



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Dottorato in Scienze molecolari e biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STeBiCeF)
CHEM-08/A

SVILUPPO DI CARRIER POLIMERICI NANOSTRUTTURATI PER LA SOMMINISTRAZIONE INALATORIA DI SORAFENIB NEL TRATTAMENTO LOCALE DEL CARCINOMA POLMONARE

IL DOTTORE
Federico Corsaro

IL COORDINATORE
Prof. Giovanna Pitarresi

IL TUTOR
Prof. Gennara Cavallaro

CO-TUTOR
Prof. Emanuela F. Craparo
Dott.ssa Cinzia Scialabba

CICLO 38°
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2025.

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	3
1.1.IL CARCINOMA POLMONARE	3
1.2.TERAPIA CONVENZIONALE	16
1.3.VIA DI SOMMINISTRAZIONE INALATORIA: VANTAGGI E PROSPETTIVE	25
1.4.NANOMEDICINA.....	36
2.SCOPO DELLA TESI.....	56
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	62
3.MICELLE POLIMERICHE A BASE DI INULINA (INU).....	62
3.1.SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL INU-EDA-C8-PEG	62
3.2.CONCENTRAZIONE DI AGGREGAZIONE CRITICA (CAC)	67
3.3.PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE MICELLE DI INU-EDA-C8-PEG	69
3.4.STUDI DI RILASCIO.....	71
3.5.INTERAZIONE CON LA MUCINA.....	73
3.6.ANDERSEN CASCADE IMPACTOR.....	76
3.7.STUDI DI CITOTOSSICITÀ	77
3.8.CONCLUSIONI	80
4.MICROPARTICELLE INALABILI DI TIPO NANO into MICRO PER LA SOMMINISTRAZIONE POLMONARE E IL DIREZIONAMENTO DI Sor AL CANCRO POLMONARE.....	81
4.1.SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COPOLIMERO GRAFT PHEA-g-PLGA-g- PEG-FA	82
4.2.PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE DI PHEA-g- PLGA-g-PEG-FA (FA-PPP-NPs)	86
4.3.STUDI DI RILASCIO.....	87
4.4.INTERAZIONE CON LA MUCINA.....	89
4.5.STUDI DI CITOTOSSICITÀ	90
4.6.TEST DI INIBIZIONE DEL RECETTORE PER IL FOLATO	94
4.7.UPTAKE DELLE NANOPARTICELLE	94
4.8.SCRATCH TEST	96
4.9.PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MICROPARTICELLE.....	98
4.10.CONCLUSIONI	107
PARTE SPERIMENTALE	109
5.MICELLE POLIMERICHE A BASE DI INULINA (INU).....	109
5.1.MATERIALI E METODI	109
5.2.SINTESI DEL COPOLIMERO INU-EDA-C8-PEG	110
5.3.DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI AGGREGAZIONE CRITICA (CAC)	114
5.4.PRODUZIONE MICELLE DI INU-EDA-C8-PEG@Sor	115
5.5.ANALISI DIMENSIONALE E POTENZIALE Z.....	115

5.6.DETERMINAZIONE DELLA DRUG LOADING (DL%) E DELL'EFFICIENZA DI INCAPSULAZIONE (EE%).....	116
5.7.STUDI DI RILASCIO.....	116
5.8.INTERAZIONE CON LA MUCINA.....	117
5.9.VALUTAZIONE PENETRAZIONE DELLA MUCINA TRAMITE LA CELLA DI FRANZ	118
5.10.ANDERSON CASCADE IMPACTOR (ACI).....	119
5.11.CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA	120
5.12.VITALITÀ SULLE CELLULE 16 HBE E A549	120
6. MICROPARTICELLE INALABILI DI TIPO NANO into MICRO PER LA SOMMINISTRAZIONE POLMONARE E IL DIREZIONAMENTO DI Sor AL CANCRO POLMONARE.....	122
6.1.MATERIALI E METODI	122
6.2.SINTESI DEL COPOLIMERO PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA	123
6.3.PRODUZIONE DI NANOPARTICELLE DI PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA	127
6.4.ANALISI DIMENSIONALE E POTENZIALE Z.....	127
6.5.INTERAZIONE CON LA MUCINA.....	127
6.6.DETERMINAZIONE DELLA DRUG LOADING (DL%) E DELL'EFFICIENZA DI INCAPSULAZIONE (EE%).....	128
6.7.STUDI DI RILASCIO.....	129
6.8.CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA	129
6.9.CITOTOSSICITÀ CELLULARE	130
6.10.UPTAKE SULLE CELLULE A549	130
6.11.SCRATCH TEST	131
6.12.PRODUZIONE DELLE MICROPARTICELLE E NiM.....	132
6.13.MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)	134
6.14.DENSITA TAPPED	134
6.15.ANDERSEN CASCADE IMPACTOR (ACI).....	135
6.16.ANALISI REOLOGICA	136
7.BIBLIOGRAFIA	137

1.INTRODUZIONE

1.1.IL CARCINOMA POLMONARE

Il carcinoma polmonare rappresenta attualmente una delle principali cause di mortalità oncologica a livello globale, costituendo un rilevante problema di salute per incidenza, per difficoltà diagnostiche e per limitate prospettive terapeutiche in stadi avanzati [1].

L'eziopatogenesi del carcinoma polmonare è complessa e multifattoriale. Il principale fattore di rischio è rappresentato dal fumo di sigaretta, ma anche l'esposizione ad agenti ambientali cancerogeni, tra cui il gas radon, l'amianto, il benzene, i metalli pesanti e le polveri sottili, è implicata in maniera significativa soprattutto nei contesti ad alta densità abitativa e industriale [2], [3]. Inoltre, fattori genetici, epigenetici ed immunologici concorrono alla trasformazione neoplastica delle cellule epiteliali respiratorie, poiché alterano i normali meccanismi di regolazione della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e della riparazione del DNA. Tra le principali alterazioni molecolari del carcinoma polmonare, rivestono particolare importanza le mutazioni attivanti dell'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) [4], [5], dei geni *Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK) e del Protooncogene-1 (ROS1), che attivano costitutivamente le vie proliferative intracellulari [6], [7]. Frequenti negli adenocarcinomi sono anche le mutazioni del *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), considerate a prognosi sfavorevole e, fino a poco tempo fa, prive di opzioni terapeutiche mirate [8], [9].

Dal punto di vista morfologico, il carcinoma polmonare non costituisce un'entità unica, ma piuttosto un gruppo eterogeneo di neoplasie con caratteristiche istologiche, biologiche e comportamentali differenti [10].

1.1.1. CLASSIFICAZIONE MORFOLOGICA DEL CARCINOMA POLMONARE

Attualmente alla base delle caratteristiche morfologiche si identificano il carcinoma polmonare a piccole cellule (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC) ed il carcinoma polmonare a non piccole cellule (*Non Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) (**Fig.1**).

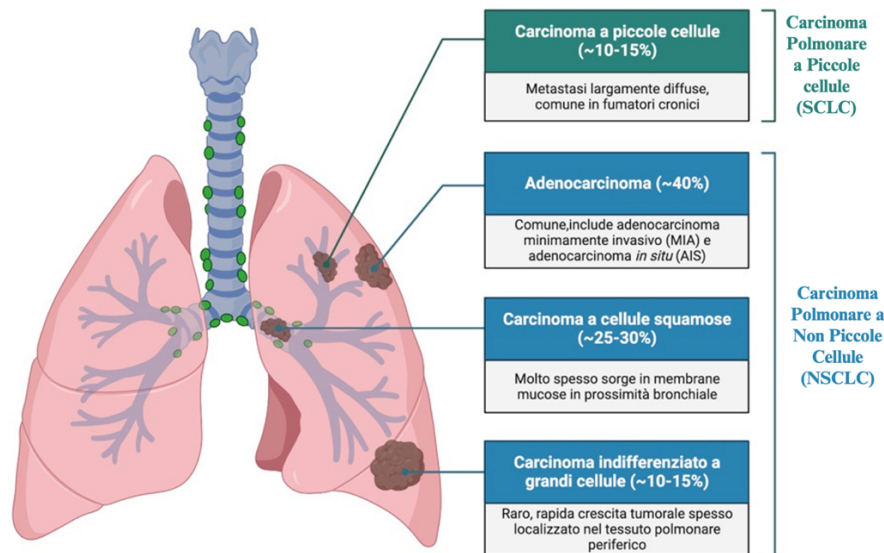


Fig.1.: Classificazione del carcinoma polmonare (prodotta con Biorender)

Il SCLC rappresenta la forma istologica meno frequente tra le neoplasie polmonari (incidenza pari al 10-15%), caratterizzato da una crescita delle cellule epiteliali bronchiali estremamente rapida, da una elevata frazione mitotica e da una spiccata tendenza alla diffusione metastatica precoce sia linfatica che ematogena [11]. Dal punto di vista eziologico, il SCLC è fortemente associato al fumo di tabacco, manifestandosi quasi esclusivamente in pazienti con una storia di esposizione cronica e prolungata al fumo [12]. Una delle peculiarità dello SCLC è la sua aggressività clinica: infatti, alla diagnosi, la maggior parte dei pazienti presenta già una malattia avanzata o estesa, con frequente interessamento metastatico a livello

epatico, osseo, surrenalico e cerebrale per questo associato ad un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 7%, [13], [14].

Il NSCLC rappresenta la forma istologica più comune di neoplasia polmonare [15], caratterizzato da una crescita relativamente più lenta ed una maggiore eterogeneità molecolare e istopatologica. Il NSCLC è suddiviso in tre sottotipi principali sulla base delle caratteristiche morfologiche e sede di insorgenza:

- Carcinoma polmonare a cellule squamose (*Squamous Cell Lung Carcinoma*, SQCLC), caratterizzato da una proliferazione di cellule epiteliali maligne con differenziazione squamosa. Origina prevalentemente a livello dei bronchi centrali e mostra un comportamento localmente invasivo, con sintomi respiratori frequenti e marcati, come tosse cronica, emottisi, dispnea e ostruzione bronchiale. La diagnosi precoce può risultare difficile, data la tendenza iniziale a rimanere confinato nelle strutture endobronchiali [16].
- Adenocarcinoma (AdenoCA). Rappresenta il sottotipo più frequente (40% dei casi), specialmente tra non fumatori, donne e soggetti in età relativamente giovane. Origina nelle vie aeree periferiche da pneumociti di tipo II ed è associato a mutazioni oncogeniche specifiche, quali quelle nei geni EGFR, ALK, ROS1 e KRAS. L'AdenoCA ha una tendenza marcata alla metastatizzazione precoce con frequente coinvolgimento di ossa, fegato e sistema nervoso centrale. Per via della sua localizzazione periferica, nelle fasi iniziali i sintomi possono essere assenti o aspecifici [17], [18].
- Carcinoma polmonare a grandi cellule (*Undifferentiated Large Cell Carcinoma*, ULCC), caratterizzato da cellule tumorali grandi, disomogenee

e prive di caratteristiche squamose o ghiandolari definite. Ha una localizzazione mediastinica e un comportamento clinico aggressivo, similmente al SCLC. La diagnosi è spesso tardiva e la prognosi risulta generalmente sfavorevole, anche a causa della scarsa risposta alle terapie convenzionali [19].

La stadiazione del tumore, essenziale per la strategia terapeutica e per la valutazione prognostica del paziente [20], viene effettuata con il sistema TNM attualmente riconosciuto a livello internazionale dalla comunità oncologica, che si basa sul parametro T (tumore), che valuta le dimensioni del tumore primitivo, la sua estensione locale e l'eventuale infiltrazione delle strutture contigue; sul parametro N (nodi), che considera il grado di coinvolgimento linfonodale regionale, e infine, sul parametro M (metastasi), che identifica la presenza di metastasi a distanza, definendone la localizzazione e l'estensione [20], [21].

L'applicazione di questi criteri consente di classificare il NSCLC in stadi clinici progressivi, da I a IV, ciascuno con precise implicazioni terapeutiche e prognostiche. La stessa classificazione non può essere effettuata per il SCLC, per il quale si utilizza una classificazione più semplificata, che fa una distinzione tra malattia limitata, confinata a un emitorace e trattabile con un unico campo di radioterapia, e malattia estesa, caratterizzata da diffusione extrapolmonare o bilaterale, che esclude la possibilità di trattamento loco-regionale unificato [22].

1.1.2.ALTERAZIONI FISIO-ANATOMICHE DEL POLMONE

Il tumore polmonare induce profonde alterazioni del parenchima polmonare, compromettendo in maniera significativa la funzionalità respiratoria. Dal punto di

vista anatomico, la proliferazione delle cellule neoplastiche determina la formazione di masse tumorali solide, che possono interessare sia il parenchima alveolare che le vie aeree di calibro variabile, causando ostruzione bronchiale, compressione dei bronchi adiacenti ed ipoventilazione dei distretti polmonari coinvolti [23]. La distruzione dell'architettura alveolare comporta la perdita della superficie di scambio gassoso e la formazione di tessuto fibrotico che aumenta la resistenza delle vie aeree periferiche [24], [25]. Inoltre, l'attivazione del processo di angiogenesi a livello tumorale porta ad un'alterazione del microcircolo polmonare, determinando spesso fenomeni di ipertensione polmonare locale e di disfunzione endoteliale [26], [27]. A livello fisiologico, questi cambiamenti strutturali si traducono in una compromissione della ventilazione e della perfusione polmonare, che causano inefficienza negli scambi di ossigeno ed anidride carbonica [28], [29]. La risposta infiammatoria cronica, indotta dall'interazione tra cellule tumorali e microambiente polmonare, promuove un rilascio persistente di mediatori proinfiammatori e profibrotici, favorendo la fibrosi interstiziale ed il rimodellamento tissutale [30], [31]. Clinicamente, tali alterazioni si manifestano con sintomi quali dispnea progressiva, tosse cronica, emottisi e riduzione della capacità di scambio gassoso che riflettono un deterioramento funzionale correlato all'estensione e alla localizzazione della massa tumorale [25].

1.1.3. CRESCITA DELLA MASSA TUMORALE

La crescita del carcinoma polmonare presenta tre fasi principali: iniziazione, progressione e proliferazione, caratterizzate da interazioni dinamiche e interdipendenti tra cellule tumorali e microambiente che portano a un ecosistema

complesso, eterogeneo e altamente adattivo [19] (**Fig.2**). L'intero processo è scandito da una complessa co-evoluzione tra le cellule maligne ed il microambiente che si trasforma da semplice tessuto di supporto a vera e propria componente funzionale del tumore.

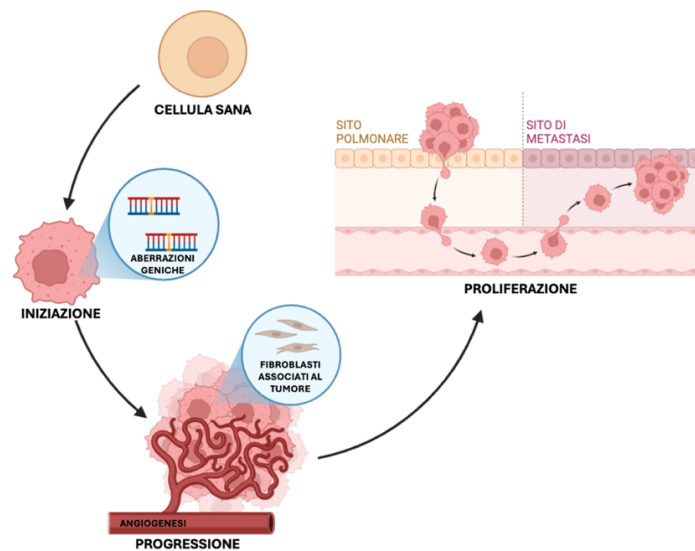


Fig.2: Descrizione grafica della stadiazione del carcinoma polmonare (prodotta con biorender).

Fase di iniziazione. Il processo inizia a causa di mutazioni genetiche e alterazioni epigenetiche in cellule progenitrici epiteliali dell'albero respiratorio, sia a livello bronchiale (tipico dell'AdenoCA e del SQCLC), sia a livello alveolare (in particolare nel SCLC) [32], [33], che determinano l'iperespressione dei geni oncogeni come KRAS ed EGFR [34]. In questa fase iniziale, la cellula trasformata acquisisce capacità proliferative anomale, perde la sensibilità ai segnali apoptotici e sviluppa meccanismi di evasione immunitaria. Sebbene ancora confinato, il clone mutato recluta e attiva fibroblasti e cellule immunitarie residenti, ed inducendo una riorganizzazione precoce della matrice extracellulare (ECM), con iniziale deposizione aberrante di collagene e fibronectina [35], [36].

Fase di progressione. In questa fase, il carcinoma polmonare acquisisce caratteristiche fenotipiche che ne aumentano l'aggressività, instaurando un'interazione più stretta con il microambiente circostante [37]. I fibroblasti associati al cancro (CAFs) producono fattori di crescita (Transforming Growth Factor beta (TGF- β), Fibroblast Growth Factor (FGF)) e citochine infiammatorie, conferendo alle cellule tumorali una maggiore capacità di movimento, plasticità e resistenza alle terapie. Contemporaneamente, inizia anche un processo di angiogenesi aberrante, legato alla crescente ipossia nel tessuto tumorale [38], [39], [40], e si attiva un processo di immunosoppressione [41], [42].

Fase di proliferazione e consolidamento. Nella fase di proliferazione, la massa tumorale si espande rapidamente, invadendo strutture adiacenti ed acquisendo competenze metastatiche [43], [44]. La matrice extracellulare si altera, facilitando la migrazione cellulare e la disseminazione ematica e linfatica [45]. Le cellule tumorali esprimono fenotipi altamente invasivi, che producono lattato con conseguente acidificazione del microambiente e inibizione funzionale delle cellule immunitarie infiltranti [46]. In questo contesto, il tumore si consolida come un ecosistema altamente strutturato, autonomo e capace di resistere ai trattamenti sistemici [31].

1.1.4.ALTERAZIONE DEL MICROAMBIENTE TUMORALE

Durante la fase di crescita del carcinoma polmonare, il microambiente tumorale subisce una complessa riorganizzazione che supporta la proliferazione incontrollata per la sopravvivenza, la progressione e la diffusione metastatica delle cellule neoplastiche [31], [47]. Uno degli eventi biologici centrali di questa fase è

l'angiogenesi tumorale, indotta principalmente dal VEGF, dal Fibroblast Growth Factor (FGF) e dal Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) [48], [49], che dà origine a una rete vascolare aberrante, caratterizzata da strutture disorganizzate, permeabili e funzionalmente inefficienti, generando un microambiente ipossico e acido. Tali condizioni selezionano cloni cellulari più adattabili e aggressivi, stimolano l'espressione di geni correlati alla sopravvivenza e contribuiscono al reclutamento di macrofagi, i quali promuovono la crescita tumorale tramite la secrezione di fattori immunosoppressivi e citochine pro-tumorali [50], [51].

In parallelo, il carcinoma interagisce attivamente con la componente stromale del microambiente, in particolare con i CAFs, che rilasciano TGF- β , interleuchina-6 (IL-6), chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12), nonché metalloproteasi, che degradano i componenti della matrice extracellulare (MEC) e facilitano la migrazione cellulare, l'invasione tissutale e la formazione di metastasi [47], [52], [53], [54]. La soppressione della risposta immunitaria rappresenta un altro processo a supporto della progressione tumorale [51], [55].

Inoltre, la dipendenza delle cellule tumorali da specifici substrati metabolici, come il glutammato, consente non solo il soddisfacimento delle richieste energetiche e biosintetiche, ma influenza direttamente il metabolismo delle cellule immunitarie, in particolare delle cellule T effettrici [56]. Il *crosstalk* tra metabolismo tumorale e immunità sta emergendo come *target* da sfruttare per strategie terapeutiche combinate, soprattutto nel contesto delle immunoterapie [56].

Parallelamente, la secrezione di metalloproteasi ed altri enzimi proteolitici da parte di cellule tumorali e stromali determina un rimodellamento della MEC, stimolando

vie intracellulari che promuovono fenotipi più migratori, invasivi e resistenti ai trattamenti, oltre a contribuire alla plasticità cellulare [31], [52].

Recentemente, è stato compreso il ruolo fondamentale del microbioma polmonare nel rafforzare l'immunosoppressione locale, aprendo nuove prospettive terapeutiche orientate alla modulazione della flora microbica per ristabilire un equilibrio immunitario favorevole alla clearance tumorale [57].

In definitiva, il microambiente tumorale del carcinoma polmonare costituisce un sistema complesso e altamente integrato, in cui componenti cellulari, segnali solubili, vie metaboliche e meccanismi biomeccanici interagiscono sinergicamente per sostenere la crescita, la sopravvivenza e la disseminazione delle cellule neoplastiche.

1.1.5.FORMAZIONI DI METASTASI

La formazione di metastasi rappresenta uno degli eventi più critici nella progressione della malattia e costituisce la principale causa di mortalità associata al cancro. Il processo metastatico comprende diverse fasi interdipendenti, ovvero la dissociazione delle cellule tumorali primarie, la loro intravasazione nei vasi sanguigni o linfatici, la sopravvivenza in circolo, l'extravasazione nei tessuti bersaglio e, infine, la colonizzazione e la proliferazione nel microambiente secondario [58] **(Fig.3)**.

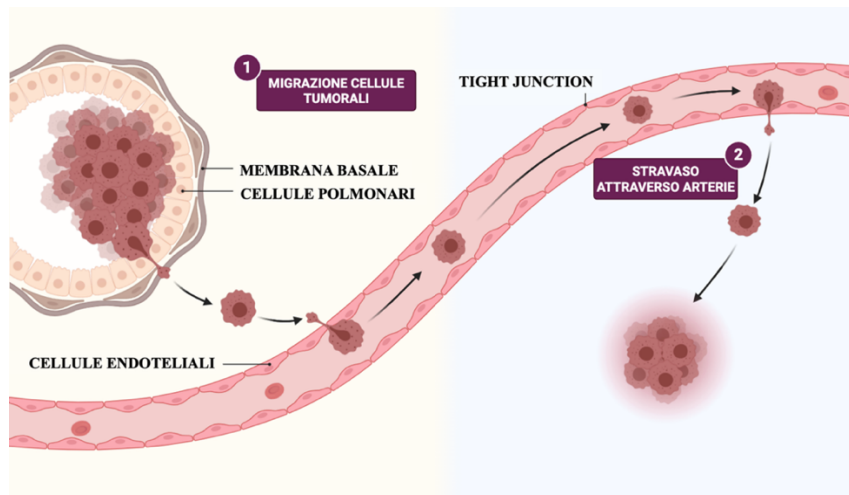


Fig.3: Processo di metastatizzazione e colonizzazione delle cellule tumorali (prodotta con Biorender).

La capacità metastatica è determinata dall'acquisizione da parte delle cellule neoplastiche di proprietà motili, invasive e resistenti all'apoptosi [39], [59]. Inoltre, una volta arrivate nel circolo ematico, le cellule tumorali viaggiano in cluster o protette da piastrine che formano un rivestimento protettivo contro l'attacco immunitario e favoriscono l'adesione endoteliale [60], [61]. Il carcinoma polmonare, a causa della sua ricca vascolarizzazione e dell'accesso diretto al circolo sistemico e linfatico, è caratterizzato da una spiccata propensione metastatica al cervello, con sintomi neurologici focali, alterazioni cognitive o crisi epilettiche. La barriera emato-encefalica, sebbene altamente selettiva, può essere attraversata da cloni tumorali dotati di meccanismi specifici di adesione e tras migrazione endoteliale [62], [63]. Altra sede comune di metastatizzazione è rappresentata dalle ossa, in particolare vertebre, coste e femori prossimali. Le lesioni osteolitiche o miste sono frequentemente dolorose e predisponenti a fratture patologiche, ipercalcemia e compressioni midollari [64]. Il fegato costituisce un altro sito di

metastatizzazione, in cui le metastasi, spesso silenti nelle fasi iniziali, possono evolvere in insufficienza epatica conclamata. A livello delle ghiandole surrenali, le metastasi possono provocare insufficienza corticosurrenalica acuta con implicazioni cliniche urgenti [58], [65]. Più raramente, il carcinoma polmonare può metastatizzare in organi atipici quali cute, reni, pancreas e tratto gastrointestinale, eventi che spesso si correlano a fenotipi tumorali particolarmente aggressivi o ad alterazioni genetiche specifiche [58].

Nel complesso, la disseminazione metastatica del carcinoma polmonare non è un fenomeno casuale ma risponde a logiche biologiche precise, influenzate da fattori intrinseci del tumore, da condizioni del microambiente secondario e da interazioni dinamiche tra cellula tumorale e sistema immunitario [44].

1.1.6.FATTORI PREDISPONENTI O CHE CAUSANO IL CARCINOMA POLMONARE

Il carcinoma polmonare è una neoplasia eterogenea la cui insorgenza può scaturire anche da condizioni patologiche preesistenti, come malattie infiammatorie croniche o condizioni fibrotiche del parenchima polmonare che, attraverso l'alterazione dell'omeostasi tissutale, promuovono instabilità genomica, proliferazione aberrante e resistenza cellulare all'apoptosi [33], [66]. D'altro canto, il carcinoma polmonare può indurre numerose patologie secondarie attraverso meccanismi sistemici e paraneoplastici, contribuendo significativamente alla morbidità e mortalità del paziente [67].

