Dev Ind Pharm 20 (1994) 2535-2545.
- Gurny R, Peppas NA, Harrington DD, et al., *Development of biodegradable and injectable lattices for controlled release of potent drugs*. Drug Dev Ind Pharm 7 (1981) 1-25.
- Haiat S, Billard C, Quiney C, et al., *Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Immunol 118(3) (2006) 281-292.
- Hainsworth JD, Litchy S, Barton JH, et al., *Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network.; Minnie Pearl Cancer Research Network*. J Clin Oncol 21(9) (2003) 1746-1751.
- Hallek M, Eichhorst BF, *Chemotherapy combination treatment regimens with fludarabine in chronic lymphocytic leukemia*. Hematol J 5 (2004) S 20-30.
- Hanessian S, Grzyb JA, Cengelli F, et al., *Synthesis of chemically functionalized superparamagnetic nanoparticles as delivery vectors for chemotherapeutic drugs*. Bioorg Med Chem 16 (2008) 2921–2931.

- Hayes M D, Hallihan M J, Love B J, et al., *PGA and PLA as biodegradable polymers*. Transactions of the annual meeting of the society for biomaterials in conjunction with the international biomaterials symposium (1996) 400.
- Hobbs S K, Monsky W L, Yuan F, et al., *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 4607– 4612.
- Hu J, Qian Y, Wang X, et al., *Drug-Loaded and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Surface-Embedded Amphiphilic Block Copolymer Micelles for Integrated Chemotherapeutic Drug Delivery and MR Imaging*. Langmuir 28 (2012) 2073–2082.
- Huang H P, Ghebre Sellassie I, *Preparation of microspheres of water soluble pharmaceuticals* Journal of Microencapsulation. 6 (1989) 219-225.
- Irache JM, Huici M, Konecny M, et al., *Bioadhesive properties of gantrez nanoparticles*. Molec 10 (2005) 126-45.
- Iwata M, Tanaka T, Nakamura Y, et al., *Selection of the solvent system for the preparation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing tumor necrosis factor alpha (TNF- α)*. Int J Pharm 160 (1998) 145-156.
- Jain R K, Munn L L, Fukumura D, *Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy*. Nat Rev Cancer 2 (2002) 266– 276.
- Jaiswal J, Gupta SK, Kreuter J, *Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process*. J Control Rel 96 (2004) 169- 78.
- Jeyanthi R, Mehta R C, Thanoo B C, et al., *Effects of processing parameters on the properties of peptide containing PLGA microspheres*. J Microencap 14 (1997) 163-174.
- Juni K, Ogata J, Nakano M, et al., *Preparation and evaluation in vitro and in vivo of poly(lactic-acid) microspheres containing doxorubicin*. Chem Pharm Bull 33 (1985) 313-318.
- Juni, K., Ogata, J., Matsui, N. Kubota, M., Nakano, M. Control of release rate of bleomycin from poly(lactic acid) microspheres by additives. Chem. Pharm. Bull, 1985, 33, 1609-1614.
- Keating K J, *Progress in CLL, chemotherapy, antibodies and transplantation*. Biomed Pharmacother 55 (2001) 524-528
- Kennedy B, Rawstron A, Carter C, et al., *Camptoth-1H and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia*. Blood 15 99(6) (2002) 2245-2247.
- Kim C J, *Surface chemistry and colloids, Advanced pharmaceuticals: physicochemical principles*. CRC Press (2004) 193–256.
- Kleiter M M, Yu D, Lenore, Mohammadian A, et al., *A tracer dose of technetium-99m-labeled liposomes can estimate the effect of hyperthermia on intratumoral doxorubicin extravasation*. Clin Cancer Res 16 (2006) 6800–6807.
- Kojima K, Konopleva M, McQueen T, et al., *Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia*. Blood 108(3) (2006) 993-1000.