Tra le principali condizioni patologiche che predispongono allo sviluppo del carcinoma polmonare, schematizzate in **Tab.1**, si includono:

- Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), che crea un microambiente infiammatorio cronico, caratterizzato da stress ossidativo, rimodellamento delle vie aeree e alterazione dell'immunità locale [68];
- Fibrosi polmonare idiopatica (IPF), che a causa della continua riparazione tissutale, della fibrosi progressiva e della proliferazione epiteliale disordinata, crea un ambiente favorevole alla selezione clonale di cellule neoplastiche [69];
- Tubercolosi polmonare, causata dall'infezione cronica da *Mycobacterium tuberculosis*, che induce infiammazione persistente e danno cronico al parenchima polmonare [70];
- Asbestosi e pneumoconiosi, causate dall'inalazione cronica di particelle inorganiche (come amianto o silice), che inducono danno cellulare diretto, stress ossidativo e attivazione di macrofagi, portando ad una risposta infiammatoria cronica e persistente [71];
- Malattie autoimmuni sistemiche (es. sclerodermia, lupus eritematoso sistemico), che possono aumentare il rischio neoplastico polmonare attraverso l'infiammazione cronica tissutale e l'impiego di terapie immunosoppressive che alterano i meccanismi di sorveglianza immunitaria.

Tab.1: Patologie che possono originare il carcinoma polmonare.

CONDIZIONE	MECCANISMI PATOGENETICI
BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA (BPCO)	Infiammazione cronica, stress ossidativo, rimodellamento delle vie aeree, immunità locale alterata; il fumo è cofattore
FIBROSI POLMONARE IDIOPATICA (IPF)	Fibrosi progressiva, proliferazione epiteliale disordinata, riparazione tissutale continua
TUBERCOLOSI POLMONARE	Infiammazione granulomatosa cronica, rilascio di citochine (IL-6, TNF- α), danno cronico al parenchima
ASBESTOSI E PNEUMOCONIOSI	Inalazione cronica di fibre (amianto, silice), danno cellulare diretto, stress ossidativo, attivazione macrofagica
MALATTIE AUTOIMMUNI SISTEMICHE (ES. LES, SCLERODERMIA)	Infiammazione tissutale cronica, terapie immunosoppressive → alterata sorveglianza immunitaria

Parallelamente, il carcinoma polmonare può determinare una vasta gamma di patologie secondarie, , ovvero **(Tab.2)**:

- Sindrome della vena cava superiore, causata dalla compressione o infiltrazione tumorale del vaso con conseguente edema cervicofacciale, ingorgo venoso e dispnea [72];
- Versamento pleurico neoplastico, che deriva dalla diffusione tumorale alla pleura viscerale e parietale, determinando progressiva dispnea;
- Sindrome paraneoplastica, cioè gruppo eterogeneo di manifestazioni sistemiche non attribuibili direttamente al tumore, tra cui: ipercalcemia, sindrome di Cushing ectopica, neuropatie periferiche ed encefaliti [73];
- Trombosi venosa profonda ed embolia polmonare, che possono manifestarsi precocemente nella storia clinica del paziente oncologico [74];
- Insufficienza respiratoria, dovuta nelle fasi avanzate di malattia dall'ostruzione bronchiale, dall'estensione tumorale e dalle infezioni [68].

Tab.2: Patologie che possono originare dal carcinoma polmonare.

CONDIZIONE	MECCANISMI PATOGENETICI
SINDROME DELLA VENA CAVA SUPERIORE	Compressione/infiltrazione tumorale del vaso → edema cervicofacciale, dispnea
VERSAMENTO PLEURICO NEOPLASTICO	Diffusione alla pleura viscerale/parietale → dispnea, richiede toracentesi o drenaggio
SINDROME PARANEOPLASTICA	Manifestazioni sistemiche: ipercalcemia (PTHrP), Cushing ectopico (ACTH), sindrome Lambert-Eaton, neuropatie
TROMBOSI VENOSA PROFONDA / EMBOLIA POLMONARE	Stato protrombotico paraneoplastico, può insorgere precocemente
INSUFFICIENZA RESPIRATORIA	Ostruzione bronchiale, invasione parenchimale estesa, infezioni opportunistiche → deterioramento respiratorio

In conclusione, il carcinoma polmonare è interconnesso con numerose patologie sia come esito finale di un terreno patologico preesistente, sia come causa di condizioni cliniche secondarie che aggravano il decorso e la gestione della malattia.

1.2.TERAPIA CONVENZIONALE

Nel carcinoma polmonare, chemioterapia e immunoterapia sistemica sono l'unica opzione terapeutica per il controllo della malattia, in particolare nei pazienti con malattia localmente avanzata o metastatica non candidabili a terapie a bersaglio molecolare per assenza di mutazioni [75].

La chemioterapia si avvale di agenti citotossici che interferiscono con processi cellulari fondamentali, come sintesi e riparazione del DNA, mitosi e funzionalità dei microtubuli, con l'obiettivo di danneggiare le cellule tumorali e indurne l'apoptosi [76].

1.2.1.TERAPIA ANTITUMORALE PER IL TRATTAMENTO DI NSCLC

Nel NSCLC, la prima linea terapeutica prevede l'impiego di derivati del platino (cisplatino, carboplatino), che formano legami covalenti con il DNA ostacolandone la replicazione [77]. Questi farmaci vengono associati ad altri agenti in base all'istotipo (adenoCA, squamoso, a grandi cellule) ed alle condizioni cliniche del paziente.

In particolare, si utilizzano:

- Pemetrexed, antimetabolita che inibisce l'attività enzimatica cardine nel processo della sintesi nucleotidica [78];
- Taxani (paclitaxel, docetaxel), che stabilizzano i microtubuli arrestando la mitosi [79];
- Gemcitabina, analogo della deossicitidina, che interferisce con la sintesi del DNA [78];
- Vinorelbina, che inibisce la formazione del fuso mitotico [80].

In molti casi, la terapia di prima linea non è risolutiva e risulta necessario intraprendere terapie di seconda e terza linea [81].

In assenza di specifiche mutazioni, la seconda linea prevede docetaxel o pemetrexed. Recentemente, grazie alla tipizzazione del paziente, l'immunoterapia con nivolumab, atezolizumab e durvalumab, ha dimostrato un beneficio significativo in sopravvivenza con una tollerabilità superiore rispetto ai chemioterapici convenzionali [81], [82].

Quando la malattia oncologica progredisce, nonostante i trattamenti di prima e seconda linea, si ricorre alla cosiddetta terza linea terapeutica, in cui si impiegano farmaci chemioterapici alternativi oppure terapie mirate, progettate per agire su

specifici bersagli molecolari presenti nelle cellule tumorali, con l'obiettivo di rallentare l'evoluzione della malattia e migliorare la qualità di vita del paziente. Un esempio è rappresentato dai tumori con mutazione T790M del recettore EGFR, in questi casi si ricorre all'impiego di osimertinib. [83].

Un altro farmaco impiegato nella terza linea di trattamento è il sorafenib (Sor), un inibitore multichinasico che ha suscitato grande interesse per il suo meccanismo d'azione; esso agisce su diverse vie di segnalazione coinvolte nella crescita tumorale e nella formazione di nuovi vasi sanguigni, bloccando le chinasi RAF, il *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR) e il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGFR). Sebbene non approvato come terapia standard per il NSCLC, Sor, è stato sperimentato in studi clinici su pazienti pretrattati, soprattutto in terza linea o in combinazione con altri farmaci, dimostrando un'attività antitumorale significativa soprattutto nei tumori con alta angiogenesi o mutazioni KRAS [84], [85].

Le terapie di terza linea rappresentano quindi una sfida clinica in continua evoluzione. La scelta del trattamento si basa su una nuova caratterizzazione molecolare della neoplasia (mediante biopsie tissutali o liquide), alla ricerca di mutazioni emergenti o meccanismi di resistenza [86]. In assenza di target identificabili, le opzioni includono farmaci multitarget come il Sor o la reintroduzione della chemioterapia nei pazienti con buone condizioni generali. In **Tab.3**, sono indicati i farmaci in base alla priorità di utilizzo nel NSCLC.

Tab.3: Classificazione dei farmaci usati nel trattamento del NSCLC.

LINEA	FARMACI	MECCANISMO D'AZIONE	INDICAZIONI/NOTE
PRIMA LINEA	Derivati del platino (cisplatino, carboplatino)	Legami covalenti col DNA → inibizione replicazione	Base della terapia; combinati con altri in base all'istotipo
	Pemetrexed	Antifolato → blocco sintesi nucleotidi	Solo in istotipi non squamosi
	Taxani (paclitaxel, docetaxel)	Stabilizzazione microtubuli → arresto mitosi	Utilizzati nei tumori squamosi e non squamosi
	Gemcitabina	Analogo deossicitidina → inibizione sintesi DNA	Associata a derivati del platino
	Vinorelbina	Inibizione fuso mitotico	Alternativa valida nei pazienti anziani o con comorbidità
SECONDA LINEA	Docetaxel / Pemetrexed	Come sopra	Storicamente impiegati in assenza di mutazioni target
	Immunoterapia: nivolumab, atezolizumab, durvalumab	Inibitori checkpoint immunitari (PD-1/PD-L1)	Scelta preferenziale oggi in pazienti senza mutazioni target
	EGFR+ (mut. T790M): osimertinib	Inibitore tirosin-chinasico di 3 ^a generazione	Specifico per mutazione di resistenza T790M
	EGFR+ senza T790M o esaurite opzioni target	Chemioterapia, inibitori multitarget, trial clinici	Trattamento personalizzato in base a caratteristiche molecolari residue
TERZA LINEA	Sorafenib	Inibitore multichinasico (RAF, VEGFR, PDGFR)	Non standard, ma valutato in trial per NSCLC refrattari, soprattutto con mutazioni KRAS o alta angiogenesi
	Altre opzioni	Chemioterapia reintrodotta, farmaci multitarget, studi clinici	Scelte guidate da nuova caratterizzazione molecolare (biopsie liquide/tissutali)

1.2.2.TERAPIA ANTITUMORALE PER IL TRATTAMENTO DEL SCLC

La chemioterapia per il trattamento del SCLC ha dimostrato una buona efficacia nello stadio iniziale della malattia, vista l'elevata aggressività e la rapida diffusione che la caratterizza. Il trattamento standard è basato su etoposide (inibitore della topoisomerasi II) associato a cisplatino o carboplatino [87], [88]. Tuttavia, la durata

della risposta è breve per lo sviluppo precoce di resistenza al chemioterapico [87], [89].

La seconda linea nel SCLC è tradizionalmente rappresentata dal topotecan, che offre un beneficio modesto associato all'elevata tossicità ematologica. Altre alternative comprendono irinotecan, paclitaxel, docetaxel e gemcitabina, indicati soprattutto nelle recidive tardive. Tuttavia, la sopravvivenza mediana rimane bassa, intorno ai 6-7 mesi [87], [88], [89].

Anche per il SCLC il Sor rappresenta una strategia terapeutica potenzialmente valida anche se ancora non inserito tra le terapie di prima scelta [85], [90].

Come terapie di terza linea, l'unica alternativa è la riesposizione a farmaci precedentemente utilizzati e che hanno già avuto una risposta iniziale favorevole, oppure la partecipazione a studi sperimentali con nuovi farmaci immunoterapici o biologici (vedi **Tab.4**) [91].

Indipendentemente dal tipo di tumore o dalla terapia che si sta seguendo, gli agenti citotossici colpiscono indiscriminatamente anche i tessuti sani ad alto turnover cellulare, provocando effetti avversi acuti come mielosoppressione (neutropenia, anemia, trombocitopenia), disturbi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea, mucositi), alopecia e stanchezza intensa [87]. A questi bisogna aggiungere gli effetti tardivi legati alla tossicità cumulativa negli organi, includendo nefrotossicità, ototossicità, neurotossicità periferica e cardiotoxicità, compromettendo in modo permanente la funzionalità degli organi bersaglio e la qualità di vita del paziente [87], [88].

In **Tab.4**, sono riportati in sintesi i farmaci usati in terapia per il trattamento di SCLC, il loro meccanismo d'azione e le loro indicazioni cliniche.

Tab.4: Classificazione dei farmaci usati nel trattamento del SCLC.

LINEA	FARMACI	MECCANISMO D'AZIONE	INDICAZIONI/NOTE CLINICHE
PRIMA LINEA	Etoposide + Cisplatino/Carboplatino	Etoposide: inibizione topoisomerasi II Platino: legami col DNA, blocco replicazione	Regime standard; inizialmente efficace, ma con risposte transitorie per sviluppo rapido di resistenze
SECONDA LINEA	Topotecan	Inibitore della topoisomerasi I	Unico farmaco approvato; beneficio limitato con alta tossicità ematologica
	Alternative: irinotecan, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina	Diversi meccanismi (microtubuli, sintesi DNA)	Usati nelle recidive tardive o in pazienti non eleggibili al topotecan
TERAPIE EMERGENTI	Sorafenib	Inibitore multichinasico (RAF, VEGFR, PDGFR)	Sperimentale, non approvato ma promettente in sottogruppi
TERZA LINEA	Riesposizione a farmaci già utilizzati	—	Solo se risposta favorevole iniziale e buone condizioni generali
	Trial clinici (checkpoint inhibitors, anti-BCL2, anti-DLL3, nuove molecole biologiche)	Diversi meccanismi (immunomodulazione, apoptosi, targeting differenziato)	Unica opzione concreta in molti casi; ricerca in continua evoluzione

1.2.3.SORAFENIB

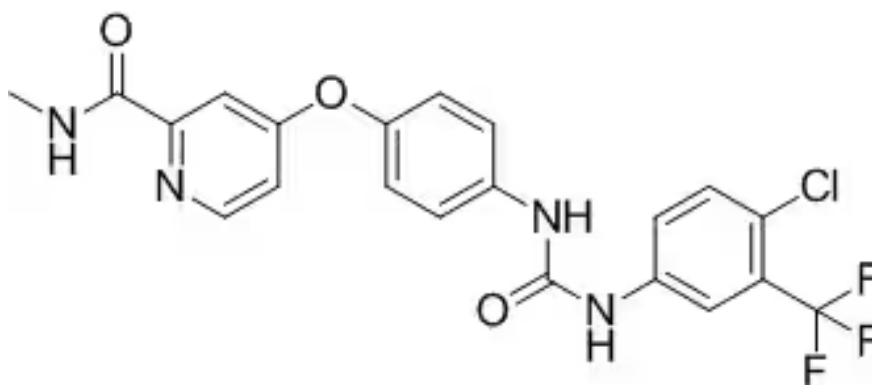


Fig.4: Struttura chimica del Sor.

Il Sor è uno dei farmaci più promettenti tra quelli esplorati nella terapia del carcinoma polmonare (**Fig.4**).

Questo farmaco è un inibitore multichinasico, di formula chimica $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$, appartenente alla classe dei derivati della difenilurea. La sua struttura è caratterizzata dalla presenza di un nucleo difenilico legato a un gruppo costituito da urea sostituita, che consente l'interazione competitiva con il sito di legame dell'ATP di numerose chinasi intracellulari. In particolare, Sor agisce su diverse serina/treonina chinasi, tra cui RAF-1 (CRAF), BRAF e BRAF^{V600E}, e su numerose tirosin-chinasi recettoriali, come VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR- β . Questa duplice attività lo rende un agente terapeutico capace di interferire con i meccanismi di proliferazione tumorale e di angiogenesi, risultando vantaggioso in tumori eterogenei o caratterizzati da vie di segnalazione resistenti agli inibitori selettivi [92]. Dal punto di vista terapeutico, Sor ha ottenuto l'approvazione da parte della FDA per il trattamento di neoplasie solide avanzate, tra cui il carcinoma epatocellulare (HCC), il carcinoma renale a cellule chiare (RCC) e il carcinoma della tiroide differenziato refrattario allo iodio radioattivo, dimostrando una significativa efficacia clinica e prolungando la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da progressione rispetto al placebo o ad altre terapie di confronto.

Nel carcinoma polmonare, soprattutto in stadio avanzato, il Sor ha mostrato una significativa capacità di inibire una via frequentemente attivata in questa neoplasia, ovvero RAS-RAF-MEK-*Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK). In particolare, nei pazienti con tumori difficili da trattare per l'assenza di target farmacologici efficaci, il Sor ha mostrato, in modelli preclinici, una significativa attività antiproliferativa e antiangiogenica. Il meccanismo sembra essere dovuto ad una riduzione della fosforilazione di ERK, dalla soppressione dell'espressione di

VEGF e dall'inibizione della formazione di nuovi vasi nel microambiente tumorale. Inoltre, la sua attività è stata osservata anche in cellule tumorali polmonari resistenti ad altri trattamenti, suggerendo un possibile impiego in pazienti pretrattati o in combinazione con altri agenti terapeutici [93].

A livello clinico, diversi studi di fase I e II, in cui si valutava l'efficacia del Sor in monoterapia o in combinazione con altre molecole nel trattamento di NSCLC avanzato, hanno evidenziato un beneficio in termini di controllo della malattia e di stabilizzazione a breve termine, in particolare in pazienti con progressione del tumore dopo chemio-immunoterapia [92], [94].

Uno dei principali vantaggi del Sor, rispetto alla chemioterapia classica, è il suo profilo di tollerabilità più favorevole. Infatti, gli effetti collaterali del Sor sono generalmente di grado lieve-moderato e includono rash cutaneo, sindrome mano-piede, diarrea ed astenia. Eventi avversi di grado 3 o superiore sono meno frequenti e gestibili attraverso il monitoraggio clinico e l'aggiustamento del dosaggio [92]. Inoltre, il Sor presenta una ridotta mielosoppressione, un vantaggio rilevante per i pazienti oncologici con riserva midollare ridotta o già compromessa da precedenti trattamenti. Un ulteriore vantaggio del Sor è la possibilità di somministrare la terapia oralmente, facilitando la gestione domiciliare del trattamento e migliorando la qualità di vita del paziente [95].

In conclusione, il Sor rappresenta una molecola di interesse rilevante nel trattamento del carcinoma polmonare, grazie ai suoi diversi meccanismi d'azione, alla selettività per vie molecolari frequentemente alterate nel NSCLC e nel SCLC, e ad un profilo di tossicità più lieve rispetto alla chemioterapia tradizionale [92], [96].

1.2.4.IMMUNOTERAPIA

Oltre alla chemioterapia farmacologica, un'altra terapia perseguita nel trattamento del carcinoma polmonare è l'immunoterapia, che si basa sull'uso di anticorpi monoclonali che colpiscono prevalentemente i tumori che presentano un'espressione significativa del ligando PD-L1 prodotto dalle cellule tumorali, bloccandone l'interazione con il recettore espresso dai linfociti T [97], [98]. Questo blocco stimola la risposta immunitaria, consentendo ai linfociti T di riconoscere e attaccare la neoplasia.

Tra gli agenti più studiati e utilizzati nella pratica clinica figurano nivolumab e pembrolizumab (anti-PD-1), atezolizumab e durvalumab (anti-PD-L1). Questi farmaci hanno dimostrato di migliorare la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da progressione, soprattutto nei pazienti naïve al trattamento o in quelli in cui la malattia presenta una recidiva dopo chemioterapia [98], [99], [100]. Tuttavia, la risposta immunoterapica è altamente eterogenea e non sempre prevedibile in base all'espressione di PD-L1, portando alla necessità di individuare biomarcatori più affidabili [101].

Gli effetti collaterali associati all'immunoterapia derivano dall'attivazione aberrante del sistema immunitario contro tessuti sani, determinando eventi avversi immuno-mediati, quali polmoniti autoimmuni, coliti, epatiti, endocrinopatie (tiroiditi, ipofisiti) e manifestazioni cutanee, spesso gestibili con sospensione del trattamento e somministrazione di corticosteroidi ad alte dosi o immunosoppressori di seconda linea (ad esempio, infliximab in caso di colite refrattaria) [101], [102].

1.2.5.VIA DI SOMMINISTRAZIONE PARENTERALE

Un limite condiviso da chemioterapia e immunoterapia è la modalità di somministrazione endovenosa, che comporta implicazioni cliniche, logistiche ed economiche sia per il paziente che per il servizio sanitario nazionale (SSN). Inoltre, i pazienti necessitano di accessi venosi permanenti, esponendosi al rischio di complicanze locali, come flebiti, infezioni, stravasi o trombosi, nonché sistemiche, oltre che a lunghi tempi di infusione ed alla necessità di controlli ematochimici frequenti [103], [104].

In conclusione, pur rappresentando il fulcro dell'approccio farmacologico al carcinoma polmonare, chemioterapia e immunoterapia somministrate per via parenterale presentano criticità sostanziali ovvero, tossicità sistemica, scarsità di selettività e complessità della gestione clinica. Tali limiti hanno stimolato lo sviluppo di strategie terapeutiche alternative, più tollerabili, più selettive e più orientate al paziente. In questo contesto, le vie di somministrazione non invasive, come quella inalatoria, stanno emergendo come opzioni promettenti, in quanto permettono di veicolare il farmaco direttamente al sito tumorale polmonare, con accumulo locale e riduzione dell'esposizione sistemica con un impatto favorevole sul profilo di tossicità, sulla qualità di vita e sulla sostenibilità del trattamento [105], [106], [107].

1.3.VIA DI SOMMINISTRAZIONE INALATORIA: VANTAGGI E PROSPETTIVE

Visti i limiti intrinseci della via di somministrazione parenterale, l'esplorazione di modalità alternative di somministrazione di farmaci per il trattamento del

carcinoma polmonare risulta oggi una necessità imprescindibile. Tra le vie emergenti, la somministrazione inalatoria sta suscitando crescente interesse in quanto, a differenza della via parenterale, consente di veicolare il principio attivo direttamente nel sito in cui è localizzato il tumore, a livello dell'epitelio bronchiale ed alveolare, favorendo un contatto diretto tra farmaco e tessuto neoplastico con un'esposizione sistemica notevolmente ridotta [104], [105]. Dal punto di vista farmacocinetico, questa strategia permette di evitare il metabolismo di primo passaggio epatico, migliorando la biodisponibilità del farmaco e riducendo il rischio di inattivazione precoce. Ciò si traduce in un potenziale incremento dell'efficacia terapeutica e in una diminuzione degli effetti collaterali sistemici [105], [106].

L'impatto sul profilo di tossicità è, infatti, uno degli elementi centrali nel confronto tra le due vie; come già sottolineato, i principali farmaci antitumorali utilizzati nella terapia del carcinoma polmonare, come cisplatino, paclitaxel, gemcitabina o pemetrexed, somministrati per via endovenosa, sono noti per la loro significativa tossicità sistemica e per i danni cumulativi a carico di reni, di cuore, del sistema nervoso e dell'apparato uditivo. La somministrazione per via inalatoria, limitando la diffusione sistemica, offre quindi un vantaggio rilevante, riducendo l'incidenza e la gravità di questi effetti collaterali [104].

Dal punto di vista del paziente, la via inalatoria comporta benefici tangibili in quanto, al contrario delle terapie endovenose, non richiede la presenza di personale sanitario qualificato o dell'ospedalizzazione del paziente. Infatti, i farmaci inalabili possono essere somministrati mediante dispositivi portatili, come nebulizzatori, inalatori a polvere secca (DPI) o aerosol predosati, spesso utilizzabili anche in ambito domiciliare [106]. Inoltre, la facilità d'uso di questi dispositivi consente

anche somministrazioni frequenti, eventualmente più volte al giorno, favorendo un'esposizione più continua al principio attivo.

1.3.1.DISPOSITIVI PER INALAZIONE

La terapia inalatoria rappresenta una strategia terapeutica consolidata per il trattamento di diverse patologie respiratorie, tuttavia, la sua efficacia dipende fortemente dal tipo di dispositivo impiegato, la cui evoluzione tecnologica ha dato origine a sistemi via via più avanzati, capaci di ottimizzare la deposizione polmonare e adattarsi alle esigenze del paziente [108], [109].

I principali dispositivi attualmente utilizzati per la somministrazione inalatoria di farmaci sono classificabili in tre categorie ossia, nebulizzatori, inalatori pressurizzati a dose predosata (*pressurized metered dose inhaler*, pMDI) ed inalatori di polvere secca (*dry powder inhaler*, DPI) [110].

I nebulizzatori convertono soluzioni o sospensioni liquide in aerosol tramite tecnologie a getto o a ultrasuoni, e risultano particolarmente utili quando è necessario somministrare volumi elevati di farmaco o quando il principio attivo non è compatibile con le formulazioni pressurizzate o in polvere. Il loro utilizzo è facilitato dalla possibilità di respirare normalmente durante l'inalazione, senza necessità di sincronizzazione tra attivazione e respiro. Tuttavia, presentano alcuni svantaggi, tra cui dimensioni ingombranti, necessità di alimentazione elettrica, maggiore consumo di farmaco e tempi di somministrazione più lunghi [110], [111].

I MDI, introdotti negli anni Cinquanta, sono tra i dispositivi più diffusi per la terapia dell'asma e della BPCO (**Fig.5**).

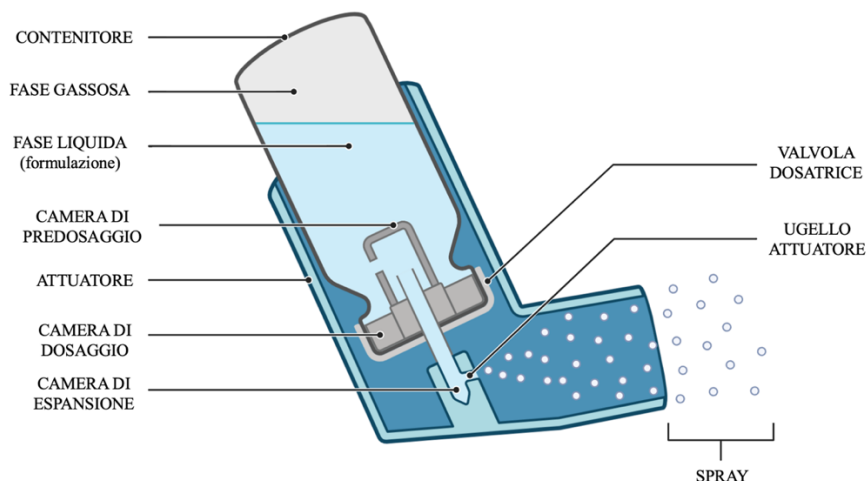


Fig.5: Schema illustrativo del sistema pMDI (prodotta con Biorender).