- Krasnici S, Werner A, Eichhorn M E, et al., *Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels*. Int J Canc 105 (2003) 561–567.
- Kröber A, Seiler T, Benner A, *V H mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia*. Blood 100 (2002) 1410-1416
- Kumari A, Yadav S K, Yadav S C, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Col Surf B: Biointerf 75 (2010) 1–18.
- Lamprecht A, Ubrich N, Pèrez M H, et al., *Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique*. Int J Pharm. 196 (2000) 177–182.
- Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, et al., *Influence of coating agents on the degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles in model digestive fluids (USP XXII)*. STP Pharma Sci 6 (1996) 195–202.
- Lee S C, Oh J T, Jang M H, et al., *Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration*. J Controll Rel 59 (2) (1999) 123–132.
- Lemarchand C, Gref R, Passirani C, et al., *Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems*. Biomat 27 (2006) 108-118.
- Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, et al., *Stability study of nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone), poly (D, L-lactide) and poly (D,L-lactide-coglycolide)*. Biomat 17 (1996) 2191–2197.
- Lemoine D, Préat V, *Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins*. J Contr Rel 54 (1998) 15–27.
- Leroux J C, Cozens R, Roesel J L, et al., *Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice*. J Pharm Sci 84 (1995) 1387-1391.
- Leroux J C, *thesis, No. 2785*. University of Geneva (1996).
- Licha T K, Olbrich C, *Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications*. Adv Dru Del Rev 57 (2005) 1087– 1108.
- Lu J, Owen S, Shoichet M S, *Stability of Self-Assembled Polymeric Micelles in Serum*. Macromol 44 (15) (2011) 6002–6008.
- Luker G D, Luker K E, *Optical Imaging: Current Applications and Future Directions*. J Nucl Med 49 (1) (2008).
- Magdassi S, Frenkel M, Garti N, et al., *Multiple emulsions II-HLB shift caused by emulsifier migration to the external interface*, J Coll Interf Sci 97 (1984) 374–379.
- Magdassi S, Garti N, *A kinetic model for release of electrolytes from w/o/w multiple emulsions*, J Control Rel 3 (1986) 273–277.
- Maharramov A B, Alieva I N, Abbassova G D, et al., *Iron oxide nanoparticles in drug delivery systems*. Dig J Nanom and Biostr 6 (2011) 419-431.
- Mainardes RM, Evangelista RC, *PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution*. Int J Pharm 290 (2005) 137-144.

- Maksym V Yezhelyev, Xiaohu Gao, Yun Xing, Ahmad Al-Hajj, Shuming Nie, Ruth M O'Regan
- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM, *Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer*. Trends Pharmacol Sci 30 (11) (2009).
- Matutes E, Attygalle A, Wotherspoon A, et al., *Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)*, Best Pract Res Clin Haem 23 (2010) 3–20.
- Mehta R C, Jeyanthi R, Calis S, et al., *Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drugs*. J. Control Rel 29 (1994) 375-384.
- Memisoglu E, Bochot A, Ozalp M, et al., *Direct formation of nanospheres from amphiphilic beta-cyclodextrin inclusion complexes*. Pharm Res 20 (2003) 117-25.
- Michaelis M, Rothweiler F, Klassert D, et al., *Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3*. Canc Res 69(2) (2009) 416-421.
- Mishra B, Patel B B, Tiwari S, *Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery*. Nanomed 6 (2010) 9-24.
- Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, et al., *Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo*. J Control Rel 119 (1) (2007) 77–85.
- Nasongkla N, Bey E, Ren J, et al., *Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems*. Nano Lett 6 (2006) 2427–2430.
- Niu G, Chen X, *The Role of Molecular Imaging in Drug Delivery*. Del Mol Im 2009 109-113.
- Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R, *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging*. Eur Radiol 13 (2003) 195–208.
- Oppenheim R C, *Solid colloidal drug delivery systems: nanoparticles*. Int J Pharm 8 (1981) 217–234.
- Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, et al., *13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors*. Blood 13 115(19) (2010) 3916-3922.
- Panyam J, Sahoo S K, Prabha S, et al., *Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles*. Int J Pharm 262 (2003) 1-11.
- Pardridge W M, *Drug and Gene Delivery to the Brain: The Vascular Route*. Neuron 36 (2002) 555–558.
- Parhi P, Mohanty C, Sahoo S K. *Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy*. Dru Disc Tod 17 (17-18) 2012.
- Parveen S, Misra R, Sahoo S K, *Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging*. Nanomed 8 (2012) 147–166.
- Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, et al., *Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL*. Proc Natl Acad Sci USA 105(50) (2008) 19643-19648.
- Pekarsky Y, Zanesi N, Aqeilan RI, et al., *Animal models for chronic lymphocytic leukemia*. J Cell Biochem 1 100(5) (2007) 1109-1118.