Essi sono costituiti da recipienti pressurizzati contenenti propellenti liquefatti necessari per nebulizzare il farmaco, garantendo una dose precisa ad ogni attivazione. I propellenti storicamente impiegati come, i clorofluorocarburi (CFC), sono stati sostituiti da idrofluoroalcani (HFA) per motivi ambientali. L'efficacia del pMDI dipende in larga parte dalla corretta tecnica di inalazione che richiede coordinazione tra l'attivazione del dispositivo e l'inspirazione. Per ovviare a tali problematiche, si impiegano accessori come distanziatori e camere di inalazione che riducono la velocità di emissione e facilitano l'assunzione del farmaco [111].

Un'evoluzione dei pMDI è rappresentata dai dispositivi attivati dal respiro in grado di rilasciare il farmaco automaticamente al momento dell'inspirazione, riducendo la necessità di coordinazione [111].

I DPI, invece, si utilizzano per la somministrazione di formulazioni in polvere micronizzata, generalmente associate a lattosio o mannitolo come veicolo. Questi inalatori sono attivati dal flusso respiratorio del paziente, rendendo superflua la sincronizzazione con l'attivazione del dispositivo, ma allo stesso tempo richiedono

un adeguato sforzo inspiratorio per disgregare e disperdere la polvere in particelle inalabili [110], [112]. Questa caratteristica può costituire un limite nei pazienti con compromissione della funzione respiratoria. I DPI si distinguono ulteriormente in dispositivi monodose, multi-unità e multidose, a seconda del meccanismo di caricamento del farmaco. Tra i più noti vi sono lo Spinhaler®, l'HandiHaler®, l'Accuhaler® (o Diskus®), l'Ellipta®, il Turbohaler® e il Flexhaler®, utilizzati per la somministrazione di corticosteroidi, β_2 -agonisti e altri broncodilatatori [112], [113] (Fig.6).

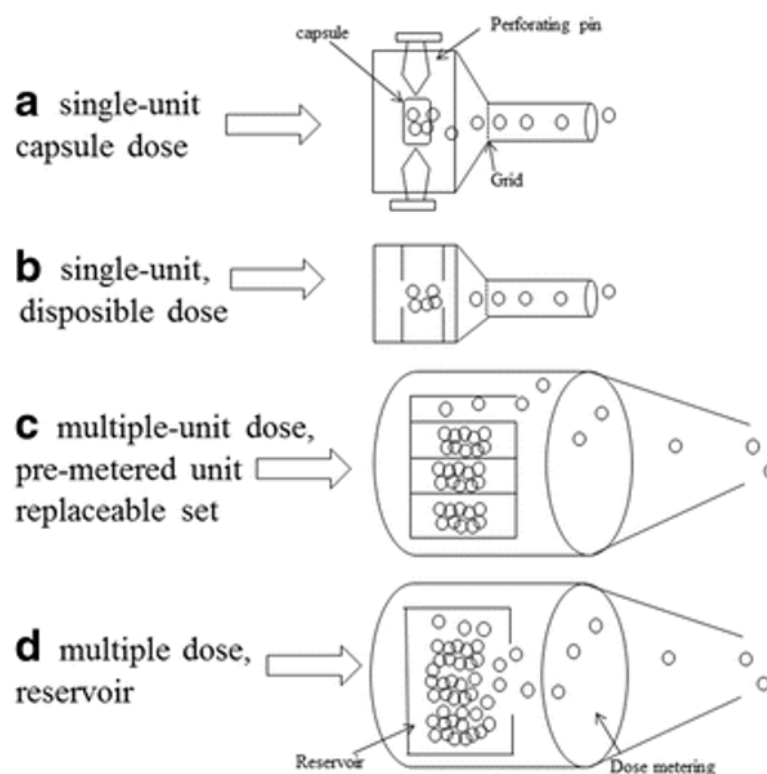


Fig.6: Tipologie dei sistemi DPI (immagine modificata con intelligenza artificiale).

Nel complesso, la scelta del dispositivo inalatorio più adatto dipende da molteplici fattori ossia, la formulazione del farmaco, le caratteristiche del paziente, la gravità della malattia respiratoria, la capacità di coordinazione e l'aderenza al trattamento

[110], [112]. È quindi fondamentale, oltre alla progettazione tecnologica del dispositivo, garantire un'adeguata formazione del paziente al corretto utilizzo per massimizzare l'efficacia terapeutica e ridurre al minimo la deposizione del farmaco nelle vie aeree superiori [113].

1.3.2.DEPOSIZIONE DEGLI AEROSOL

Affinché il principio attivo sia direzionato direttamente nel sito d'azione, è necessario che il farmaco sia formulato in forma di aerosol, ovvero un sistema bifasico costituito da particelle liquide o solide disperse in una fase gassosa. La capacità dell'aerosol di raggiungere e depositarsi nelle vie respiratorie dipende da un insieme di fattori, che includono non solo le caratteristiche fisico-chimiche del farmaco e della formulazione, ma anche le proprietà del dispositivo di erogazione e le specificità fisiologiche del paziente [114].

Tra i parametri fisici che influenzano in maniera determinante la deposizione polmonare, la dimensione delle particelle riveste un ruolo centrale. A tal fine, si fa riferimento al diametro aerodinamico (d_a), un parametro che tiene conto non solo della grandezza geometrica delle particelle ma anche della loro densità e forma. Esso è definito come il diametro di una sfera di densità unitaria (1 g/cm³) che presenta la stessa velocità di sedimentazione della particella considerata. La relazione matematica che lo descrive è la seguente (**eq.1**) [114]:

$$d_a = d \sqrt{\frac{\rho}{\rho_0 \chi}}$$

dove d rappresenta il diametro geometrico della particella, ρ la sua densità reale, ρ_0 la densità di riferimento pari a 1 g/cm³, e χ il fattore di forma, che tiene conto della deviazione dalla sfericità. Da questa relazione si comprende come particelle di

uguale diametro geometrico possano presentare comportamenti aerodinamici differenti a seconda della loro struttura e composizione [114].

La distribuzione dimensionale delle particelle viene generalmente espressa attraverso il diametro aerodinamico mediano di massa (MMAD), che rappresenta la dimensione per la quale il 50% della massa totale dell'aerosol è costituito da particelle di dimensione maggiore ed il restante 50% da particelle più piccole. Un altro parametro da considerare è la Deviazione Standard Geometrica (DSG), che descrive l'ampiezza della distribuzione; valori prossimi a 1 indicano una distribuzione omogenea (monodispersa), mentre valori superiori segnalano una maggiore variabilità dimensionale (polidispersione).

Un'ulteriore variabile da considerare è l'igroscopicità delle particelle, ovvero la loro propensione ad assorbire vapore acqueo, che può causare un aumento del diametro particellare e la conseguente variazione del comportamento di deposizione rispetto a quanto previsto in condizioni secche [114]. In particolare, le particelle con MMAD inferiore a $0.1\ \mu\text{m}$ risultano poco influenzate dall'umidità, mentre quelle con MMAD superiore a $1\ \mu\text{m}$ mostrano una significativa crescita dimensionale con implicazioni importanti sulla loro destinazione anatomica e sulla biodisponibilità locale del farmaco [115].

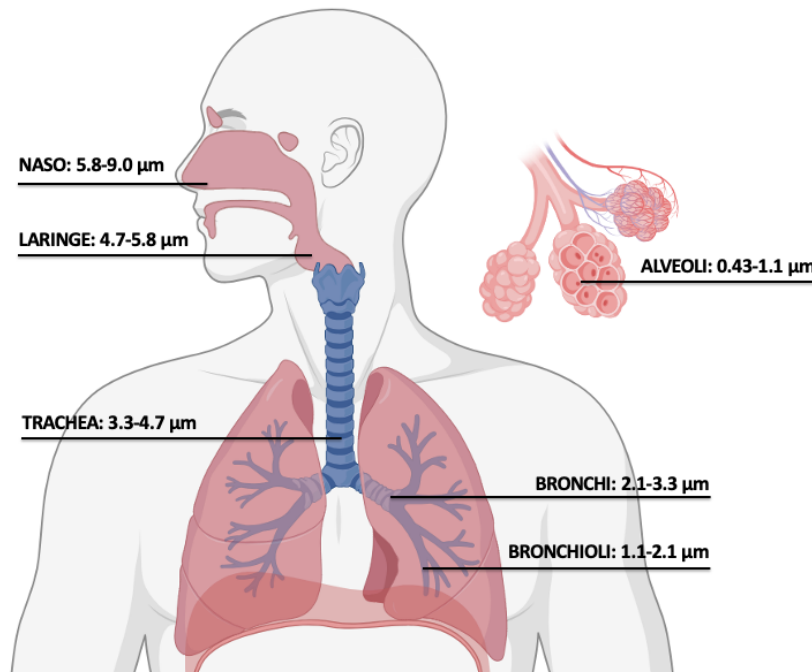


Fig.7: Dimensione delle particelle che si depositano nell'apparato respiratorio (prodotta con Biorender).

Il destino delle particelle inalate, vedi **Fig.7**, dipende strettamente dalla loro dimensione aerodinamica. In linea generale, si considera ottimale una deposizione nelle vie respiratorie inferiori per particelle con d_a compreso tra 1 e 5 μm , mentre una penetrazione nella regione alveolare richiede particelle con d_a inferiore a circa 2 μm . Al contrario, particelle superiori a 5–6 μm tendono a depositarsi nelle vie aeree superiori (orofaringe, laringe, trachea) e vengono successivamente rimosse tramite il sistema mucociliare, riducendo così l'efficienza terapeutica e aumentando il rischio di assorbimento sistemico indesiderato.

Un caso particolare è rappresentato dalle particelle porose, che pur avendo un diametro geometrico elevato (fino a 20 μm), possono penetrare efficacemente nelle regioni distali del polmone grazie alla loro bassa densità. Tali particelle, dotate di un'elevata porosità interna, presentano infatti un basso diametro aerodinamico e

quindi un comportamento simile a quello delle particelle di piccola dimensione. Questa strategia formulativa rappresenta un importante sviluppo nella progettazione di aerosol respiratori ad alta efficienza [114].

1.3.3.MECCANISMI DI DEPOSIZIONE DELLE PARTICELLE

La deposizione delle particelle nelle vie respiratorie può avvenire attraverso diversi meccanismi fisici, i cui contributi dipendono dalla dimensione, dalla densità, dalla forma e dalla velocità delle particelle, nonché dalla geometria e dalla dinamica del flusso respiratorio.

Il primo e più immediato è l'impattazione inerziale, che predomina per particelle di dimensioni maggiori ($> 5 \mu\text{m}$) e ad alta velocità. In presenza di cambi bruschi nella direzione del flusso d'aria, come nelle biforcazioni bronchiali, queste particelle non riescono a seguire la curvatura del flusso e impattano contro le pareti delle vie aeree, Questo fenomeno è rilevante a livello del tratto oro-faringeo e della trachea, specialmente in condizioni di flusso turbolento, tipico di una respirazione forzata o di un'inspirazione rapida [114], [115].

La sedimentazione gravitazionale è il meccanismo dominante per particelle di dimensioni intermedie ($1\text{--}5 \mu\text{m}$). Essa si verifica principalmente nelle vie aeree inferiori e negli alveoli dove la velocità del flusso è ridotta e il tempo di permanenza delle particelle è sufficiente a permettere la loro deposizione per effetto della forza di gravità. La sedimentazione può essere significativamente potenziata da un periodo di apnea post-inspiratoria, durante il quale l'aerosol permane staticamente nell'albero respiratorio [114], [115].

Per particelle di dimensioni ultrafini ($< 1 \mu\text{m}$), la deposizione avviene per diffusione Browniana. In questo caso, il moto casuale delle particelle, generato dalle collisioni con le molecole del gas, facilita l'interazione con le superfici epiteliali. Tuttavia, a causa della loro leggerezza, tali particelle tendono ad essere espirate prima di potersi depositare in quantità significativa, rendendo il loro contributo terapeutico limitato in assenza di particolari strategie di formulazione.

Oltre ai meccanismi principali sopra descritti, esistono anche fenomeni secondari, che possono contribuire in modo significativo alla deposizione. Tra questi si annoverano:

- l'intercezione, meccanismo tipico delle particelle non sferiche o fibrose che entrano in contatto con le pareti delle vie aeree a causa della loro estensione geometrica;
- l'attrazione elettrostatica, che si manifesta quando una particella carica elettricamente induce una carica opposta sulla superficie epiteliale, generando un campo di attrazione sufficiente a favorirne l'adesione alle pareti respiratorie [114], [115] **Fig.8.**



Fig.8: Meccanismi di deposizione (prodotta con Biorender).

Nel complesso, la comprensione approfondita dei meccanismi di deposizione e dei fattori che li influenzano costituisce una base essenziale per lo sviluppo razionale di sistemi inalatori in grado di ottimizzare la biodistribuzione polmonare del principio attivo e massimizzare la risposta terapeutica in funzione della patologia target [114].

1.3.4.LIMITI DELLA SOMMINISTRAZIONE INALATORIA

La via di somministrazione inalatoria, pur offrendo notevoli vantaggi nel trattamento del carcinoma polmonare, presenta alcune limitazioni tecniche e biologiche che ne condizionano l'efficacia terapeutica.

Un fattore critico riguarda la dimensione delle particelle inalate, la cui ottimizzazione è indispensabile per garantire una deposizione adeguata nel distretto polmonare interessato. Particelle con diametro troppo elevato tendono a depositarsi nelle vie aeree superiori, riducendo la quantità di principio attivo negli alveoli e nel tessuto tumorale. Viceversa, particelle troppo piccole rischiano di essere espirate prima di aderire alle superfici respiratorie o di penetrare troppo in profondità con conseguenze sulla biodisponibilità e sull'effetto terapeutico [114], [115].

In aggiunta, nei pazienti oncologici si osserva frequentemente una ipersecrezione di muco, spesso caratterizzata da un aumento della viscosità e da una composizione biochimica alterata di quest'ultimo. Questo muco patologico agisce da filtro fisico-meccanico, intrappolando le particelle inalate prima che possano interagire con l'epitelio respiratorio, limitandone l'accesso ai tessuti polmonari sottostanti. Le proprietà fisico-chimiche della particella inalata, come dimensione, idrofobicità, carica superficiale e composizione, influenzano in modo sostanziale la capacità

delle particelle di attraversare lo strato mucoso e raggiungere il sito d'azione. Particelle eccessivamente grandi o dotate di cariche elettrostatiche sfavorevoli tendono ad aderire al muco, riducendo l'efficienza del trattamento [115].

Un ulteriore limite è rappresentato dalla presenza dei macrofagi alveolari, che svolgono un ruolo chiave nella sorveglianza immunologica del polmone, rimuovendo particolati e agenti estranei tramite fagocitosi. Tuttavia, i macrofagi possono ridurre drasticamente la biodisponibilità del farmaco inalato, inglobando le particelle prima che queste raggiungano le cellule tumorali. Questo fenomeno è particolarmente accentuato nel caso di *carrier* innovativi come nanoparticelle o liposomi, i quali risultano facilmente riconoscibili dai sistemi di difesa innata [113], [115]. Inoltre, il microambiente tumorale può modulare in maniera aberrante l'attività dei macrofagi, favorendo una polarizzazione verso fenotipi immunosoppressivi (ad es. M2-like) o pro-infiammatori con conseguenze negative sia sulla distribuzione del farmaco che sull'omeostasi tissutale locale [113].

1.4.NANOMEDICINA

Al fine di superare i limiti della chemioterapia tradizionale e della via di somministrazione inalatoria, negli ultimi anni, la nanomedicina ha acquisito crescente rilevanza nel panorama della ricerca oncologica, in particolare per il trattamento del carcinoma polmonare [116]. Le attuali strategie terapeutiche, pur includendo opzioni avanzate, come immunoterapia, inibitori a bersaglio molecolare e chemioterapia combinata, presentano ancora numerose criticità, tra cui l'insufficiente selettività per il tessuto tumorale, l'elevata tossicità sistemica e la scarsa penetrazione dei farmaci nel microambiente neoplastico [117].

In tale contesto, la somministrazione diretta di nanosistemi per via inalatoria si configura come una strategia innovativa in grado di ottimizzare la biodistribuzione del farmaco, aumentandone la concentrazione locale nel tessuto bersaglio e riducendone contemporaneamente l'esposizione sistemica; infatti, i sistemi nanoparticellari inalabili, tra cui liposomi, micelle, nanoparticelle polimeriche, dendrimeri, *carrier* lipidici solidi e ibridi lipidico-polimerici (**Fig.9**), sono progettati per ottimizzare la deposizione polmonare e garantire una liberazione controllata e prolungata del farmaco nel sito tumorale. Inoltre, i nanosistemi inalabili, grazie alle loro ridotte dimensioni (solitamente comprese tra 100 e 250 nm), sono in grado di superare ostacoli biologici, come la clearance mucociliare e l'azione fagocitaria dei macrofagi alveolari [113], [116].

Le loro dimensioni permettono, inoltre, alle piattaforme nanomedicali di sfruttare il *targeting* passivo, ovvero l'effetto di *Enhanced Permeability and Retention* (EPR), dovuto alla vascolarizzazione anomala del tumore, caratterizzata da una maggiore permeabilità vascolare e da un ridotto drenaggio linfatico che facilita la penetrazione e la ritenzione selettiva delle nanoparticelle nel microambiente tumorale. Purtroppo, l'EPR presenta limitazioni, come la variabilità intertumorale, la presenza di barriere stromali dense o le condizioni ipossiche che ostacolano la penetrazione [118], [119]. Per superare tali limiti, si ricorre al *targeting* attivo, poiché funzionalizzando la superficie dei nanosistemi con ligandi specifici, quali anticorpi monoclonali, aptameri, peptidi tumor-specifici o molecole come l'acido folico, si possono targettare recettori sovraespressi sulle cellule tumorali (es. EGFR, FAR, VEGFR, integrine $\alpha\beta3$), consentendo un legame mirato ed una internalizzazione cellulare efficiente tramite endocitosi mediata da recettori [118],

[119]. Questi sistemi nanomedicali possono inoltre essere progettati per rispondere a stimoli specifici del microambiente tumorale, come pH acido, enzimi tumorali o gradienti *redox*, attivando un rilascio farmacologico stimolo-responsivo che riduce l'esposizione sistemica e aumenta l'efficacia terapeutica [118], [119]. Questi sistemi dinamici rappresentano un progresso significativo nella nanomedicina oncologica, consentendo un controllo adattativo della farmacocinetica e della farmacodinamica del farmaco [119].

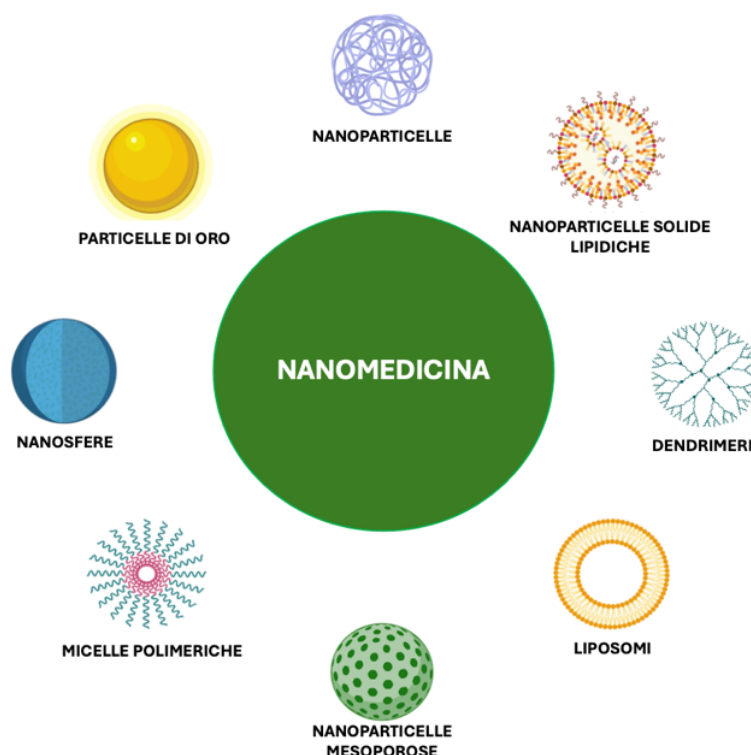


Fig.9: Sistemi attualmente in uso nella nanomedicina (prodotta con Biorender).

Diversi studi preclinici hanno confermato il potenziale terapeutico di questi sistemi.

Ad esempio, Fu e collaboratori, hanno sviluppato sistemi lipidici biomineralizzati, per il co-trasporto inalatorio di diidroartemisinina e fosfato di calcio, i quali hanno determinato un aumento di oltre sei volte dell'accumulo del principio attivo nelle lesioni cancerose polmonari rispetto alla somministrazione per via endovenosa,

inducendo la morte cellulare tumorale attraverso meccanismi di ferroptosi, sfruttando sia la produzione intracellulare di ROS sia l'alterazione del bilancio del calcio [120]. L'uso della nanomedicina per il carcinoma polmonare è risultato utile anche nel campo della terapia genica dove, Zhao e collaboratori hanno veicolato per via polmonare siRNA tramite nanoparticelle di PLGA-PEG, dimostrando un'efficace downregolazione del gene mutato KRAS e una marcata attività antitumorale in modelli ortotopici di carcinoma polmonare non a piccole cellule [121]. Purtroppo, nonostante le numerose evidenze precliniche favorevoli, l'applicazione clinica di questi sistemi rimane limitata. Le principali barriere riguardano la variabilità anatomica dei pazienti, la mancanza di conoscenze approfondite sugli effetti a lungo termine dei nanomateriali nei tessuti polmonari e le sfide tecnico-produttive, legate alla stabilità delle formulazioni, alla selezione degli eccipienti inalabili e all'ottimizzazione dei dispositivi di somministrazione [122]. Nonostante ciò, numerosi *trial* clinici di fase I/II hanno dimostrato la buona tollerabilità di formulazioni inalabili di carboplatino, gemcitabina, doxorubicina, sorafenib e altri agenti, nonché l'assenza di tossicità sistemica (renale,ematologica, neurologica), con un vantaggio significativo rispetto alla somministrazione endovenosa [123], [124], [125], [126]. Nel complesso, la combinazione tra nanotecnologie farmaceutiche avanzate, la somministrazione inalatoria e la standardizzazione dei protocolli clinici, rappresenta una delle frontiere più promettenti per lo sviluppo di terapie antitumorali ad alta specificità e bassa tossicità nel trattamento del carcinoma polmonare [107], [116] **Fig.10**.

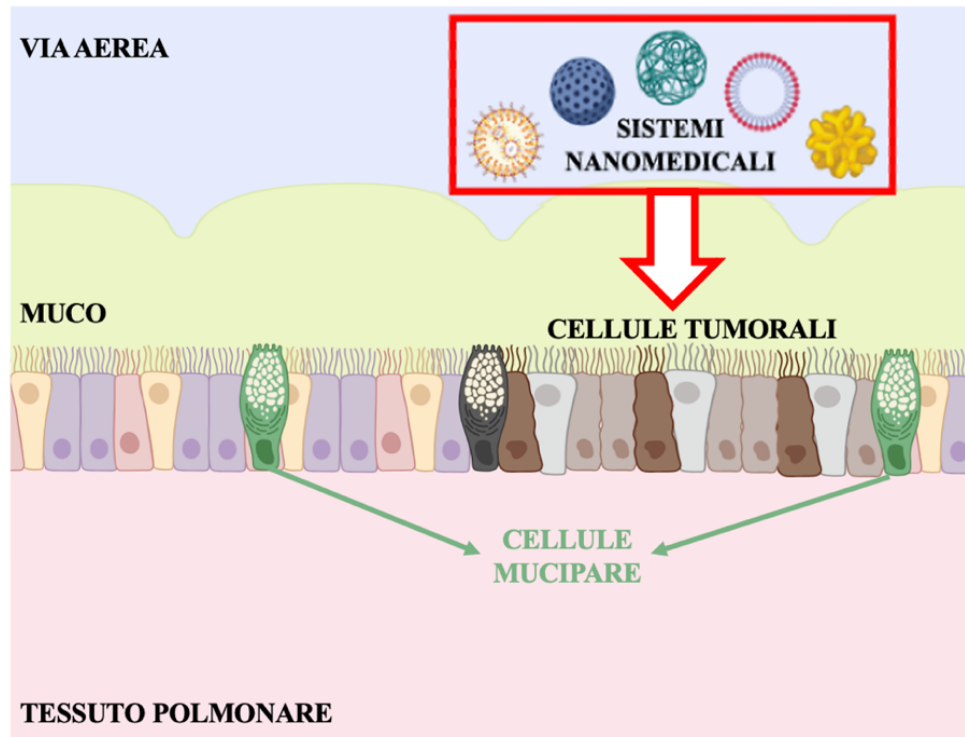


Fig.10: Nanomedicina per la somministrazione polmonare di chemioterapici nel trattamento del carcinoma polmonare (prodotta con Biorender).

1.4.1.MICELLE POLIMERICHE

Le micelle polimeriche rappresentano una delle piattaforme più promettenti per la somministrazione mirata e controllata di farmaci antitumorali, specialmente in contesti clinici complessi, come il trattamento NSCLC e altre neoplasie solide. Queste nanostrutture, costituite dall'aggregazione spontanea di copolimeri anfifilici in dispersione acquosa, combinano caratteristiche di stabilità colloidale, di elevata capacità di carico, di lunga circolazione sistemica e di possibilità di *targeting* molecolare attivo e passivo [127] **Fig.11.**

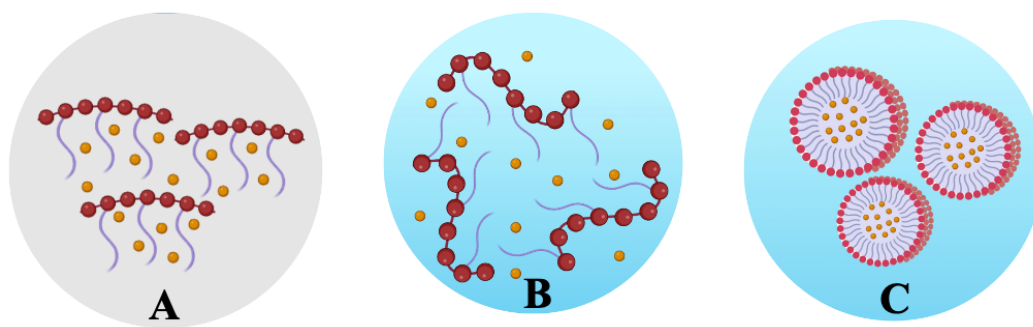


Fig.11: Formazione schematica delle micelle polimeriche. (A) Miscela fisica di polimero e farmaco; (B) Dispersione acquosa di polimero e farmaco; (C) Formazione delle micelle polimeriche (prodotta con Biorender).

La micellizzazione dei copolimeri anfifilici avviene per minimizzazione dell'energia libera in ambiente acquoso. Quando la concentrazione dei copolimeri supera il valore critico (*Critical Aggregation Concentration*, CAC), i segmenti idrofobici tendono ad autoorganizzarsi in un *core* centrale circondato da segmenti idrofili che formano la corona esterna (*shell*). Questa architettura *core-shell* è termodinamicamente stabile e consente la formazione di nanocarrier di dimensioni comprese generalmente tra 10 e 200 nm, ideali per l'accumulo nel tumore tramite effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR). Le micelle polimeriche presentano valori di CAC estremamente bassi (10^{-6} – 10^{-7} M) che garantiscono la stabilità delle strutture micellari anche in seguito a diluizione sistemica post-somministrazione [127], [128].

I copolimeri impiegati nella sintesi di micelle possono presentare diverse architetture molecolari, tra cui diblocco (A-B), triblocco (A-B-A o B-A-B), *graft copolymer*, *star-shaped* o dendritici, ciascuna delle quali conferisce specifiche proprietà chimico-fisiche, come la capacità di incorporazione del farmaco, la

stabilità, la cinetica di rilascio del farmaco e la possibilità di funzionalizzazione della superficie [128]. I blocchi idrofili sono tipicamente costituiti da polimeri biocompatibili, come il polietilenglicole (PEG), l'inulina (INU) o il poli(N-vinilpirrolidone) (PVP), mentre i segmenti idrofobici possono derivare da polimeri biodegradabili, come il poli(ϵ -caprolattone) (PCL), l'acido polilattico (PLA), l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), che sono biodegradabili in vivo e determinano la cinetica di rilascio del farmaco [129], [130].

Il *core* idrofobico delle micelle funge da compartimento per l'incapsulamento di farmaci lipofili (come paclitaxel, doxorubicina, docetaxel o sorafenib) grazie a interazioni idrofobiche, di Van der Waals e, talvolta, legami a idrogeno. La corona idrofila garantisce la dispersione in soluzione acquosa, protegge il farmaco caricato dalla degradazione enzimatica e limita l'interazione con le proteine plasmatiche, riducendo la clearance fagocitaria. Inoltre, l'effetto *stealth* conferito da PEG o altri agenti idrofili consente una circolazione prolungata in vivo ed un migliore profilo farmacocinetico [127].

Le modalità di caricamento del farmaco all'interno delle micelle possono essere suddivise in due categorie principali ovvero, il caricamento fisico, in cui il principio attivo è incapsulato nel *core* micellare durante la formazione della micella, e la coniugazione chimica, in cui il farmaco è legato covalentemente a uno dei segmenti polimerici tramite *linker* biodegradabili (ad esempio sensibili al pH, alle condizioni ossido riduttive o agli enzimi tumorali). Questa seconda strategia consente un controllo preciso sul rilascio del farmaco spesso in risposta a specifici stimoli tumorali [130].

I metodi di preparazione delle micelle polimeriche comprendono numerose tecniche, tra cui dialisi, evaporazione del solvente, precipitazione da solvente organico in ambiente acquoso, liofilizzazione di miscele bifasiche e *self-assembly* diretto o ancora il metodo *kneading*, una tecnica per preparare liposomi e micelle, basata sull'idratazione di un film secco formato per evaporazione di una soluzione organica di fosfolipidi o di polimero. Ogni metodo presenta vantaggi specifici in termini di resa, di dimensione delle micelle, di distribuzione del farmaco e di riproducibilità [128], [130].

Dal punto di vista farmacocinetico e terapeutico, le micelle polimeriche presentano numerosi vantaggi significativi, quali un aumento della solubilità apparente di farmaci idrofobici, migliorando la biodisponibilità di molecole con scarsa solubilità intrinseca in acqua [129]. Inoltre, le micelle proteggono il principio attivo da una degradazione prematura nel circolo ematico, estendendone così l'emivita plasmatica [127], [130]. Inoltre, i sistemi migliorano l'accumulo e l'efficacia terapeutica, sfruttando stimoli ambientali e l'effetto EPR e possono anche essere funzionalizzati in superficie con ligandi specifici per avere un rilascio controllato e mirato del farmaco nell'area tumorale, migliorando l'efficacia terapeutica e riducendo gli effetti collaterali sistemici.[127], [130].

Nel caso del carcinoma polmonare, le micelle polimeriche hanno dimostrato un'efficacia superiore nella veicolazione di agenti chemioterapici rispetto alle formulazioni tradizionali. Ad esempio, Sze e collaboratori hanno caricato il paclitaxel in micelle polimeriche di PEG-b-PCL e successivamente le hanno somministrate per via orale a dei topi. Dalle analisi emerge una biodisponibilità nettamente aumentata ed una tossicità ridotta del paclitaxel quando somministrato

mediante micelle polimeriche [131]. Similmente, Zhu e collaboratori hanno caricato la curcumina in micelle di PEG-PLA e hanno dimostrato che la veicolazione del farmaco in questi nanosistemi determinano una attività citotossica verso cellule A549. Alcuni studi in vivo hanno evidenziato un significativo incremento nell'accumulo tumorale e nella soppressione della crescita neoplastica rispetto alla somministrazione del farmaco libero.

Dal punto di vista regolatorio e industriale, diverse formulazioni micellari sono già state approvate o sono in fase di sperimentazione clinica avanzata. Tra i sistemi micellari avanzati in fase di sviluppo clinico per il trattamento del carcinoma polmonare si annoverano, Genexol-PM, una micella polimerica a base di PEG-PLA contenente paclitaxel, che ha dimostrato in studi di fase II una buona tollerabilità e una significativa attività antitumorale in combinazione con cisplatino [132]. Un altro sistema attualmente in commercio è NK012, una formulazione micellare polimerica a base di PEG-pGLU (N3-poly-L-glutamic acid) caricata con SN-38 (metabolita attivo dell'irinotecano), che ha mostrato un'efficace penetrazione tumorale e una ridotta tossicità sistemica in pazienti refrattari [133].

In sintesi, le micelle polimeriche rappresentano un sistema veicolazione, in grado di superare numerose limitazioni dei farmaci antitumorali convenzionali grazie ad una progettazione molecolare razionale, ad una elevata stabilità in circolo, ad una capacità di carico modulabile e ad un'eccezionale versatilità terapeutica. Con il progredire delle conoscenze nella scienza dei polimeri, nella biologia tumorale e nella farmacologia traslazionale è verosimile che tali sistemi diventeranno parte integrante delle strategie terapeutiche personalizzate per il trattamento del carcinoma polmonare [127], [130].

1.4.2.NANOPARTICELLE POLIMERICHE (NPs)

Un altro sistema avanzato di *drug delivery* largamente studiato nel trattamento del carcinoma polmonare è rappresentato dalle nanoparticelle polimeriche (NPs), che costituiscono una delle piattaforme più promettenti nel campo della nanomedicina oncologica [118]. Questi sistemi colloidali, con dimensioni che variano tipicamente tra 10 e 500 nanometri, sono progettati per veicolare agenti terapeutici e diagnostici in modo altamente controllato, mirato e biocompatibile, massimizzando così l'efficacia del trattamento e minimizzandone gli effetti collaterali [119], [134]. La loro dimensione mostra un'elevata superficie specifica, fondamentale per un efficiente caricamento di farmaci, oltre alla possibilità di modificazioni superficiali mirate, finalizzate a migliorare la selettività, la stabilità e la biodisponibilità del principio attivo. Nel contesto del carcinoma polmonare, in cui la somministrazione localizzata degli agenti antitumorali è essenziale per aumentare l'efficacia terapeutica e ridurre la tossicità sistemica, le nanoparticelle polimeriche rappresentano un'alternativa rispetto alle formulazioni tradizionali [135].

I materiali utilizzati per la produzione delle nanoparticelle polimeriche includono polimeri naturali, come chitosano, acido ialuronico, alginati, collagene, gelatina e albumina, e polimeri semisintetici o sintetici quali, acido polilattico (PLA), acido polilattico-co-glicolico (PLGA) e policaprolattone (PCL) [134], [136]. I polimeri naturali offrono il vantaggio di elevata biocompatibilità, biodegradabilità e interazioni bioattive con la matrice extracellulare e il muco, caratteristiche particolarmente utili nelle applicazioni respiratorie. Tuttavia, limitazioni quali la loro scarsa stabilità in ambiente fisiologico e l'idrofobicità ridotta possono compromettere la capacità di incapsulare efficacemente farmaci lipofili e la durata

del rilascio. Al contrario, i polimeri sintetici consentono una maggiore *performance* chimica, una migliore processabilità e una degradazione controllata, come nel caso del PLGA, che si degrada in vivo in metaboliti non tossici (acido lattico e glicolico) e permette di modulare con precisione la cinetica di rilascio del farmaco incorporato. Inoltre, la funzionalizzazione delle nanoparticelle idrofobiche con polimeri idrofili, come il polietilenglicole (PEG), conferisce alle particelle proprietà “*stealth*”, riducendo il riconoscimento da parte del sistema immunitario, prolungandone la circolazione ematica e facilitandone il passaggio attraverso barriere biologiche complesse, quali il muco polmonare [119], [135].

Un aspetto chiave delle nanoparticelle polimeriche è la possibilità di applicare strategie di *targeting* per aumentare la specificità dell’accumulo nel tessuto tumorale. Questi sistemi possono sfruttare il *targeting* passivo attraverso l’effetto EPR per accumulare le nanoparticelle nel tumore [118], [119]. Inoltre, essi possono essere funzionalizzati in superficie (*targeting* attivo) con ligandi specifici per avere un rilascio controllato e mirato del farmaco nell’area tumorale, migliorando l’efficacia terapeutica e riducendo gli effetti collaterali sistemici degli antitumorali [118], [119]. Per esempio, Wang e collaboratori hanno sviluppato e caratterizzato un sistema di rilascio nanometrico a base di chitosano, coniugato con FA (FA-PEG-GEM-NPs), finalizzato al trasporto mirato e controllato della gemcitabina nel trattamento del NSCLC. La funzionalizzazione con FA ha permesso di aumentare significativamente l’assorbimento intracellulare delle NPs. I dati in vitro e in vivo evidenziano una citotossicità potenziata nei confronti delle cellule neoplastiche e una riduzione degli effetti tossici sistemici rispetto alla somministrazione del farmaco in forma libera, suggerendo una maggiore efficacia e sicurezza del sistema

nanocarrier sviluppato [137]. In un altro studio, Essa e collaboratori hanno progettato e caratterizzato nanoparticelle a doppio *targeting* basate su acido ialuronico (HA) e FA per il rilascio mirato del 4-metilumbelliferone (4-MU) nel trattamento del carcinoma polmonare. Il sistema HA-FA-4MU-NPs è stato ingegnerizzato per interagire selettivamente con i recettori CD44 e i FAR, entrambi sovraespressi sulle cellule tumorali, al fine di aumentarne la specificità d'azione. I risultati sperimentali mostrano che tali NPs sono in grado di ridurre significativamente la proliferazione e la capacità invasiva delle cellule tumorali in vitro, oltre a esercitare un'efficace attività antitumorale in vivo, accompagnata da una bassa tossicità sistemica. Questo approccio conferma il potenziale del *targeting* attivo come strategia avanzata per migliorare l'efficacia e la selettività delle terapie antitumorali.

Le nanoparticelle polimeriche possono essere ottenute attraverso diverse tecniche di produzione, ciascuna selezionata in funzione delle proprietà chimico-fisiche del polimero utilizzato, dalla natura del farmaco da incapsulare e dalle caratteristiche desiderate del sistema finale [119]. Tra i metodi più consolidati figura la tecnica dell'emulsione con evaporazione del solvente che consiste nella dissoluzione del polimero e del principio attivo in un solvente organico immiscibile con l'acqua. Questa fase organica viene poi dispersa in una fase acquosa contenente un tensioattivo, formando un'emulsione che, sottoposta a evaporazione del solvente, porta alla formazione delle nanoparticelle per precipitazione del polimero. Questo approccio permette un buon controllo dimensionale e risulta particolarmente efficace per l'incapsulamento di farmaci lipofili [134], [136]. Un'alternativa semplice e rapida è rappresentata dalla nanoprecipitazione, in cui il polimero ed il

farmaco vengono disciolti in un solvente organico miscibile con l'acqua e aggiunti rapidamente a una fase acquosa, provocando una precipitazione istantanea delle particelle dovuta alla repentina diminuzione della solubilità del polimero. Questo metodo consente di ottenere nanoparticelle con dimensioni contenute e distribuzione monodispersa [119], [134]. Un altro approccio è il *salting-out*, che sfrutta la diminuzione della solubilità di una sostanza in presenza di elevate concentrazioni saline. In pratica, l'aggiunta di un sale in concentrazioni elevate fa sì che le molecole d'acqua, che normalmente solvatano la sostanza, vengano allontanate per interagire con il sale. Questo porta le molecole di polimero a interagire tra loro, formando aggregati che poi precipitano dalla soluzione [134], [135]. La dialisi, invece, si basa sulla lenta rimozione del solvente organico attraverso una membrana semipermeabile, permettendo un controllo più fine sulla cinetica di formazione e sulle dimensioni delle nanoparticelle ottenute [134], [136]. Ogni metodo di produzione influisce profondamente sulle proprietà finali delle nanoparticelle, come la dimensione, la morfologia, l'efficienza di incapsulamento, la cinetica di rilascio del farmaco e la stabilità colloidale, rendendo essenziale un'attenta ottimizzazione in relazione all'obiettivo terapeutico specifico [119], [134]. Infine, tecniche come lo *spray-drying* (SD) e la liofilizzazione vengono adottate in fase post-produzione per ottenere formulazioni in polvere secca, migliorando la stabilità delle nanoparticelle nel tempo e facilitando la somministrazione per via inalatoria, particolarmente utile nel trattamento delle patologie polmonari [119], [135].

Le nanoparticelle polimeriche stimolo-responsive permettono un rilascio mirato del farmaco in risposta a segnali del microambiente tumorale, migliorando l'efficacia e la sicurezza terapeutica con un controllo adattativo della sua azione [118], [119]. Dal punto di vista clinico, le nanoparticelle polimeriche si stanno evolvendo verso applicazioni concrete nel trattamento del carcinoma polmonare. Formulazioni innovative, come CRLX101 contenente camptotecina, hanno dimostrato in trial di fase I/II un accumulo selettivo nel tumore con ridotti effetti sistemici [138]. Parallelamente, formulazioni inalatorie basate su PLGA, contenenti farmaci come Sor, mostrano promettenti risultati in modelli preclinici di NSCLC KRAS-mutato, migliorando l'internalizzazione cellulare e l'attività antitumorale [139]. Tali sviluppi sottolineano il passaggio dalla ricerca preclinica a soluzioni terapeutiche clinicamente rilevanti, con un crescente interesse verso strategie combinate che integrano *targeting* attivo, rilascio controllato e somministrazione inalatoria [118]. In sintesi, le nanoparticelle polimeriche rappresentano una strategia terapeutica potenziale nel trattamento del carcinoma polmonare, offrendo soluzioni per superare le limitazioni della chemioterapia tradizionale. Grazie alla loro capacità di aumentare la specificità e la localizzazione del farmaco, di ridurre la tossicità sistemica e di modulare il rilascio terapeutico, esse promettono un miglioramento significativo degli *outcome* clinici e della qualità di vita dei pazienti [118], [119]. La ricerca futura sarà incentrata sull'ottimizzazione delle formulazioni inalatorie, sulla personalizzazione delle terapie in base ai profili molecolari e fenotipici individuali e sullo sviluppo di nanopiattaforme multifunzionali in grado di combinare funzioni terapeutiche, diagnostiche e di *imaging*, aprendo la strada a una

medicina di precisione avanzata per la gestione integrata del tumore polmonare [118].

1.4.3.RUOLO DELL'ACIDO FOLICO (FA) NEL CARCINOMA POLMONARE

Una delle strategie più promettenti nella terapia oncologica moderna è rappresentata dal direccionamento attivo di farmaco verso cellule tumorali specifiche attraverso l'impiego di ligandi [119]. Questi ultimi, scelti in base alla loro capacità di riconoscere e legarsi con alta affinità a specifici recettori sovraespressi sulla superficie delle cellule tumorali, consentono una selettività terapeutica significativamente superiore rispetto alla chemioterapia convenzionale [119]. L'obiettivo è duplice, aumentare la concentrazione del farmaco nel sito tumorale, massimizzando l'efficacia terapeutica, e ridurre l'accumulo sistemico minimizzando gli effetti collaterali [118]. I ligandi direccionanti possono essere anticorpi, peptidi, aptameri, zuccheri o piccole molecole, come nel caso dell'acido folico (FA). Quest'ultimo (**Fig.12**) è una molecola a basso peso molecolare essenziale per il metabolismo cellulare, in particolare per la sintesi di nucleotidi e per la replicazione del DNA [140].

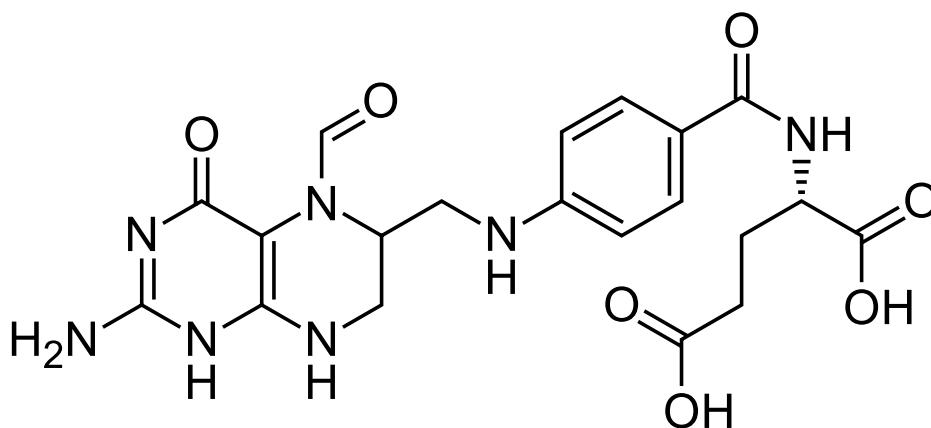


Fig.12: Formula di struttura dell'acido folico.

A causa della sua importanza nei processi biosintetici, l'FA è consumato in elevate quantità dalle cellule in rapida proliferazione, come quelle tumorali [141], [142]. Le cellule eucariotiche, non essendo in grado di sintetizzare autonomamente il folato, lo assumono dall'esterno tramite due principali meccanismi di trasporto, uno mediato da un carrier per il folato ridotto, a bassa affinità ma ubiquitario, e un altro tramite recettori per il folato (FAR), glicoproteine ad alta affinità localizzate sulla membrana cellulare [141], [143].

I recettori del folato, in particolare FAR α , rivestono un ruolo cruciale nel contesto oncologico poiché risultano sovraespressi in numerosi tumori umani, tra cui quelli polmonari, mentre sono scarsamente presenti o inaccessibili nei tessuti sani, inquanto essi sono localizzati sulla superficie apicale delle cellule epiteliali, protetti dalla circolazione ematica grazie alla presenza di giunzioni intercellulari serrate [141], [143]. Tuttavia, durante la trasformazione neoplastica, la perdita della polarità cellulare fa sì che i recettori diventino esposti sull'intera superficie cellulare, rendendoli accessibili ai farmaci veicolati per via sistemica [144].

Questa peculiare distribuzione rende FAR α un bersaglio altamente selettivo per il *drug targeting* tumore-specifico. L'FA, grazie alla sua affinità per FAR, è uno dei ligandi più sfruttati in questo ambito [141], [143], inquanto coniugato correttamente a molecole o altri materiali, non altera la sua affinità per il recettore, consentendone l'utilizzo come vettore per una vasta gamma di sistemi di *drug delivery*, inclusi coniugati a piccole molecole, anticorpi e nanoparticelle polimeriche [118], [119].

L'impiego di FA, come direzionante, è supportato da numerosi vantaggi, oltre alla già citata alta affinità per FAR, esso è poco immunogenico, chimicamente stabile, compatibile con ambienti sia acquosi che organici, facilmente reperibile ed a basso

costo. Inoltre, le sue ridotte dimensioni molecolari ($M = 441,4$ Da) ne favoriscono la diffusione nei tessuti e la penetrazione tumorale [140]. Tra le tre isoforme note del recettore per il folato ($FAR\alpha$, $FAR\beta$, $FAR\gamma$), $FAR\alpha$ si conferma la più rilevante in ambito oncologico per la sua marcata sovraespressione nei tumori epiteliali, con livelli che possono superare di 100–300 volte quelli riscontrati nei tessuti normali ed una densità recettoriale che può raggiungere 10 milioni di copie per cellula. $FR\beta$, invece, pur condividendo circa il 70% di omologia con $FAR\alpha$ e un'affinità simile per il folato, è espresso nei macrofagi attivati e nei TAMs, dove promuove un microambiente immunosoppressivo favorevole alla progressione tumorale [141], [143]. Di conseguenza, anche $FAR\beta$ rappresenta un bersaglio terapeutico promettente, soprattutto per strategie che mirano al microambiente tumorale piuttosto che alla cellula tumorale stessa. Al contrario, $FAR\gamma$ è una forma solubile priva di ancoraggio di membrana e di scarso interesse terapeutico [140], [143].

In sintesi, l'utilizzo di FA, come ligando nei sistemi di somministrazione per rilascio selettivo di farmaci antitumorali, ha dimostrato un'elevata efficacia sulle cellule tumorali $FAR\alpha$ -positive, offrendo una potente attività citotossica con un profilo di sicurezza favorevole [141]. Le sue caratteristiche biochimiche e farmacologiche, unite alla specificità di espressione dei suoi recettori nei tumori, rendono l'FA uno degli strumenti più promettenti per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche oncologiche mirate [119].

1.4.4. VEICOLAZIONE DEI NANOSISTEMI NELLE VIE INALATORIE

Negli ultimi decenni, i nanosistemi si sono affermati come strategie promettenti per la veicolazione di principi attivi, grazie alla loro capacità di migliorare la solubilità

di molecole scarsamente idrosolubili, proteggere i farmaci dalla degradazione enzimatica o chimica, modulare il rilascio del principio attivo e favorirne l'accumulo selettivo nei tessuti patologici [116], [122]. Tuttavia, l'applicazione diretta di sistemi nanometrici ($<1\ \mu\text{m}$) per la somministrazione inalatoria presenta una serie di limitazioni legate alle loro inadeguate proprietà aerodinamiche ed all'inalazione [145]. A causa delle loro ridotte dimensioni, infatti, le nanoparticelle inalate tendono a seguire il flusso respiratorio profondo senza depositarsi efficacemente nelle vie aeree inferiori. In particolare, le particelle con un diametro aerodinamico inferiore a 100 nm sono soggette a fenomeni di esalazione passiva e scarsa deposizione alveolare, presentando una biodisponibilità polmonare molto limitata. Inoltre, la loro elevata area superficiale specifica, vantaggiosa sotto il profilo biofarmaceutico, determina una tendenza all'agglomerazione e una difficile dispersione tramite dispositivi inalatori convenzionali (es. DPI, MDI, nebulizzatori), compromettendo l'efficienza dell'erogazione [104].

Alla luce di tali criticità, l'impiego di nanosistemi per via inalatoria richiede l'adozione di strategie formulative avanzate volte a migliorarne la performance aerodinamica e garantirne un'efficace deposizione polmonare. Tra le più consolidate, si annoverano la tecnica *Nano-into-Micro* (NiM) e la nebulizzazione di sospensioni nanometriche [105], [145].