- Pekarsky Y, Zanesi N, Croce C M, *Molecular basis of CLL*, Sem Canc Biol 20 (2010) 370–376.
- Pinto Reis C, Neufeld R J, Ribeiro A J, et al., *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomed: Nanotech Biol Med 2 (2006) 8– 21.
- Popowicz M G, Domling A, Holak T A, *The Structure-Based Design of Mdm2/Mdmx-p53 Inhibitors Gets Serious*. Chem Int Ed 50 (2011) 2680 – 2688.
- Prabha S, Zhou W Z, Panyam J, et al., *Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection studies with fractionated nanoparticles*. Int J Pharm 244 (2002) 105-115.
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, et al., *Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*. Drug Dev Ind Pharm 24(12) (1998) 1113-28.
- Rabinow B E, *Nanosuspension in drug delivery*. Nat Rev 3 (2004) 785-796.
- Rao J R, Geckeler K E, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*, Progr in Polym Sci 36 (2011) 887–913.
- Robak T, Kasznicki M, *Alkylating agents and nucleoside analogues in the treatment of B cell chronic lymphocytic leukemia*. Leu 16(6) 2002 1015-1027.
- Robak T, *Therapy of chronic lymphocytic leukemia with purine analogs and monoclonal antibodies*. Transf Apher Sci 32 (2005) 33–44.
- Rudin M, Weissleder R, *Molecular imaging in drug discovery and development*. Nat Rev Drug Discov 2 (2003) 123– 131.
- Sahoo S S, Panyam J, Prabha S, et al., *Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake*. J Cont Rel 28 (2002) 82 105–114.
- Sanchez A, Vila Jato JL, Alonso MJ, *Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporine*. Int J Pharm 99 (1993) 263-73.
- Sansdarp P, Moes A J, *Influence of additives on the release profiles of nifedipine from poly(D,L-lactide,co-glycolide) microspheres*. J. Microenc. 15 (1998) 545-553.
- Sansdarp P, Moes A J, *Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine form poly(D,L-lactide,co-glycolide) microspheres*. Int J Pharm 98 (1993) 157-164.
- Schaffazick S R, Pohlmann A R, Dalla-Costa T, et al., *Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study*. Eur J Pharm Biopharm 56 (2003) 501–506.
- Secchiero P, Barbarotto E, Tiribelli M, et al., *Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3 in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)*. Blood 107(10) (2006) 4122-4129.
- Seifriz W, *Studies in emulsions. III. Double reversal of oil emulsions occasioned by the same electrolyte*, J Phys Chem 29 (1925) 738.