L'approccio NiM prevede l'incorporazione dei nanosistemi all'interno di microparticelle inalabili, di dimensioni comprese tipicamente tra 1 e 5 μm , ottenute mediante processi come SD o liofilizzazione. Queste particelle composite sono generalmente costituite da matrici di eccipienti idrosolubili (ad es. mannitolo, lattosio), all'interno delle quali i nanosistemi vengono fisicamente intrappolati

[146]. Dopo l'inalazione e la deposizione nelle vie aeree, le microparticelle si dissolvono in ambiente acquoso, rilasciando le nanoparticelle funzionali [146]. L'ottimizzazione della composizione delle matrici può essere ottenuta mediante l'introduzione di agenti con azione mucolitica (come la N-acetilcisteina, NAC) [147]. Questo tipo di formulazioni permette di combinare le proprietà di aerosolizzazione delle microparticelle con i vantaggi farmacocinetici e farmacodinamici delle nanoparticelle, rappresentando una delle soluzioni più avanzate per la somministrazione inalatoria di farmaci [146].

Ad esempio, Shepard e collaboratori hanno sviluppato una formulazione inalabile di bevacizumab in polvere secca, la quale ha dimostrato una stabilità fisica di oltre sei mesi ed un'efficace penetrazione nel parenchima polmonare profondo, garantendo risultati terapeutici comparabili a dosi significativamente inferiori rispetto alla somministrazione sistemica [148].

Un'alternativa alla formulazione solida è rappresentata dalla nebulizzazione di dispersioni colloidali di nanosistemi mediante nebulizzatori a ultrasuoni o a membrana vibrante, in grado di generare aerosol con un diametro aerodinamico respirabile (1–5 μm) senza compromettere l'integrità strutturale delle nanoparticelle disperse [149], [150]. Tuttavia, questa tecnologia richiede un'attenta ottimizzazione della stabilità colloidale della formulazione, onde evitare fenomeni di sedimentazione, di aggregazione o di coalescenza durante la conservazione o il processo di nebulizzazione [149]. Inoltre, la scelta del dispositivo per l'inalazione risulta determinante, influenzando significativamente la resa in aerosol e la distribuzione del principio attivo nel tratto respiratorio [149], [150].

Entrambi gli approcci formulativi hanno mostrato risultati promettenti in studi preclinici e clinici, in particolare nel trattamento di patologie polmonari croniche e infettive, come fibrosi cistica, asma, BPCO e infezioni respiratorie ricorrenti. Recentemente, la loro applicazione è stata estesa anche alla somministrazione inalatoria di agenti antineoplastici per il trattamento del carcinoma polmonare, offrendo una via di somministrazione non invasiva, localizzata e potenzialmente meno tossica rispetto alla via sistemica [104].

In conclusione, nonostante i numerosi vantaggi offerti dai nanosistemi come piattaforme di *drug delivery*, la loro somministrazione diretta per via inalatoria come polveri, non è attualmente praticabile a causa delle sfavorevoli proprietà aerodinamiche e della bassa efficienza di deposizione polmonare. È quindi indispensabile ricorrere a strategie di formulazione razionale, come l'approccio NiM o la nebulizzazione, al fine di abilitare l'uso efficace dei nanosistemi nella terapia respiratoria e promuovere lo sviluppo di terapie inalatorie mirate per le patologie polmonari acute e croniche.

2.SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del presente studio è stato quello di sviluppare e caratterizzare sistemi nanostrutturati polimerici innovativi destinati alla somministrazione per via inalatoria di sorafenib (Sor), un inibitore multichinasico con attività antiproliferativa ed antiangiogenica, per il trattamento locale del carcinoma polmonare. La scelta di questo farmaco è stata motivata dalla sua efficacia comprovata contro il carcinoma polmonare, associata però ad una scarsa solubilità in acqua ad una bassa biodisponibilità nel tessuto polmonare ed a una elevata tossicità sistemica, che ne limitano fortemente l'uso clinico [93], [95].

Tali sistemi sono stati progettati e realizzati con lo scopo di incorporare elevate quantità di farmaco e rilasciarlo in modo controllato; le proprietà chimico-fisiche sono state opportunamente modulate allo scopo di ottenere sistemi in grado di superare le barriere biologiche, quali il muco polmonare, e interagire con le cellule tumorali [51], [151]. In particolare, sono stati sviluppati sistemi micellari polimerici e nanoparticellari partendo da materiali biocompatibili la cui struttura è altamente funzionalizzabile per ottenere *carrier* adatti ad incorporare Sor nel *core* e con proprietà di superficie adatte alla mucodiffusione.

Nella prima parte dello studio, sono state prodotte delle micelle polimeriche a partire da derivati dell'inulina (INU), un polisaccaride naturale, non tossico e biodegradabile, estratto da piante, come cicoria o dalia. L'INU è disperdibile in acqua, pertanto per ottenere un copolimero anfifilico capace di autoassemblarsi in ambiente acquoso per incorporare il Sor, è stata funzionalizzata con etilendiammina (EDA), per aumentare la reattività del polimero verso successive modificazioni chimiche. L'INU-EDA ottenuta è stata funzionalizzata con acido caprilico (C8), al

fine di inserire una componente idrofobica, e con una componente idrofila, quale il polietilenglicole-succinato (PEG-SUC). Quest'ultima modifica è stata introdotta per ottenere sia stabilità colloidale sia capacità di diffusione attraverso il muco, sfruttando la biocompatibilità dell'inulina e la nota proprietà del PEG di minimizzare le interazioni non specifiche con il muco. La struttura del copolimero INU-EDA-C8-PEG risultante è riportata in **Fig.13**.

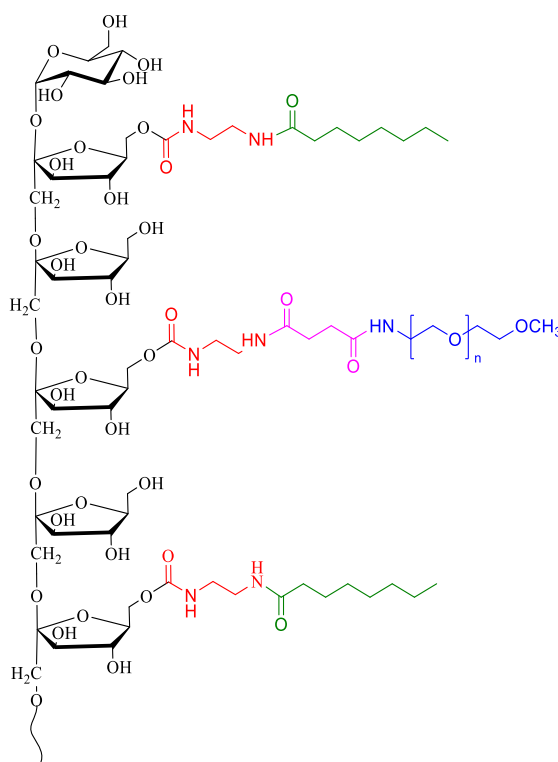


Fig.13: Struttura chimica del copolimero INU-EDA-C8-PEG (n=44)

Le micelle ottenute sono state caratterizzate allo scopo di valutarne la concentrazione critica di aggregazione (CAC), la dimensione delle particelle, la carica superficiale ed il PDI, tutti parametri cruciali che influenzano la diffusione polmonare e la penetrazione attraverso lo strato di muco. La percentuale di caricamento del farmaco (DL%) e l'efficienza di incapsulazione (EE%) sono state

quantificate per ottimizzare la capacità del sistema di caricare Sor nel *core* idrofobico, garantendo un rilascio prolungato e potenzialmente riducendo la dose terapeutica totale.

Gli studi di rilascio in vitro, eseguiti in fluidi polmonari simulati che mimano sia ambienti polmonari sani (SLF4) sia tumorali (*buffer* citrato), hanno permesso di definire un profilo di rilascio controllato e sostenuto, coerente con la necessità terapeutica di mantenere una concentrazione locale costante nel tempo. È interessante notare che la velocità di rilascio è stata maggiore nel mezzo simulante il microambiente tumorale. La capacità di diffondere attraverso il muco è stata studiata mediante turbidimetria e test di diffusione nelle celle di Franz.

La caratterizzazione aerodinamica, condotta mediante *Andersen Cascade Impactor* (ACI), su una dispersione acquosa di micelle nebulizzate ha dimostrato le potenzialità della formulazione di depositarsi nel polmone profondo. Infine, i saggi di citotossicità sono stati condotti su cellule epiteliali bronchiali sane (16HBE) e su cellule di carcinoma polmonare (A549) per valutare la biocompatibilità del *carrier* e l'attività del farmaco quando veicolato dal *carrier* micellare rispetto a quello libero. I risultati hanno dimostrato che il Sor incorporato nelle micelle polimeriche ha un'attività antitumorale paragonabile a quella del farmaco libero su cellule tumorali, mentre una tossicità ridotta su cellule epiteliali sane rispetto al farmaco libero.

La seconda parte dello studio si è concentrata sulla progettazione di sistemi nanoparticellari per il *targeting* attivo delle cellule tumorali polmonari mediante l'uso di acido folico (AF) come ligando direzionante. A questo scopo, è stato sintetizzato un nuovo copolimero costituito da un *backbone* di α,β -poli(N-2-

idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA), funzionalizzato con catene di acido polilattico-*co*-glicolico (PLGA) e catene di polietilenglicole-folato (PEG-FA). Questa architettura è stata progettata per combinare in un unico sistema l'idrofobicità del PLGA, le proprietà *stealth* e di stabilità del PEG e la capacità di *targeting* di FA, che riconosce i recettori del folato sovraespressi sulla superficie di molte cellule tumorali. La struttura del copolimero *graft* PHEA-*g*-PLGA-*g*-PEG-FA risultante è riportata in figura **Fig.14**.

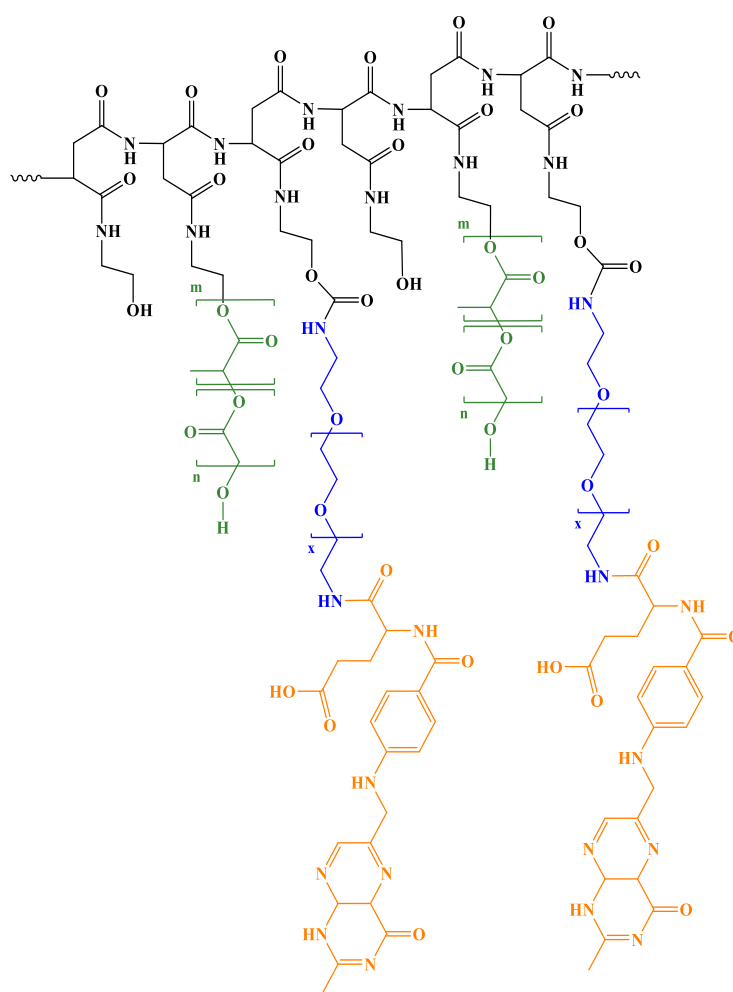


Fig.14: Struttura chimica del copolimero *graft* PHEA-*g*-PLGA-*g*-PEG-FA ($n=m=92$; $x=44$).

Le nanoparticelle sono state ottenute mediante nanoprecipitazione e sono state caratterizzate mediante misure di *dynamic light scattering* (DLS) e di potenziale Z, per valutare la dimensione delle particelle, la carica superficiale e il PDI, tutti parametri cruciali che influenzano la diffusione polmonare e la penetrazione attraverso lo strato di muco. Gli studi di rilascio del farmaco incorporato condotti sia in SLF4 sia in tampone citrato ha pH 5,5, hanno evidenziato un profilo di rilascio sostenuto, coerente con la necessità terapeutica di mantenere una concentrazione locale costante nel tempo. È interessante notare che la velocità di rilascio è stata maggiore nel mezzo che simula il microambiente tumorale.

I test di interazione con la mucina hanno permesso di valutare la capacità del sistema di attraversare la barriera mucosa senza fenomeni di aggregazione.

Dal punto di vista biologico, gli studi di citotossicità hanno dimostrato che le FA-PPP-NPs@Sor inducono un marcato effetto antiproliferativo sulle cellule A549, mostrando una tossicità significativamente ridotta verso le cellule sane. Gli studi di *uptake* cellulare e di inibizione del recettore del folato hanno confermato l'aumentata internalizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate con FA rispetto a quelle che non lo presentano, indicando il coinvolgimento del recettore nel processo di internalizzazione cellulare delle nanoparticelle. Inoltre, i saggi di migrazione cellulare, lo *scratch test*, hanno supportato la capacità del sistema nanoparticellare contenente Sor di interferire con i processi di adesione e migrazione cellulare, suggerendo un potenziale effetto antimetastatico.

In una fase successiva, le nanoparticelle sono state incorporate in matrici microparticellari mediante tecnica dello *spray drying* (SD), secondo la strategia

Nano-into-Micro (NiM), al fine di ottenere una formulazione in polvere idonea per la somministrazione tramite inalatore di polvere secca (DPI).

Eccipienti funzionali, tra cui mannitolo (MAN), leucina (LEU), N-acetil cisteina (NAC) e l'agente porogeno bicarbonato di ammonio (AB), sono stati impiegati per migliorare la scorrevolezza la disperdibilità e la ridispersione della polvere. Le analisi morfologiche hanno confermato la forma sferica, mentre i dati del *Andersen Cascade Impactor* hanno dimostrato un comportamento aerodinamico compatibile con la deposizione nel polmone profondo.

Complessivamente, questo lavoro ha validato un approccio terapeutico innovativo basato sulla somministrazione inalatoria di Sor mediante *carrier* nanostrutturati polimerici. Le micelle a base di INU rappresentano una piattaforma di veicolazione in grado di diffondere attraverso il muco e di essere efficace contro le cellule tumorali, mentre le nanoparticelle funzionalizzate con FA introducono la possibilità di *targeting* molecolare attivo e rilascio prolungato polmonare del farmaco, somministrabili in forma di polvere secca.

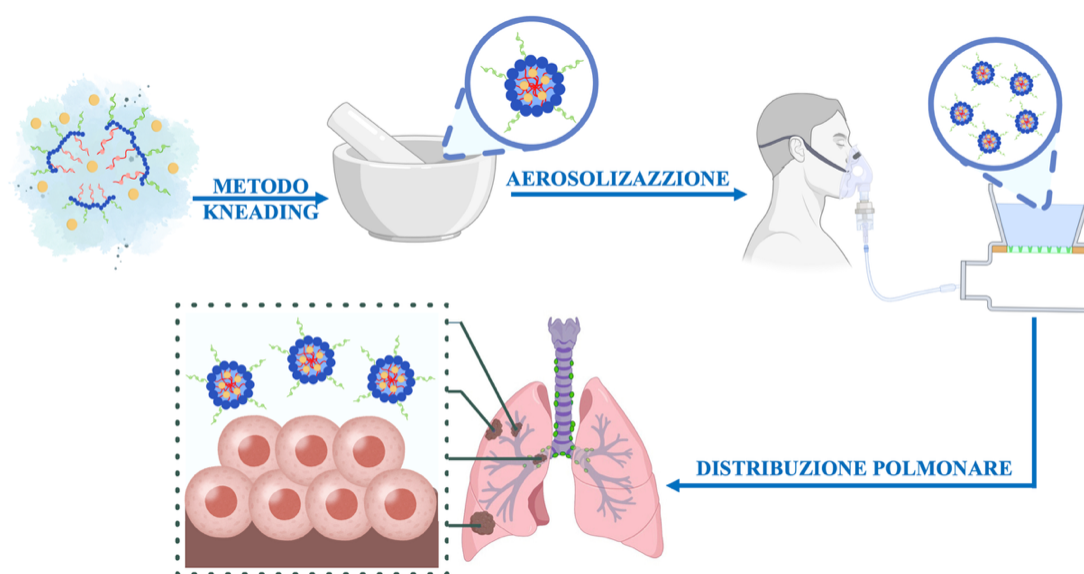
In sintesi, i risultati ottenuti confermano che l'impiego di sistemi polimerici nanostrutturati rappresentano potenzialmente una strategia di veicolazione di farmaci antitumorali come il Sor nel trattamento del carcinoma polmonare. L'incorporazione di tali sistemi in liquidi o in particelle solide inalabili ha permesso di produrre delle formulazioni potenzialmente somministrabili localmente mediante inalazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

3.MICELLE POLIMERICHE A BASE DI INULINA (INU)

In questo lavoro è descritta la produzione e la caratterizzazione di una formulazione inalabile costituita da una dispersione acquosa di micelle polimeriche contenenti Sorafenib (Sor), somministrate attraverso nebulizzazione.

La rappresentazione schematica della produzione della formulazione e del processo di nebulizzazione è riportata nello **Schema 1**.



Schema 1. Rappresentazione schematica della produzione delle micelle (INU-EDA-C8-PEG@Sor) e della loro nebulizzazione.

3.1.SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL INU-EDA-C8-PEG

Per ottenere micelle polimeriche, è stato progettato e sintetizzato un copolimero a partire dall'inulina (INU) ($\bar{M}_w$ 5.000 Da) funzionalizzata opportunamente con una componente idrofobica, e con un polimero idrofilo allo scopo di ottenere micelle autoassemblanti in grado di incorporare il Sor nel core micellare.

Il *backbone* polimerico INU, è stato scelto per la sua biocompatibilità, essenziale per la somministrazione polmonare, e per la sua versatilità chimica, poiché ogni unità ripetitiva contiene tre gruppi ossidrilici funzionalizzabili, uno primario e due secondari (**Fig.15**) [152].

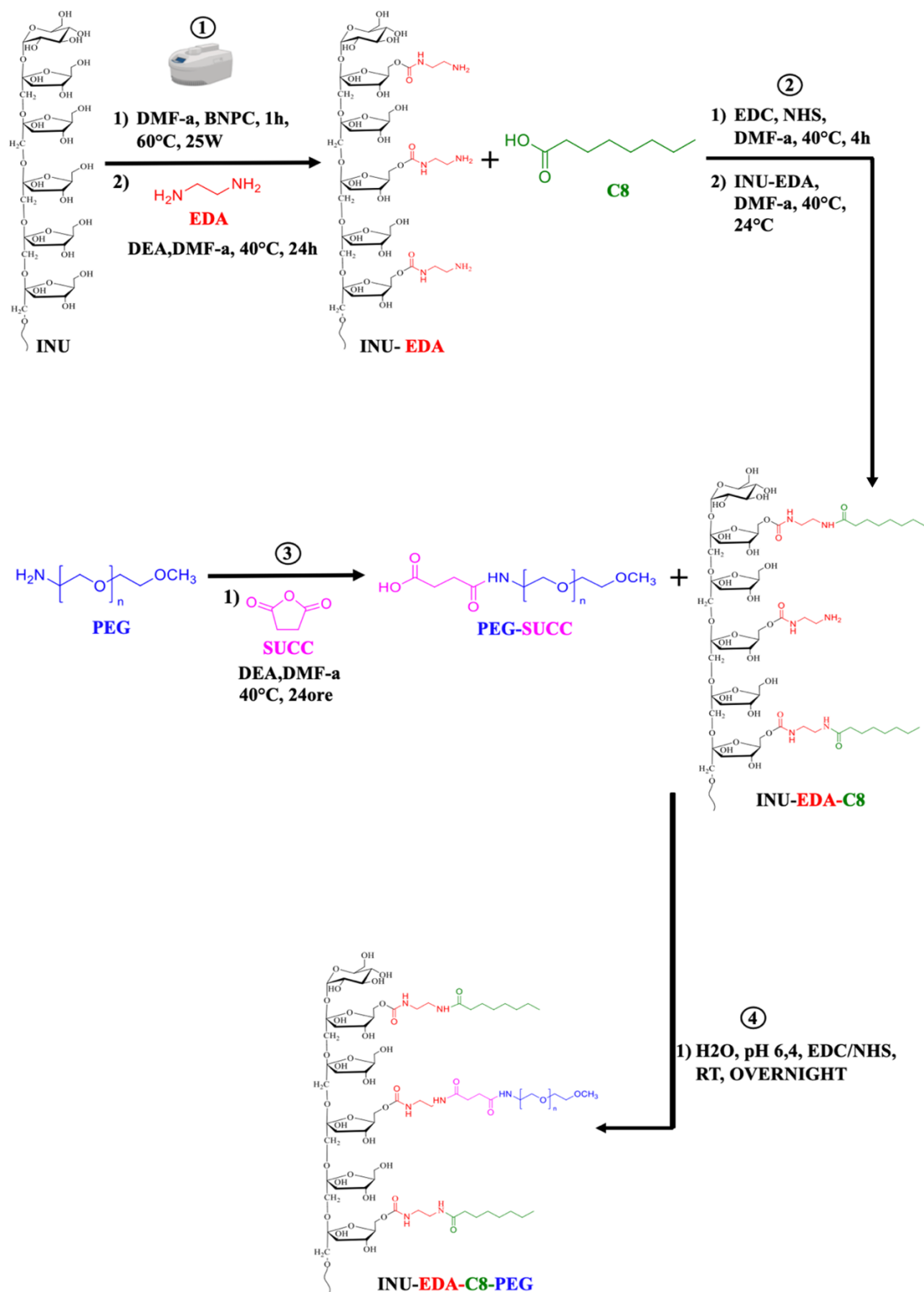


Fig.15: Procedura sintetica di INU-EDA-C8-PEG (n=44).

L'INU è stata funzionalizzata con l'etilendiammina (EDA) mediante l'uso del paranitro-fenil carbonato (BNPC) come attivante. Il processo di attivazione è stato condotto attraverso l'uso di un microonde (CEM Discover Microwave Reactor) ad una potenza di 25 W, a 60°C per 1h, monitorando la temperatura della reazione mediante raffreddamento con flusso ad aria compressa esterna, al fine di rendere questa fase più veloce. Al termine dell'attivazione, alla miscela di reazione è stata aggiunta EDA al fine di ottenere il copolimero INU-EDA ($M_w=2,67$ KDa) che risulta essere più reattivo nei confronti dell'acido caprilico (C8) (**Fig.15 step 1**). Quest'ultimo è stato coniugato su INU-EDA tramite una reazione di *coupling* mediata da 1-etil-3(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide ed N-idrossisuccinimide (EDC-NHS) (**Fig.15 step 2**). Al termine della reazione è stato ottenuto il copolimero INU-EDA-C8 ($M_w=3,92$ KDa) allo scopo di ottenere un copolimero anfifilico in grado di autoassemblarsi in ambiente acquoso, incorporando nel core idrofobico il Sor.

Per ottenere una micella polimerica con uno *shell* idrofilo potenzialmente capace di diffondere attraverso il muco, l'INU-EDA-C8 è stato funzionalizzato con un derivato di polietilenglicole-succinato (CH₃O-PEG-SUC) (**Fig.15 step 4**), precedentemente ottenuto con un grado di mono-derivazione in SUC (%DD_{SUC}) pari al 100%, come descritto nella parte sperimentale (**Fig.15 step 3**).

Il copolimero ottenuto INU-EDA-C8-PEG è stato caratterizzato mediante spettroscopia ¹H-NMR, mediante la quale è stato calcolato il grado di derivatizzazione in EDA, C8 e PEG-SUC (%DD_{EDA}, %DD_{C8} e %DD_{PEG}). In particolare, DD_{EDA} in mol% è stato calcolato confrontando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3,2 e 2,8 (4H, NH-CH₂-CH₂-NH₂) , assegnati all'EDA, con

l'integrale del picco relativo ai protoni a δ 3,46 e 5,3 (7H, INU) all'INU. Il valore è risultato pari a $22,0 \pm 0,4$ mol%, corrispondente a circa 6 molecole di EDA per macromolecola (**Fig.16**).

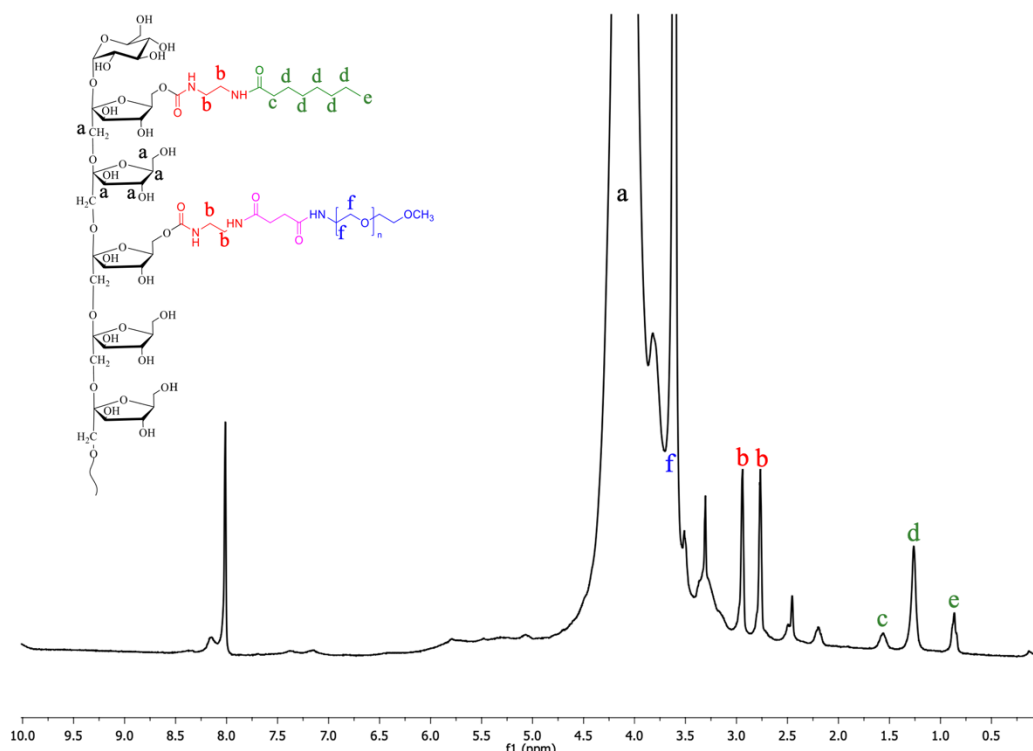


Fig.16: Spettro ¹H-NMR dell'INU-EDA-C8-PEG con relative attribuzioni.

Il DD_{C8} in mol% è stato calcolato confrontando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 1,5 (2H, NH-C(O)-CH₂-(CH₂)₅-CH₃), 1,25 (10H, NH-C(O)-CH₂-(CH₂)₅-CH₃), 0,89 (3H, NH-C(O)-CH₂-(CH₂)₅-CH₃) assegnati a C8 con l'integrale del picco relativo ai protoni a δ 3,47 e 5,4 (7H, INU) assegnati all' INU, corrispondente a circa 1 molecole di C8 per macromolecola (**Fig.16**). Il DD_{PEG} mol% è stato calcolato confrontando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3,50 (4H, CH₃-O-(CH₂-CH₂)₄₄-O) assegnati al PEG con l'integrale del picco relativo ai protoni a δ 3,47-5,4 (7H, INU) assegnati all' INU, corrispondente a circa 1 molecole di PEG per macromolecola (**Fig.16**).

Il peso molecolare medio ($\bar{M}_w$) di INU-EDA-C8-PEG, determinato tramite SEC, è risultato pari a 5.393 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1,21$). In conclusione, i risultati ottenuti dalle analisi $^1\text{H-NMR}$ e dalla cromatografia SEC concordano nel confermare l'avvenuta funzionalizzazione dell'INU con le altre molecole. L'osservazione di specifici segnali nello spettro $^1\text{H-NMR}$, insieme all'incremento del peso molecolare rilevato, fornisce una solida evidenza della corretta sintesi, funzionalizzazione e della formazione del copolimero INU-EDA-C8-PEG.

3.2.CONCENTRAZIONE DI AGGREGAZIONE CRITICA (CAC)

La formazione di micelle in ambiente acquoso è stata studiata mediante analisi di fluorescenza utilizzando il pirene come sonda fluorescente. Il pirene, essendo una molecola idrofoba, tende a segregarsi dalla soluzione acquosa mediante incorporazione nelle micelle polimeriche, modificando così le sue proprietà di fluorescenza. In effetti, nello spettro di emissione il rapporto di intensità I_{11}/I_{13} del pirene passa da circa 1,8 in acqua a circa 0,6 in solventi non polari, come l'esano [153]. La **Fig.17** mostra le curve, utilizzabili per la determinazione della CAC, del rapporto I_{338}/I_{332} ottenuto dagli spettri di eccitazione e del rapporto I_{373}/I_{384} ottenuto dagli spettri di emissione del pirene registrati a 37°C, in funzione del logaritmo delle concentrazioni del copolimero. Lo spettro di eccitazione descrive l'andamento dell'intensità di fluorescenza in funzione della lunghezza d'onda di eccitazione, mantenendo costante una determinata lunghezza d'onda di emissione, generalmente corrispondente al massimo di fluorescenza della sonda utilizzata (pirene).

Quando si aumenta la concentrazione di un copolimero in soluzione, e ci si avvicina alla CAC, la sonda fluorescente, inizialmente dispersa in un ambiente acquoso,

altamente polare, tende a localizzarsi all'interno delle micelle che si stanno formando. Il passaggio della sonda in questa nuova regione si riflette in modifiche caratteristiche dello spettro di eccitazione, come variazioni dell'intensità relativa e spostamenti della lunghezza d'onda a cui si osserva il massimo assorbimento. Tali variazioni permettono di individuare con precisione il punto di transizione, fornendo così una chiara indicazione dell'inizio dell'aggregazione micellare, e quindi della CAC del sistema analizzato.

Parallelamente, lo spettro di emissione descrive l'intensità della fluorescenza in funzione della lunghezza d'onda di emissione, mentre si mantiene costante una specifica lunghezza d'onda di eccitazione, scelta generalmente in corrispondenza del massimo di assorbimento della sonda (pirene). Anche in questo caso, il comportamento della sonda varia al cambiare dell'ambiente chimico, infatti nel passaggio da un mezzo polare, come l'acqua, a uno meno polare, come l'interno della micella, si osservano variazioni nella forma dello spettro, nella posizione del massimo di emissione, oppure nell'intensità complessiva della fluorescenza.

Questi cambiamenti sono particolarmente utili per identificare il punto in cui la sonda abbandona l'ambiente acquoso e viene inglobata all'interno delle strutture micellari, confermando la formazione degli aggregati e contribuendo alla determinazione della CAC.

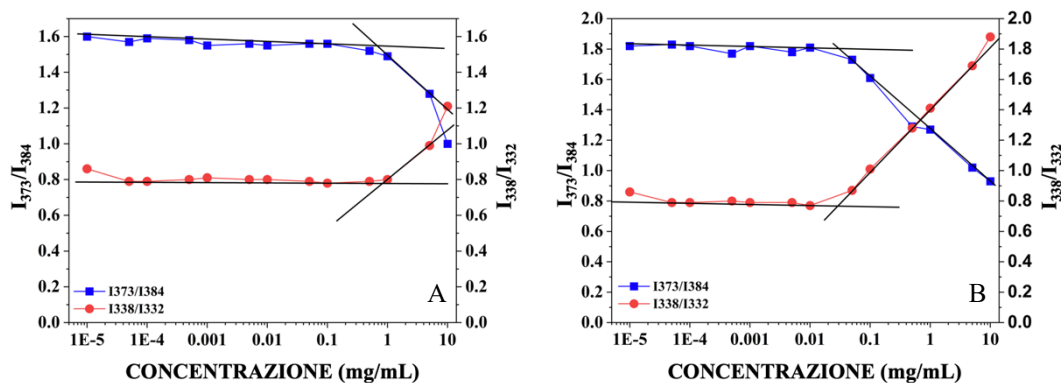


Fig.17: Profilo di rapporto di intensità dei picchi dello spettro di eccitazione (I_{338}/I_{332}) e di emissione (I_{373}/I_{384}) del pirene in funzione del log della concentrazione (mg/ml) di INU-EDA-C8 (A) e INU-EDA-C8-PEG (B).

La CAC è stata determinata tramite l'intersezione della tangente alla curva nel punto di flesso con la tangente orizzontale tracciata attraverso i punti a basse concentrazioni ed il valore medio calcolato per le micelle di INU-EDA-C8-PEG è risultato pari a $5,3 \cdot 10^{-6}$ mM.

Come controllo lo stesso procedimento è stato applicato al polimero non peghilato INU-EDA-C8 ed il valore medio calcolato per questo sistema è risultato pari a $2,2 \cdot 10^{-4}$ mM.

3.3.PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE MICELLE DI INU-EDA-C8-PEG

Una volta sintetizzato e caratterizzato, il copolimero INU-EDA-C8-PEG è stato utilizzato per ottenere micelle polimeriche mediante il metodo kneading [128], [130]. Questo approccio consente la formazione di micelle stabili in ambiente acquoso, grazie alle proprietà fisico-chimiche del polimero sintetizzato, con

simultaneo incapsulamento del farmaco altamente idrofobico (Sor) all'interno del nucleo idrofobico durante il processo di autoaggregazione delle catene polimeriche. Il processo ha dimostrato una alta efficienza, essendo il recupero pari al 94% in peso dopo la liofilizzazione. La quantità di farmaco incorporata (DL%) e l'efficienza di incapsulamento (EE%) delle micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor, determinati tramite HPLC, sono risultati rispettivamente pari al 7,9% e al 79,4% in peso (**Tab.5**), confermando che il metodo di kneading è idoneo al caricamento di Sor nelle micelle di INU-EDA-C8-PEG.

Con la stessa procedura ma in assenza di Sor sono state preparate le micelle vuote. Una volta ottenute sia le micelle vuote che piene, chiamate rispettivamente INU-EDA-C8-PEG ed INU-EDA-C8-PEG@Sor, sono state caratterizzate mediante DLS.

Come mostrato nella **Tab.5**, il campione INU-EDA-C8-PEG@Sor presenta, prima della liofilizzazione, un diametro medio di circa 195 nm, superiore rispetto a quello delle INU-EDA-C8-PEG vuote. Questa maggiore dimensione suggerisce che la presenza di Sor influenzi il processo di formazione delle micelle. Inoltre, il potenziale- ζ delle micelle cariche di farmaco è pari a $-6,9 \pm 2,2$ mV, valore simile rispetto a quello delle micelle vuote ($-6,9 \pm 2,2$ mV). Lo stesso studio è stato effettuato post liofilizzazione ed i dati sono riportati in **Tab.5**. Come si può costatare le dimensioni delle micelle post liofilizzazione aumentano leggermente per entrambi i campioni ma, nonostante l'aumento dimensionale, le micelle caricate con Sor mantengono un basso parametro di polidispersione, mentre il potenziale- ζ per entrambi i campioni rimane pressoché uguale.

Tab.5: Dimensione media (Za), PDI, potenziale- ζ , delle micelle vuote di INU-EDA-C8-PEG e delle micelle piene di INU-EDA-C8-PEG@Sor in dispersione acquosa, prima e dopo liofilizzazione e DL%, EE% e resa % p/p dopo liofilizzazione.

Campione	INU-EDA-C8-PEG	INU-EDA-C8-PEG @Sor
	Pre- liofilizzazione	
Za (nm)	104,0 $\pm$ 5,62	195,3 $\pm$ 14.5
PDI	0,23	0,26
Potenziale-ζ (mV)	-6,6 $\pm$ 5.01	-6,9 $\pm$ 2.2
	Post- liofilizzazione	
Za (nm)	122,0 $\pm$ 8,42	216,1 $\pm$ 3,5
PDI	0,37	0,16
Potenziale-ζ (mV)	-7,5 $\pm$ 3,41	-7,1 $\pm$ 3,2
DL%	-----	7,9
EE%	-----	79,4
Resa % (p/p)	90,0 $\pm$ 5,2	94,0 $\pm$ 3,6

3.4.STUDI DI RILASCIO

Allo scopo di valutare la cinetica di rilascio del farmaco dalle micelle, è stato condotto uno studio utilizzando due diversi mezzi, il fluido polmonare simulato (SLF4, pH 7,4), e il tampone citrato (pH 5,5), per mimare il microambiente extracellulare e tumorale [154]. Entrambi i mezzi sono stati addizionati con siero fetale bovino (FBS) in rapporto 50:50 (v/v). I risultati, riportati in **Fig.18**, mostrano che il farmaco è stato rilasciato in modo controllato, senza un effetto "*burst*".

Inoltre, dopo 24 ore di incubazione, il 4,3% di Sor è stato rilasciato nel mezzo SLF4:FBS mentre il 16,6% nel mezzo a pH 5,5. Il rilascio significativamente più elevato a pH 5,5, mimante il microambiente tumorale, rispetto a quello a pH 7,4, mimante le condizioni fisiologiche polmonari, può essere potenzialmente vantaggioso in quanto la veicolazione del farmaco nelle micelle può determinare un effetto tossico maggiore nel sito tumorale rispetto che nei tessuti sani. Questo effetto è dovuto alla maggiore solubilità del Sor a pH acidi, permettendo al farmaco di diffondere più agevolmente dalle micelle verso la massa tumorale.

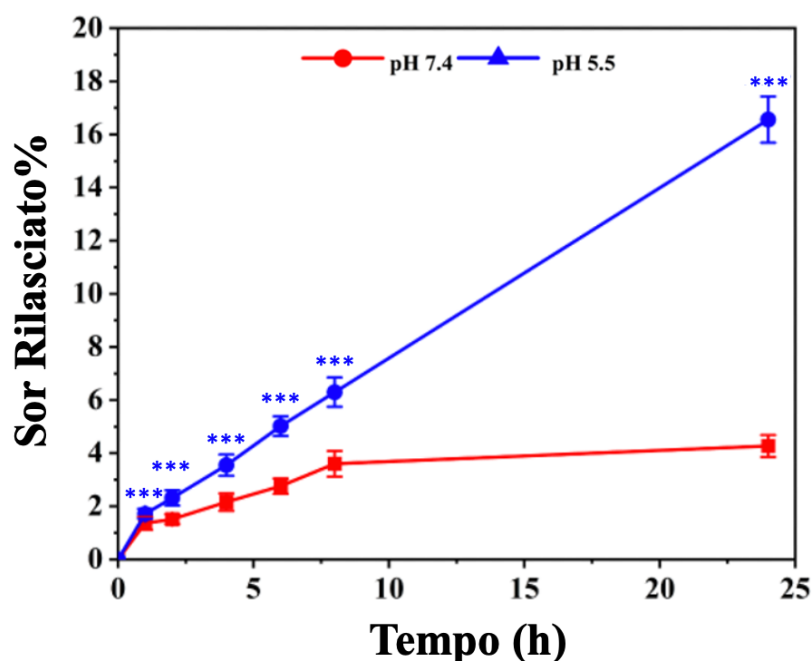


Fig.18: Profilo di rilascio di Sorafenib dal campione INU-EDA-C8-PEG @Sor a pH 7,4 in fluido polmonare simulato (SLF4) (rosso) e a pH 5,5 in tampone citrato (blu) a 37°C, in funzione del tempo di incubazione (n = 3) (***) $p < 0,001$ (*%Sor rilasciato a pH 5,5 vs %Sor rilasciato a pH 7,4).

3.5.INTERAZIONE CON LA MUCINA

3.5.1.ANALISI TURBIDIMETRICA

Dato che queste micelle sono progettate per la somministrazione polmonare, è stato fondamentale verificare l'entità delle interazioni con lo strato di muco delle vie respiratorie. Una penetrazione efficiente attraverso questa barriera è infatti requisito cruciale per i nanocarrier destinati alla somministrazione locale polmonare, poiché consente loro di diffondere attraverso il muco e raggiungere le cellule epiteliali sottostanti che rappresentano il target biologico.

In particolare, è stata eseguita un'analisi turbidimetrica in presenza di mucina, il componente principale del muco polmonare, monitorando la trasmittanza a 650 nm di dispersioni acquose contenenti mucina e micelle vuote o contenenti Sor per oltre 3 ore, utilizzando una dispersione di mucina come bianco. Per confronto, la stessa analisi è stata effettuata con micelle non peghilate ottenute da INU-EDA-C8. I dati sono stati rappresentati in un grafico come andamento del rapporto tra la trasmittanza del campione disperso in un mezzo contenente mucina e quella del bianco in funzione del tempo di incubazione. Come mostrato in **Fig.19**, i valori del rapporto di trasmittanza per le micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor e INU-EDA-C8-PEG sono rimasti immutati nel *range* temporale considerato e prossimi a 1, indicando un'interazione delle micelle sia vuote che piene trascurabile con la mucina. Al contrario, le micelle di INU-EDA-C8 (non peghilate) hanno mostrato una forte interazione evidenziata da un rapporto di trasmittanza significativamente ridotto, dovuto ad un aumento della torbidità del mezzo di dispersione a causa di forti interazioni micella non peghilata–mucina. Questi risultati concordano con studi precedenti che dimostrano come la peghilazione superficiale riduca la

mucoadesione, formando una corona idrofila e non adesiva che limita le interazioni non specifiche con i componenti del muco [155], [156], [157]. Pertanto, le micelle di INU-EDA-C8-PEG presentano proprietà idonee per la somministrazione locale polmonare di Sor nella terapia anticancro.

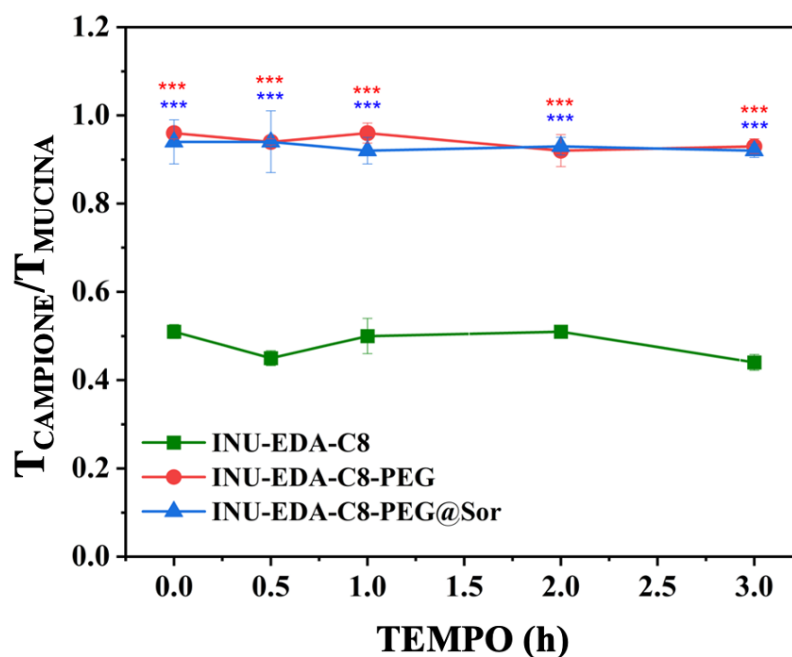


Fig.19: Analisi turbidimetrica della dispersione di mucina (1 mg/mL) in presenza dei campioni INU-EDA-C8-PEG@Sor, INU-EDA-C8-PEG e INU-EDA-C8 in funzione del tempo di incubazione. I valori sono espressi come rapporto tra la trasmittanza dei campioni in mucina rispetto alla trasmittanza dei campioni in acqua. (***) $p < 0,001$ (*INU-EDA-C8-PEG vs INU-EDA-C8; *INU-EDA-C8-PEG@Sor vs INU-EDA-C8).

3.5.1. STUDIO DI MUCO-DIFFUSIONE DELLE MICELLE MEDIANTE CELLE DI FRANZ

Un'altra tecnica per valutare la capacità delle micelle di diffondere attraverso uno strato di muco prevede l'uso delle celle di Franz [158]. Seguendo la procedura

riportata nella parte sperimentale, è stata valutata la capacità diffusiva delle micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor attraverso uno strato di muco, usando il solo Sor come controllo. Come riportato in **Fig.20**, le micelle presentano una capacità diffusiva significativamente superiore al farmaco, raggiungendo dopo 24 ore un valore del $83,4 \pm 3,2\%$ rispetto al $32,3 \pm 1,2\%$ del farmaco libero. Questo test dimostra che la veicolazione mediante un *carrier* micellare oltre ad aumentare la solubilità apparente del Sor, ne aumenta la mucodiffusione, permettendo potenzialmente al farmaco di raggiungere l'epitelio polmonare.

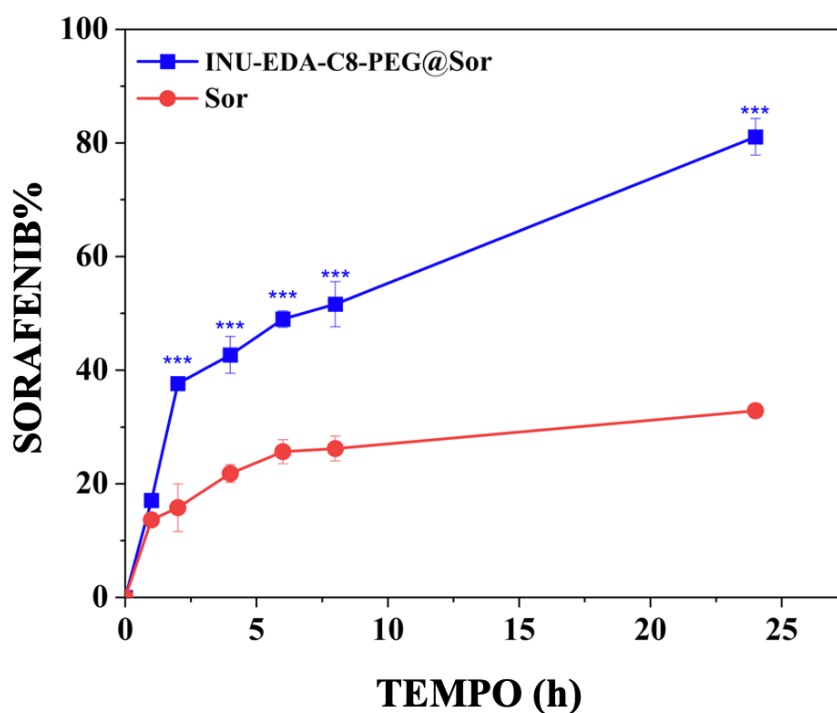


Fig.20: Test di mucodiffusione mediante l'uso delle celle di Franz, in campioni INU-EDA-C8-PEG@Sor e Sor in funzione del tempo di incubazione. I valori sono espressi come % di Sor rilevato nel compartimento donatore. (***) $p < 0,001$ (*INU-EDA-C8-PEG@Sor vs Sor).

3.6.ANDERSEN CASCADE IMPACTOR

Dopo avere valutato le potenzialità delle micelle di INU-EDA-C8-PEG come *carrier* per il Sor e dopo aver valutato la somministrazione polmonare in termini di mucodiffusione ed il rilascio controllato del farmaco in esse incorporato, è stata investigata la possibilità di somministrare le micelle nell'albero bronchiale. In particolare, le micelle sono state disperse in acqua e la deposizione nell'albero bronchiale è stata simulata mediante un *Andersen Cascade Impactor* (ACI) per nebulizzazione della dispersione ottenuta usando un nebulizzatore Kramer new basic 3000.

La **Fig.21** mostra la distribuzione percentuale della deposizione del Sor dopo nebulizzazione nei vari stadi dello strumento, mentre i parametri di *performance* aerodinamica del prodotto nebulizzato sono riassunti nella **Tab.6**. Secondo le linee guida regolatorie attuali e la letteratura, le caratteristiche del prodotto nebulizzato nel polmone profondo dovrebbero tipicamente presentare valori di MMAD compresi tra 1 e 5 μm e valori di FPF% superiori al 30% per garantire una adeguata deposizione della formulazione, e quindi del farmaco nelle vie respiratorie inferiori [159]. Le micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor soddisfano questi criteri, essendo il MMAD pari a $1,77 \pm 0,01 \mu\text{m}$ e la FPF pari al $97\% \pm 0,19$ circa del totale. Pertanto, la formulazione sviluppata mostra elevate potenzialità per la somministrazione polmonare di Sor mediante inalazione, riducendo la tossicità dovuta alla somministrazione sistemica del farmaco ed aumentandone la localizzazione al polmone.

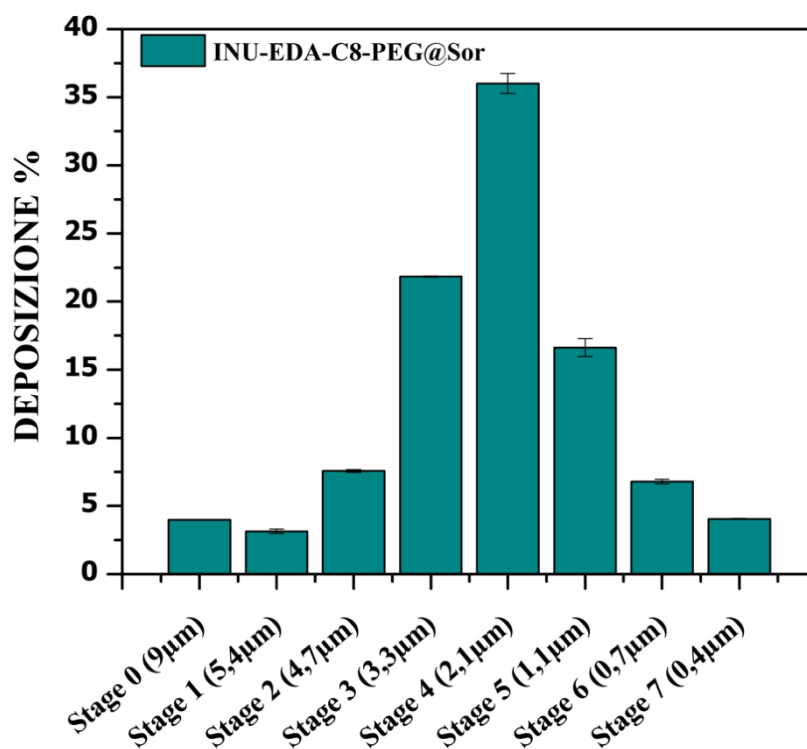


Fig.21: Percentuale di deposizione delle micelle nebulizzate negli stadi con diversi cut-off dell'Andersen Cascade Impactor (ACI),

Tab.6: Parametri di aerosolizzazione ottenuti dall'analisi con l'ACI.