- Shakesheff K M, Evora C, Soriano I I, et al., *The adsorption of poly (vinyl alcohol) to biodegradable microparticles studied by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)*, J Colloid Interf Sci 185 (2) (1997) 538–547.
- Shangary S, Wang S, *Small-Molecule Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction to Reactivate p53 Function: A Novel Approach for Cancer Therapy*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 49 (2009) 223–241.
- Song C X, Labhasetwar V, Murphy H, et al., *Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery*. J Control Rel 43 (1997) 197-212.
- Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R, et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. J Control Rel 70 (2001) 1–20.
- Staros J V, Wright R W, Swingle D M, *Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions*. Analyt Bio 156(1) (1986) 220-222.
- Suzuki K, Price J C, *Microencapsulation and dissolution properties neuroleptic in a biodegradable polymer (poly-D,L-lactide)*. J. Pharm. Sci., 1985, 74, 21-24.
- Tewes F, Munnier E, Antoon B, et al., *Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods*. Eu J Pharm and Biopharm 66 (2007) 488-492.
- Tice TR, Gilley RM, *Preparation of injectable controlled-release microcapsules by solvent-evaporation process*. J Con Rel 2 (1985) 343-352.
- Tobio M, Gref, R, Sánchez A, et al., *Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration*. Pharm Res 15 (1998) 270–275.
- Tosi G, Costantino L, Rivasi F, et al., *Glycopeptide-decorated nanoparticles as drug carriers for CNS: effects of surface coverage and carbohydrate type*. J Nanoneu 1 (2) (2009) 152-157.
- Tosi G, Costantino L, Rivasi F, et al., *Targeting the central nervous system: In vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123*. J Cont Rel 122 (2007) 1–9.
- Tosi G, Fano RA, Bondioli L, et al., *Investigation on mechanisms of glycopeptide nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier*. Nanomed 6 (2011) 423-436.
- Tosi G, Rivasi F, Gandolfi F, et al., *Conjugated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for the preparation of in vivo detectable nanoparticles*. Biomat 26 (2005) 4189–4195.
- Tosi G, Vergoni A V, Ruozi B, *Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: In vivo pharmacological evidence and biodistribution*. J Contr Rel 145 (2010) 49-57.
- Ueda H, Kreuter J, *Optimization of the preparation of loperamideloaded poly (l-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification solvent evaporation*. J Microencapsul 14 (1997) 593-605.
- Van der Graaf S, Schroen C H P H, Boom R M. *Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review*. J Membr Sci. 251 (2005) 7–15.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. Sci 303 (5659) (2004) 844-848.

Vergoni A V, Tosi G, Tacchi R, et al., *Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution*. *Nanomed: Nanotechn, Biol, Med* 5 (2009) 369–377.

Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, et al., *Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26) (1994) 12530-12534.

Wakiyama N, Juni K, Nakano M, *Influence of physiochemical proprieties of poly(lactic acid) on the characterization and in vitro release patterns of poly(lactic acid) microspheres containing local anesthetics*. *Chem Pharm Bull* 30 (1982) 2621-2628.

Wakiyama N, Juni K, Nakano M, *Preparation and evaluation in vitro and in vivo of poly(lactic acid) microspheres containing dibucaine*. *Chem Pharm Bull* 30 (1982) 3719-3727.

Wang H, Chen K, Cai W, et al., *Integrin-targeted imaging and therapy with RGD4C-TNF fusion protein*. *Mol Cancer Ther* 7 (2008)1044–1053.

Weng KC, Noble CO, Papahadjopoulos-Sternberg B, et al., *Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo*. *Nano Lett* 8 (2008) 2851–2857.

Wu L, Jian Zhang, J, Watanabe W, *Physical and chemical stability of drug nanoparticles*. *Advanced drug delivery reviews*, 63(6) (2011) 456-469.

Xu Z, Pilch DS, Srinivasan AR, et al., *Modulation of nucleic acid structure by ligand binding induction of a DNA-RNA-DNA hybrid triplex by DAPI intercalation*. *Bioorg Med Chem* 5 (1997) 1137–1147.

Yezhelyev M V, Gao X, Xing Y, et al., *Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer*. *Lanc Oncol* 7 (2006) 657–667.

Zambaux M F, Bonneaux F, Dellacherie E, et al., *Dosage de l'alcool polyvinylique re'siduel dans les microspheres de copolymere lactique glycolique*. *Proceed 8th Journ Ref Scientif du GTRV Nancy* (1993).

Zambaux M F, Bonneaux F, Gref R, et al., *Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method*. *J Contr Rel* (50) (1998) 31-40.