Nome campione	FPF %	MMAD (µm)	GSD
INU-EDA-C8-PEG@Sor	97,0±0,19	1,77±0,01	1,99±0,07

3.7.STUDI DI CITOTOSSICITÀ

Per valutare la capacità del Sor, trasportato da micelle, di accumularsi selettivamente nelle cellule tumorali rispetto a quelle sane, è stato effettuato un test di citotossicità in vitro sia su cellule tumorali polmonari umane (A549) sia su cellule epiteliali bronchiali sane (16HBE). La linea cellulare A549 è stata scelta come modello di cellule tumorali [160], [161], mentre le cellule 16HBE rappresentano un

modello di cellule polmonari non tumorali [162], [163]. In un primo esperimento, è stata valutata la citocompatibilità delle micelle vuote tramite saggio MTS sulle linee cellulari selezionate, incubando queste ultime con concentrazioni crescenti di INU-EDA-C8-PEG vuote, da 0,08 mg/mL a 0,8 mg/mL, per 24 e 48 ore. I risultati hanno indicato un'alta citocompatibilità delle micelle vuote nelle condizioni testate (Fig.22 A-B rosso).

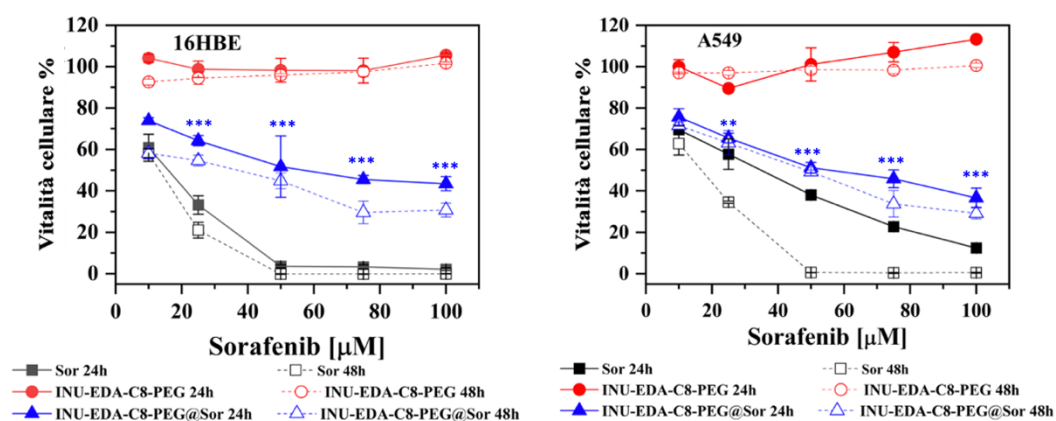


Fig.22: Effetto antitumorale in vitro su 16HBE (A) e A549 (B) trattate con INU-EDA-C8-PEG@Sor, INU-EDA-C8-PEG e Sor per 24 ore (linee continue) e 48 ore (linee tratteggiate) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (*INU-EDA-C8-PEG@Sor 24/48h vs Sor 24/48).

Successivamente le due linee cellulari sono state incubate con Sor libero o incorporato nelle micelle polimeriche (INU-EDA-C8-PEG@Sor), confrontando le stesse concentrazioni di Sor da 10 a 100 μM . I risultati ottenuti riportati in **Fig.22 A e B** indicano che il Sor veicolato tramite micelle induce una citotossicità complessivamente inferiore rispetto alla forma libera del farmaco, mantenendo un effetto simile sulle cellule tumorali A549 e su quelle sane 16HBE. In particolare, la riduzione della citotossicità del Sor incorporato nelle micelle rispetto al farmaco

libero è più evidente sulle cellule sane di epitelio bronchiale (16HBE). Come riportato nella **Tab.7**, l'IC₅₀ e l'inibizione massima (Imax) per INU-EDA-C8-PEG@Sor nelle cellule 16HBE, dopo 48 ore di incubazione, sono stati rispettivamente 36,4±3,1 e 69,2%, entrambi significativamente migliori in termini di sicurezza rispetto al Sor libero, che ha mostrato un IC₅₀ di 36,4±3,1 µM e un Imax di 69,2 % dopo 48 ore.

Tab.7: Concentrazione inibitoria al 50% (IC₅₀) e inibizione massima della crescita cellulare (I_{max}%) calcolate per Sor libero e FA-PPP-NP@Sor sulle linee cellulari 16HBE e A549.

Linea cellulare	Campione	IC ₅₀ 24h (µM)	Imax 24h (%)	IC ₅₀ 48h (µM)	Imax 48h (%)
16 HBE	Sor	16,1±0,1	97,8±1,5	13,1±2,3	100±1,1
	INU-EDA-C8-PEG @Sor	56,1±1,2	56,6±2,4	36,4±3,1	69,2±2,7
A549	Sor	35,2±0,4	87,6±1,8	16,8±1,2	100±1,9
	INU-EDA-C8-PEG @Sor	55,7±0,3	63,3±3,1	48,0±3,2	79,9±3,5

Le cellule tumorali A549 hanno mostrato una sensibilità verso le micelle polimeriche (**Fig.22B**), con un IC₅₀ di 48,0±3,2 µM e un Imax del 79,9% dopo 48 ore di incubazione. Questi valori sono stati inferiori rispetto al Sor libero, che ha mostrato un IC₅₀ di 16,8±1,2 µM e un Imax del 100% dopo 48 ore. Questo effetto è probabilmente dovuto al rilascio controllato del Sor da parte delle micelle, a differenza del farmaco libero che è immediatamente disponibile.

3.8.CONCLUSIONI

In questo studio è stata sviluppata e caratterizzata con successo una formulazione a base di micelle contenenti Sor per il trattamento locale del carcinoma polmonare.

Le micelle sono state prodotte a partire da un copolimero ottenuto mediante funzionalizzazione chimica dell'inulina (INU), con etilendiammina (EDA), per rendere il polimero più reattivo alle successive funzionalizzazioni; con acido caprilico (C8), per rendere il copolimero adatto alla formazione di micelle in mezzo acquoso capaci di incorporare farmaci idrofobici; con polietilenglicole-succinato (CH₃O-PEG-SUCC), per aumentare l'idrofilia superficiale delle micelle e ridurre le interazioni con la mucina.

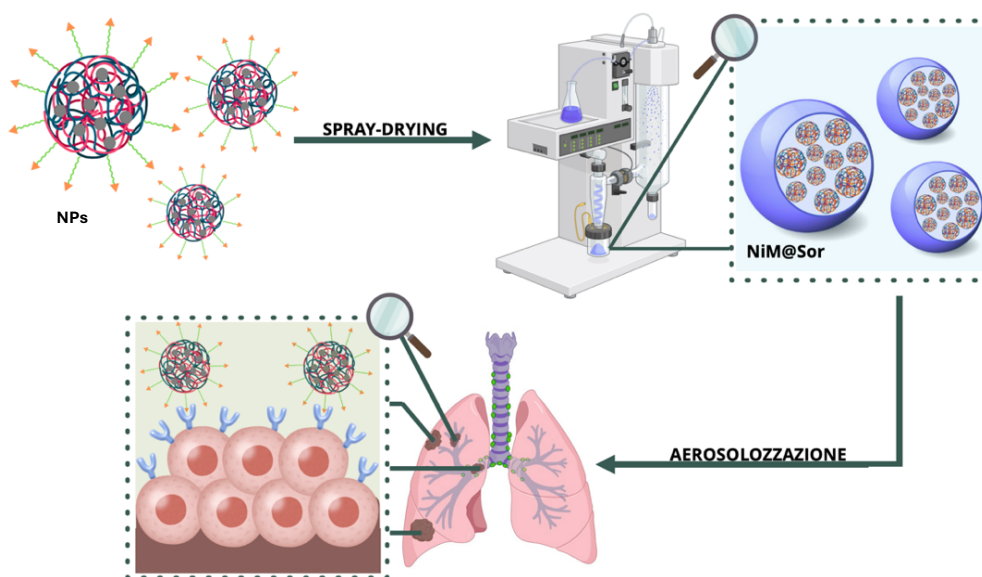
Le micelle ottenute dal copolimero INU-EDA-C8-PEG hanno mostrato un'elevata *drug loading* e un profilo di rilascio controllato del farmaco. La peghilazione superficiale ha garantito interazioni minime con la mucina, favorendo la penetrazione nello strato di muco polmonare.

La caratterizzazione biologica in vitro ha dimostrato una citotossicità delle INU-EDA-C8-PEG@Sor verso le cellule tumorali polmonari (A549), minore rispetto a quella ottenuta con Sor libero. Per ottimizzare la somministrazione polmonare, le micelle sono state successivamente aerosolizzate dopo dispersione in acqua attraverso un nebulizzatore commerciale, mostrando proprietà aerodinamiche favorevoli per la deposizione nel polmone.

Nel complesso, questi risultati evidenziano il potenziale del sistema INU-EDA-C8-PEG come formulazione innovativa ed efficiente per la somministrazione inalatoria di Sor nel trattamento del carcinoma polmonare.

4.MICROPARTICELLE INALABILI DI TIPO NANO into MICRO PER LA SOMMINISTRAZIONE POLMONARE E IL DIREZIONAMENTO DI Sor AL CANCRO POLMONARE

In questo studio è descritta la produzione e la caratterizzazione di una formulazione inalabile per il trattamento locale del tumore polmonare. In particolare, la formulazione è stata prodotta incorporando in eccipienti funzionali, mediante *spray drying* (SD), nanoparticelle polimeriche contenenti sorafenib (Sor) e decorati in superficie con acido folico (FA) per il direccionamento attivo alle cellule tumorali. La strategia di formazione di tali polveri è definita *Nano into Micro* (NiM). La rappresentazione schematica della produzione della formulazione è riportata nello **Schema 2**.



Schema 2. Rappresentazione schematica della produzione di NiM_{Sor} tramite processo di *spray drying* (SD).

4.1.SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COPOLIMERO GRAFT

PHEA-*g*-PLGA-*g*-PEG-FA

Per ottenere nanoparticelle polimeriche è stato progettato e prodotto un copolimero multifunzionale in grado di formare nanoparticelle e incorporare durante la formazione il Sor, con adeguate caratteristiche chimico fisiche e capaci sia di diffondere attraverso il muco polmonare, sia di essere internalizzate da cellule che sovraesprimono il recettore per il folato, quali le cellule tumorali.

Il α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartamide (PHEA), è stato scelto, come polimero, per la sua biocompatibilità, cruciale per la somministrazione polmonare e per la sua versatilità chimica, poiché ogni unità ripetuta contiene un gruppo ossidrile che consente una facile funzionalizzazione con altre molecole o polimeri [164], [165]. L'acido polilattico-*co*-glicolico (PLGA) è stato coniugato sul PHEA tramite una reazione di *grafting* mediata da carbodiimmide, in una quantità tale da conferire al copolimero risultante (PHEA-*g*-PLGA) capacità di formare nanoparticelle e di incorporare farmaci idrofobici come il Sor (**Fig.23, step1**).

Per conferire capacità di diffusione attraverso il muco e decorare la superficie con un ligando in grado di interagire con recettori sovraespressi su cellule tumorali, il PHEA-*g*-PLGA è stato ulteriormente funzionalizzato con il polietilenglicole-folato (H_2N -PEG-FA), precedentemente ottenuto da H_2N -PEG-NH₂ e FA con un grado di mono-derivazione in FA (DD_{FA}) pari al 100%, come descritto nella parte sperimentale (**Fig.23, step2**).

Tale funzionalizzazione ha lo scopo di produrre nanoparticelle decorate in superficie con FA che possono essere internalizzate attivamente dalle cellule

tumoriali, che sovraesprimono il recettore per il folato, migliorando così l'accumulo del farmaco e quindi la sua selettività [142], [166] (**Fig.23, step 3**).

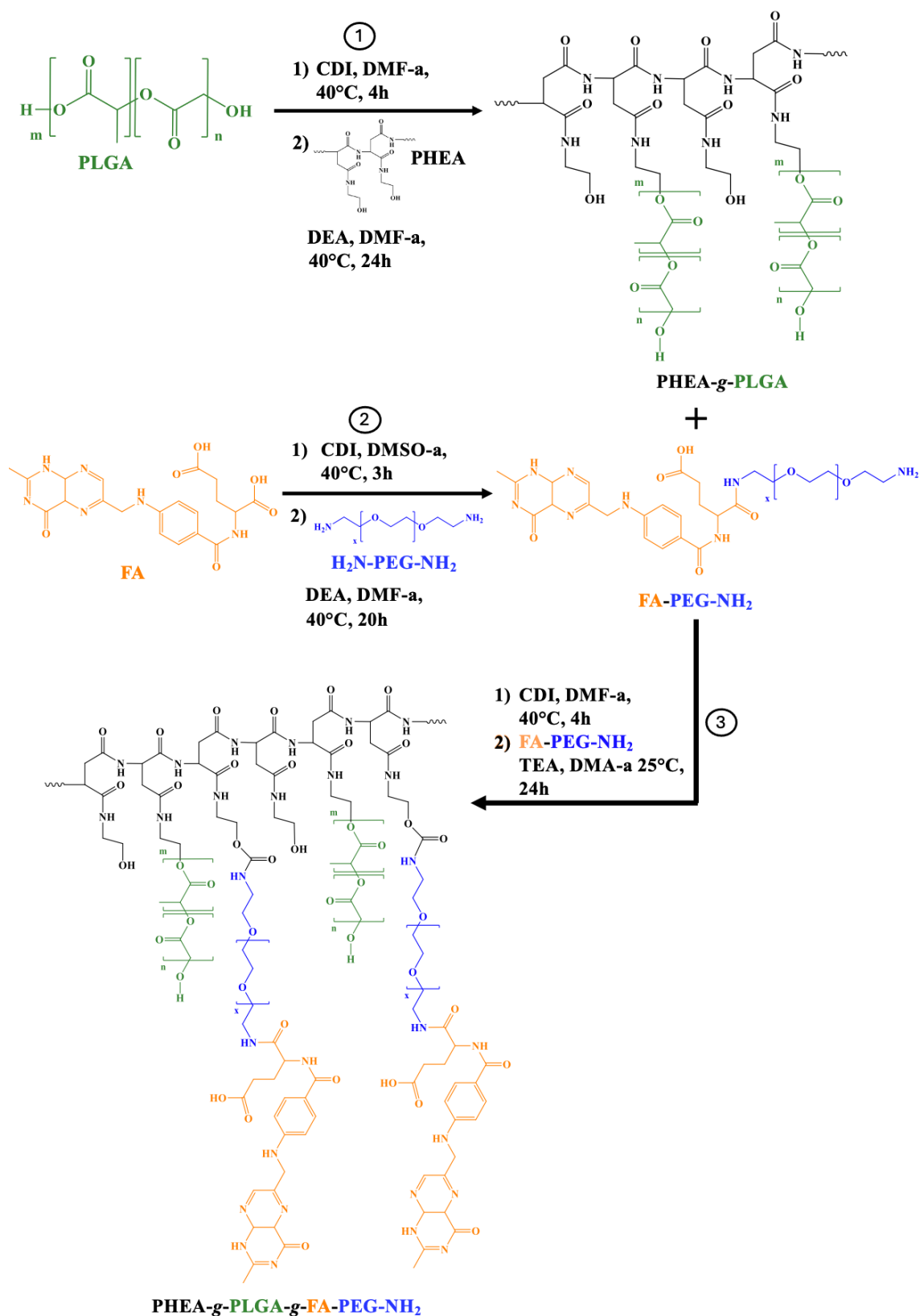


Fig.23: Procedura sintetica del copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA (m=n=92; x=44).

Il copolimero ottenuto, il PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA è stato caratterizzato mediante spettroscopia ^1H -NMR che ha permesso di calcolare il grado di derivatizzazione in PLGA e in PEG-FA (DD_{PLGA} e $\text{DD}_{\text{PEG-FA}}$) (**Fig.24**).

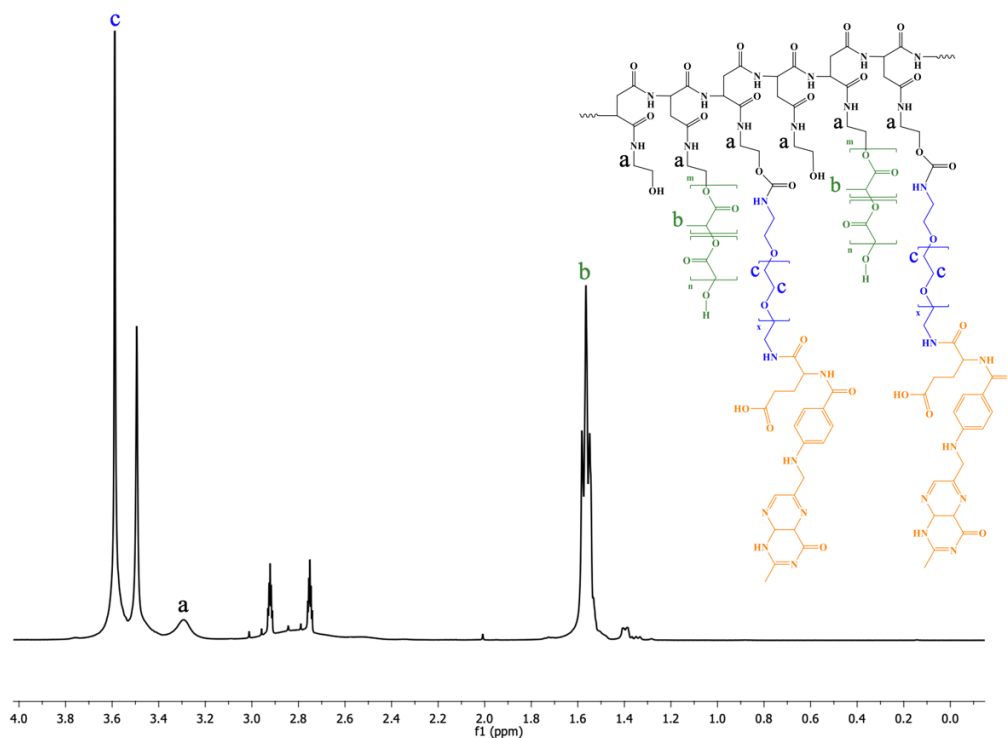


Fig.24: Spettro ^1H -NMR del PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA con relative attribuzioni.

In particolare, il grado di derivatizzazione in mol% di PLGA è stato calcolato confrontando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 1,5-1,7 (3H, $-\text{[OCO-CH}(\text{CH}_3)_2\text{]-}$), assegnati a PLGA, con l'integrale del picco relativo ai protoni a δ 3,3 (2H, $(-\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-})$) assegnati al PHEA. Il valore medio calcolato è stato pari a $3,3 \pm 0,2$ mol%, corrispondente a circa 6 molecole di PLGA per macromolecola.

Il grado di derivatizzazione in mol% di PEG-FA è stato calcolato confrontando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3,1-3,6 (4H, $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{44}$) assegnati a PEG con l'integrale del picco relativo ai protoni a δ 3,3 (2H, $(-\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})$)

assegnati al PHEA, corrispondente a circa 8 molecole di PEG-FA per macromolecola.

Il peso molecolare medio pesato, ($\bar{M}_w$) di PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA, determinato tramite SEC, è risultato pari a 110.987 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1,33$).

La procedura sintetica del copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA è descritta nella **Fig.23**.

4.2.PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE DI PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA (FA-PPP-NPs)

Una volta sintetizzato, il copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA è stato utilizzato per ottenere nanoparticelle polimeriche mediante il metodo di nanoprecipitazione [167]. Questo approccio consente la formazione di nanoparticelle stabili in ambiente acquoso, con buona riproducibilità e bassa polidispersità. Inoltre, è possibile incorporare il farmaco idrofobico durante il processo di formazione delle nanoparticelle con una buona efficienza di incapsulamento.

Dopo purificazione e liofilizzazione, la resa ottenuta è stata pari all'83% in peso. La quantità di farmaco incorporata (DL%) e l'efficienza di incorporazione (EE%) di Sor nelle nanoparticelle (FA-PPP-NPs@Sor), determinati tramite HPLC, sono risultati rispettivamente pari al 10% p/p e al 60,2% p/p (**Tab.8**). Questi risultati confermano che il metodo di nanoprecipitazione è idoneo alla produzione di nanoparticelle per l'incorporazione di Sor a partire dal copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA.

Le nanoparticelle vuote (FA-PPP-NPs) sono state preparate in assenza di farmaco seguendo la stessa procedura sopra descritta.

Come mostrato nella **Tab.8**, il campione FA-PPP-NPs@Sor presenta un diametro medio di circa 100 nm, significativamente superiore rispetto a quello delle FA-PPP-NPs vuote. Questo aumento di dimensione, insieme a un indice di polidispersità più basso ($PDI = 0,14$), suggerisce che la presenza di Sor influenzi il processo di coprecipitazione, favorendo la formazione di nanoparticelle più uniformi e con dimensioni più grandi, dovute probabilmente alla presenza del Sor nel core nanoparticellare. Inoltre, il potenziale- ζ delle nanoparticelle cariche di farmaco è pari a $-14,8 \pm 4,6$ mV, valore inferiore rispetto a quello delle nanoparticelle vuote ($-23,1 \pm 4,2$ mV), indicando che l'incorporazione del farmaco potrebbe comportare una localizzazione del Sor anche sulla superficie delle nanoparticelle.

Tab.8: Dimensione media (Z_a), PDI, potenziale- ζ , di FA-PPP-NPs vuote e FA-PPP-NPs@Sor in dispersione acquosa, DL%, EE% e resa % p/p dopo liofilizzazione.

Campione	Z_a (nm)	PDI	Potenziale- ζ (mV)	DL%	EE%	Resa %
FA-PPP-NPs	$55,92 \pm 6,2$	0,29	$-23,1 \pm 4,6$	-	-	$83,0 \pm 2,3$
FA-PPP-NPs@Sor	$109,2 \pm 5,4$	0,14	$-14,8 \pm 4,2$	10,0	60,2	$71,0 \pm 4,3$

4.3.STUDI DI RILASCIO

Per valutare la capacità delle nanoparticelle di rilasciare il farmaco in esse incorporato, è stato condotto uno studio utilizzando due diversi mezzi ovvero, fluido polmonare simulato (SLF4, pH 7,4), per mimare il microambiente polmonare

fisiologico, e tampone citrato (pH 5,5), per mimare il microambiente extracellulare e tumorale [154]. Entrambi i veicoli sono stati addizionati con siero fetale bovino (FBS) in rapporto 50:50 (v/v). I risultati, riportati in **Fig.25**, mostrano che il farmaco è stato rilasciato in modo controllato senza un effetto "*burst*". Dopo 24 ore di incubazione, il rilascio del farmaco è stato pari all'8,4% nel mezzo SLF4:FBS e al 21,7% nel tampone citrato:FBS. Sebbene questa differenza non sia molto marcata, si osserva un profilo di rilascio significativamente più elevato nel microambiente tumorale simulato, il che potrebbe essere particolarmente vantaggioso per aumentare l'efficacia terapeutica del farmaco nel sito bersaglio.

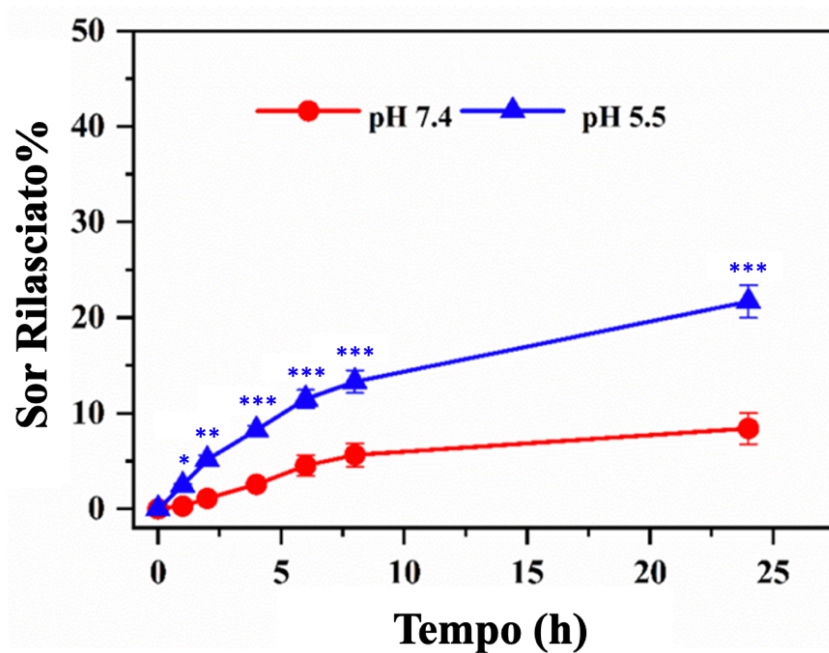


Fig.25: Profilo di rilascio di Sorafenib dal campione FA-PPP-NPs@Sor a pH 7,4 in fluido polmonare simulato (SLF4) (rosso) e a pH 5,5 in tampone citrato (blu) a 37°C, in funzione del tempo di incubazione (n = 3) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) (*% Sor rilascio a pH5,5 vs % Sor rilascio a pH7,4).

4.4.INTERAZIONE CON LA MUCINA

Dato che queste nanoparticelle sono progettate per somministrazione polmonare, è stato fondamentale verificare la loro capacità di interazione con i componenti dello strato di muco delle vie respiratorie. Una penetrazione efficiente attraverso questa barriera è infatti un requisito cruciale per i nanocarrier destinati alla somministrazione locale polmonare, poiché consente loro di raggiungere le cellule epiteliali sottostanti o il tumore che rappresentano il target biologico.

Per valutare l'entità di interazione tra le nanoparticelle e la mucina, che è il componente principale del muco polmonare, è stata eseguita un'analisi turbidimetrica. In particolare, è stata monitorata la trasmittanza a 650 nm di dispersioni acquose contenenti mucina e nanoparticelle vuote o contenenti Sor per oltre 3 ore, utilizzando una dispersione di mucina come bianco. Per valutare l'effetto della peghilazione superficiale su tale interazione, la stessa analisi è stata effettuata con nanoparticelle non peghilate ottenute da PHEA-g-PLGA (campione PP-NPs). I dati sono stati riportati in un grafico come andamento del rapporto tra la trasmittanza del campione in mucina e quella del bianco di mucina in funzione del tempo di incubazione. Come mostrato in **Fig.26**, i valori del rapporto di trasmittanza per FA-PPP-NPs@Sor e FA-PPP-NPs sono rimasti costantemente vicini a 1, indicando un'interazione trascurabile con la mucina. Al contrario, le PP-NPs non peghilate hanno mostrato un rapporto di trasmittanza significativamente ridotto, che è dovuto all'aumento della torbidità della dispersione in presenza di interazioni nanoparticella-mucina, probabilmente dovute all'assenza della stabilizzazione sterica fornita dalle catene di PEG. Pertanto, queste nanoparticelle presentano proprietà idonee per la somministrazione locale polmonare nella terapia anticancro.

Questi risultati concordano con studi precedenti che dimostrano come la peghilazione superficiale riduca la mucoadesione, formando un rivestimento non adesivo, che limita le interazioni non specifiche con i componenti del muco [155], [156], [157].

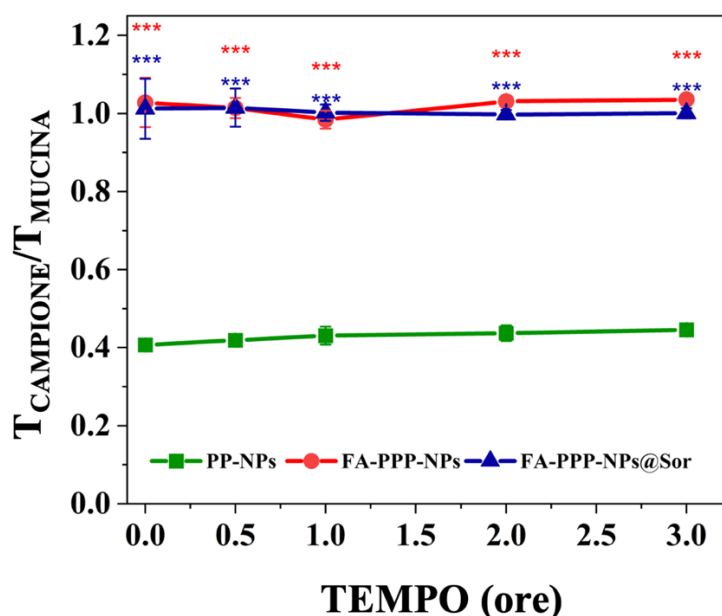


Fig.26: Analisi turbidimetrica della dispersione di mucina (1 mg/mL) in presenza dei campioni FA-PPP-NPs, FA-PPP-NPs@Sor e PP-NPs in funzione del tempo di incubazione. I valori sono espressi come rapporto tra la trasmittanza dei campioni in mucina rispetto alla trasmittanza della mucina come bianco (**p<0,001) (*FA-PPP-NPs vs PP-NPs; *FA-PPP-NPs@Sor vs PP-NPs).

4.5.STUDI DI CITOTOSSICITÀ

Per valutare la capacità del Sor, trasportato da nanoparticelle direzionate, di accumularsi selettivamente nelle cellule tumorali rispetto a quelle sane, è stato effettuato un test di citotossicità in vitro sia su cellule tumorali polmonari umane (A549) sia su cellule epiteliali bronchiali sane (16HBE). La linea cellulare A549 è stata scelta come modello di cellule tumorali che sovraesprime il recettore per il

folato [160], [161], mentre le cellule 16HBE rappresentano un modello di cellule polmonari non tumorali e prive di questo recettore [162], [163]. In un primo esperimento, è stata valutata la citocompatibilità delle nanoparticelle vuote tramite saggio MTS sulle linee cellulari selezionate, incubando queste ultime con concentrazioni crescenti di FA-PPP-NPs vuote, da 0,06 mg/mL a 0,6 mg/mL, per 24 e 48 ore; i risultati hanno indicato un'alta citocompatibilità delle nanoparticelle vuote nelle condizioni testate (**Fig.27 C**)

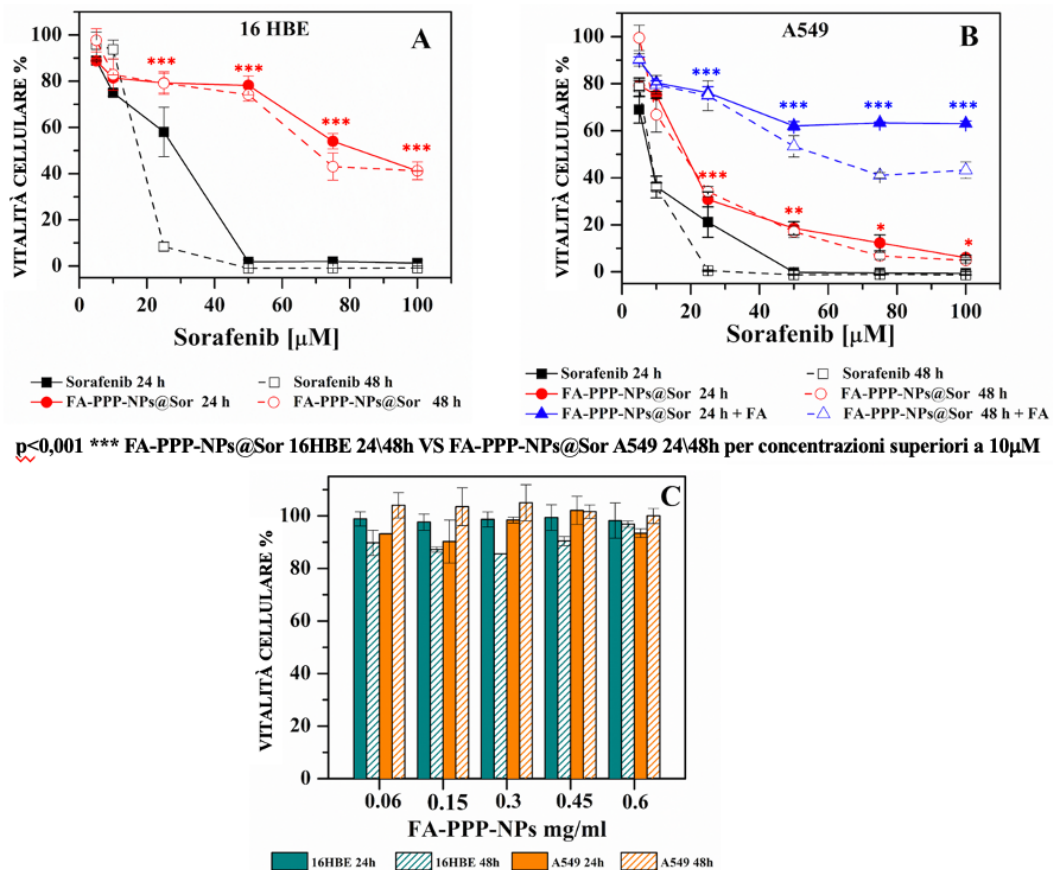


Fig.27: Effetto antitumorale in vitro su 16HBE (A) e A549 (B) trattate con FA-PPP-NPs@Sor e Sor per 24 ore (linee continue) e 48 ore (linee tratteggiate). Citocompatibilità in vitro su 16HBE e A549 (C) trattate con FA-PPP-NPs (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (*FA-PPP-NPs@Sor 24/48h vs Sor 24/48h; *FA-PPP-NPs@Sor A549 24/48h vs FA-PPP-NPs@Sor+FA A549 24/48h).

Successivamente le due linee cellulari sono state incubate con Sor libero o veicolato mediante l'uso delle nanoparticelle folate (campione FA-PPP-NPs@Sor), confrontando stesse concentrazioni di Sor (da 5 a 100 μ M). I risultati ottenuti, riportati in **Fig.27 A e B** mostrano che il farmaco veicolato dalle nanoparticelle direzionate al recettore per il folato è più tossico sulla linea tumorale rispetto che sulle cellule sane ($p < 0,001$ ***FA-PPP-NPs@Sor 16HBE 24\48h VS FA-PPP-NPs@Sor A549 24\48h per concentrazioni superiori a 10mM). In entrambi i casi, inoltre, il farmaco veicolato è meno tossico di quello libero e la differenza è più significativa nelle 16 HBE. Come riportato nella **Tab.9**, l' IC_{50} e l'inibizione massima (I_{max}) per FA-PPP-NPs@Sor nelle cellule 16HBE, dopo 48 ore di incubazione, erano rispettivamente $69,0 \pm 3,1 \mu$ M e $76,1 \pm 2,6\%$, entrambi significativamente migliori in termini di sicurezza rispetto al sorafenib libero, che ha mostrato un IC_{50} di $17,7 \pm 2,3 \mu$ M e un I_{max} di $96 \pm 1,5\%$ dopo 48 ore.

Tab.9: Concentrazione inibitoria al 50% (IC₅₀) e inibizione massima della crescita cellulare (I_{max}%), calcolate per Sor libero e FA-PPP-NP@Sor sulle linee cellulari 16HBE e A549.

Linea cellulare	Campione	IC ₅₀ 24h (μ M)	I _{max} 24h (%)	IC ₅₀ 48h (μ M)	I _{max} 48h (%)
16 HBE	Sor	29,0 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 1,2	17,7 $\pm$ 2,3	96,0 $\pm$ 1,5
	FA-PPP-NPs@Sor	83,0 $\pm$ 1,2	59,0 $\pm$ 2,3	69,0 $\pm$ 3,1	76,1 $\pm$ 2,6
A549	Sor	8,0 $\pm$ 0,4	100,0 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 1,2	100,0 $\pm$ 1,5
	FA-PPP-NPs@Sor	18,0 $\pm$ 0,3	94,1 $\pm$ 1,5	18,0 $\pm$ 3,2	95,2 $\pm$ 3,4
A549 + Acido Folico	FA-PPP-NPs@Sor	>100,0	37,0 $\pm$ 2,4	56,4 $\pm$ 3,4	57,8 $\pm$ 1,4

Le cellule tumorali A549 hanno mostrato una marcata sensibilità al farmaco veicolato nelle nanoparticelle (**Fig.27 B**), con un IC₅₀ di 18,0 $\pm$ 3,2 μ M e un I_{max} di 95,2 $\pm$ 3,4% dopo 48 ore di incubazione. Questi valori sono in linea con quelli osservati per il Sor libero nelle cellule A549 (IC₅₀ = 8,0 $\pm$ 1,2 μ M; I_{max} = 100,0 $\pm$ 1,5%), confermando che il targeting attivo con folato mantiene un'attività antitumorale del farmaco significativamente elevata sulle cellule cancerose.

Complessivamente, questi risultati evidenziano un effetto marcato del Sor quando incorporato nelle FA-PPP-NPs@Sor nelle cellule tumorali, riducendo significativamente l'impatto sulle cellule non tumorali e supportando il potenziale di questa strategia come approccio selettivo e più sicuro per la terapia mirata del cancro.

4.6. TEST DI INIBIZIONE DEL RECETTORE PER IL FOLATO

Per confermare ulteriormente che la citotossicità selettiva del sistema nanoparticellare verso le cellule tumorali sia mediata dal direccionamento attivo, è stato eseguito un ulteriore esperimento sulle cellule tumorali A549, pre-incubandole con un eccesso di FA libero per 24 ore prima del trattamento con la formulazione nanoparticellare. Lo scopo è quello di inibire competitivamente il recettore del folato [168], per dimostrare che quest'ultimo è coinvolto nell'internalizzazione mediata dal recettore delle nanoparticelle decorate con FA (**Fig.27 B**). Come previsto, il blocco del recettore ha significativamente ridotto l'effetto citotossico delle FA-PPP-NPs@Sor. L' IC_{50} è aumentato oltre 100 μ M e l'inibizione massima è scesa a $57,8 \pm 1,4\%$ dopo 48 ore di incubazione, rispetto ai dati osservati nelle cellule A549 non trattate (**Tab.9**).

Quindi, la marcata riduzione di efficacia dopo il blocco del recettore conferma che l'azione terapeutica delle FA-PPP-NPs@Sor dipende fortemente dal meccanismo di internalizzazione particellare mediato dal recettore. Grazie al direccionamento attivo dell'FA, questi sistemi risultano più efficaci rispetto alle micelle analizzate nello studio precedente, sottolineando il ruolo del *targeting* specifico nel migliorare l'efficienza terapeutica.

4.7. UPTAKE DELLE NANOPARTICELLE

Per valutare la capacità delle nanoparticelle di essere internalizzate nelle cellule di carcinoma polmonare A549, è stato condotto uno studio di *uptake* attraverso microscopia a fluorescenza. Le cellule sono state trattate con nanoparticelle cariche di farmaco ottenute utilizzando un polimero marcato con Rodamina (RhB), FA-

PPP-NPs@Sor, sia in assenza che in presenza di acido folico libero (FA). Le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo. Trascorse 4 h di incubazione le cellule sono state lavate 2 volte con DPBS, fissate con formaldeide, ed infine i nuclei delle cellule sono stati marcati con DAPI (blu).

I dati ottenuti evidenziano che, nelle cellule incubate con FA-PPP-NPs@Sor marcate con RhB (**Fig.28 Pannello A**), si osserva un'intensa fluorescenza rossa localizzata prevalentemente nella regione perinucleare, indicativa di un'efficiente internalizzazione delle nanoparticelle. Al contrario, nelle cellule preincubate con acido folico libero e successivamente trattate con le stesse nanoparticelle marcate (FA-PPP-NPs@Sor+FA) (**Fig.28 Pannello B**), la fluorescenza risulta quasi completamente assente.

Questo risultato suggerisce che l'FA libero ha saturato i recettori dei folati espressi sulla membrana cellulare, impedendo così il legame competitivo e la conseguente endocitosi delle nanoparticelle funzionalizzate con FA. Tale fenomeno di competizione per i recettori supporta l'ipotesi che l'internalizzazione intracellulare delle FA-PPP-NPs@Sor avviene principalmente attraverso un meccanismo di *uptake* mediato dal recettore dei folati. Infine, nel campione di controllo (cellule non trattate) (**Fig.28 Pannello C**), non si osserva alcuna fluorescenza rossa significativa, confermando l'assenza di segnali aspecifici dovuti ad autofluorescenza o a interferenze strumentali.

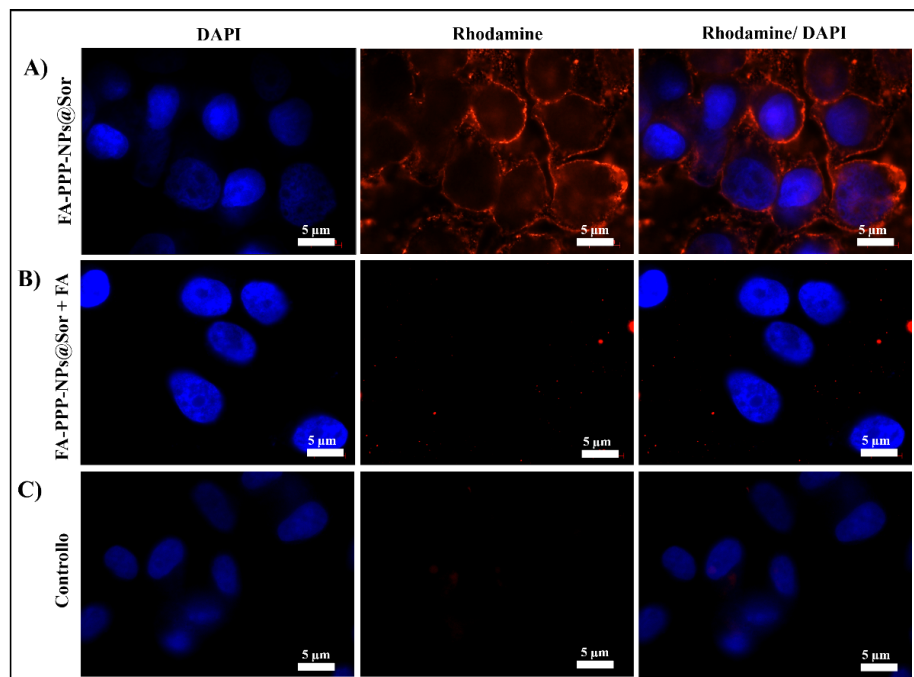


Fig.28: *Uptake* effettuato con microscopio a fluorescenza su cellule A549 trattate con FA-PPP-NPs@Sor sia in assenza (A) che in presenza FA (B), utilizzando cellule non trattate come controllo (C). Ingrandimento 100X.

4.8.SCRATCH TEST

Per indagare la capacità delle nanoparticelle FA-PPP-NPs@Sor di ridurre le metastasi nel cancro al polmone, è stato effettuato uno *scratch test* sulle cellule A549. Questo saggio è ampiamente utilizzato per valutare la migrazione cellulare, un processo chiave coinvolto nella metastatizzazione tumorale [159].

Come illustrato in **Fig.29**, è stato effettuato un graffio su un monostrato confluyente di cellule A549 prima del trattamento (tempo = 0) e la migrazione cellulare verso la chiusura della ferita è stata monitorata a 24 e 48 ore dopo il trattamento.

La cicatrizzazione è stata quantificata misurando la riduzione dell'area del graffio dopo il trattamento con Sor libero veicolato nelle nanoparticelle FA-PPP-NPs@Sor. Dopo 24 ore, entrambi i trattamenti hanno mostrato una chiara inibizione

della migrazione cellulare rispetto al controllo, con una chiusura del graffio minore ottenuta con Sor libero rispetto alle FA-PPP-NPs@Sor. Tuttavia, dopo 48 ore, è stata osservata una differenza significativa tra i due trattamenti, inquanto le cellule trattate con Sor hanno mostrato una chiusura del graffio del 40,22%, mentre quelle trattate con FA-PPP-NPs@Sor del 27,0%, indicando una più forte inibizione della migrazione cellulare.

Questi risultati suggeriscono che le nanoparticelle FA-PPP-NPs@Sor inibiscono più efficacemente la migrazione delle cellule A549 nel tempo rispetto al Sor libero, evidenziando il loro potenziale nel prevenire la metastasi del cancro al polmone. Questa migliorata capacità è probabilmente dovuta al rilascio controllato e prolungato di Sor dal sistema nanoparticellare, che mantiene livelli terapeutici del farmaco nel tempo e adeguati alla inibizione della migrazione cellulare.

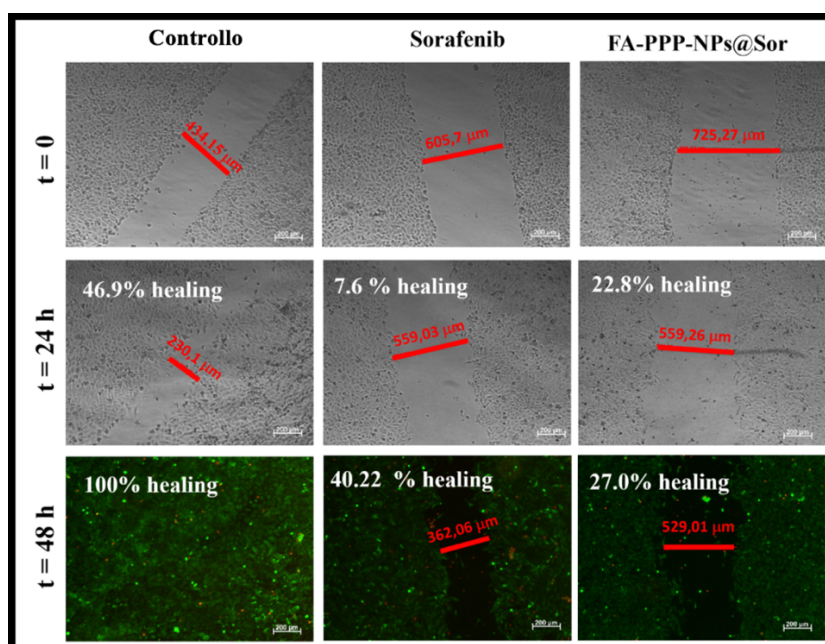


Fig.29: *Scratch test* effettuato con una concentrazione di Sor di 25 μM sulla linea cellulare A549, osservata al microscopio ottico. Ingrandimento 5X: barra di scala 200 μm.

4.9.PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MICROPARTICELLE

Per ottenere microparticelle inalabili che possano fungere da veicoli per la deposizione di FA-PPP-NPs@Sor nel polmone profondo per il trattamento del tumore polmonare, è stata impiegata la strategia *Nano in Micro* (NiM). Questa ha previsto l'incapsulamento delle nanoparticelle cariche di farmaco all'interno di microparticelle composte da eccipienti, come mannitolo (MAN), leucina (LEU) e N-acetil cisteina (NAC), tramite *spray drying* (SD). Il MAN è stato scelto come agente osmotico per migliorare l'idratazione del muco polmonare e aumentarne la fluidità. Il NAC è stato incluso per le sue proprietà mucolitiche grazie ai gruppi tiolici presenti nella molecola [147]. Tuttavia, il NAC tende a ridurre la scorrevolezza della polvere e ad aumentare l'adesività nelle formulazioni *spray-dried*. Per ovviare a ciò, è stata aggiunta la LEU per migliorare la dispersibilità e l'aerosolizzazione della polvere, aumentare la dose emessa e la frazione di particelle fini, oltre a proteggere le particelle dalla degradazione causata dall'umidità [169].

Nel primo step, è stata ottimizzata la formulazione della matrice variando la composizione del fluido di alimentazione in termini di concentrazione di MAN, di LEU e di NAC. Per modulare ulteriormente le proprietà aerodinamiche delle microparticelle ottenute, è stato aggiunto anche l'agente porogeno, bicarbonato di ammonio (AB), nel fluido prima del SD, in quanto durante lo *spray drying*, l'AB si decompone termicamente in prodotti gassosi (CO_2 , NH_3 e H_2O), generando porosità all'interno delle microparticelle. Questa porosità può ridurre la densità delle particelle, migliorando l'efficienza di aerosolizzazione e la deposizione nel polmone profondo delle microparticelle prodotte [170]. Inoltre, nella formulazione

è stato incluso lo 0,05% p/v di Rodamina B (RhB) per permettere la caratterizzazione tecnologica di queste ultime mediante fluorescenza. Sono state prodotte diverse matrici di microparticelle vuote variando sistematicamente i parametri della formulazione, inclusi le concentrazioni di MAN (5–6% p/v), i rapporti NAC/LEU (1:1 e 1:2) e il contenuto di porogeno (0,5% e 1% p/v). Sono stati anche variati i parametri del processo di *spray drying*, come la pompa e l'aspirazione, mantenendo costante la composizione della soluzione liquida. La **Tab.12** (sezione sperimentale) riassume le concentrazioni p/v di ogni componente nel fluido di alimentazione del SD, i parametri specifici di processo usati e le rese percentuali ottenute per ogni lotto di microparticelle, con valori superiori al 45% in peso per tutti i campioni. Inoltre, tutti i campioni di microparticelle ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi morfologica, usando un Microscopio Elettronico a Scansione (SEM), e le immagini ottenute sono mostrate in **Fig.30**.

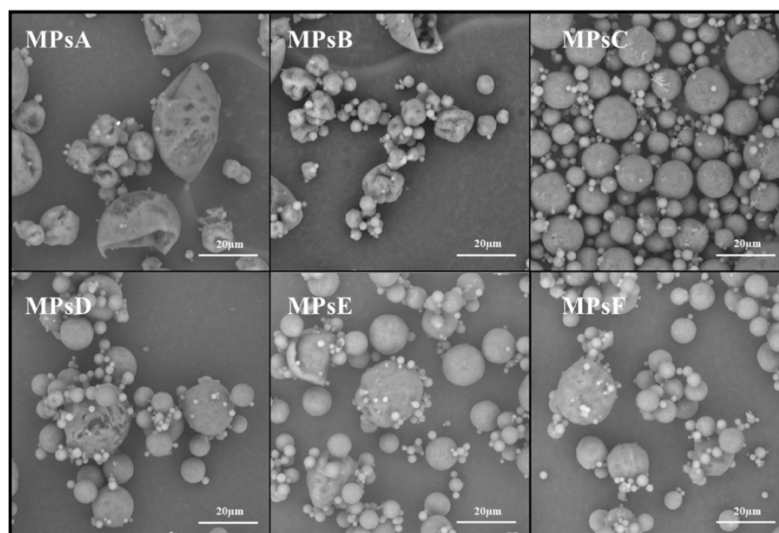


Fig.30: Immagini SEM dei campioni di microparticelle vuote.

Queste ultime hanno rivelato che le microparticelle presentano una morfologia prevalentemente sferica. Tuttavia, è stata osservata una maggiore polidispersità e

una superficie più porosa nelle formulazioni in cui è stato aggiunto 1% p/v di AB nella soluzione liquida (campioni MP_sA e MP_sB), rispetto a quelle preparate con 0,5% p/v di AB. Dalle immagini SEM è stato determinato il diametro geometrico (d_{geo}) delle microparticelle. Inoltre, sono stati calcolati la densità *tapped* (ρ_{tapped}), la densità *bulk* (ρ_{bulk}) e l'indice di Hausner (HI) per ogni campione di polvere, usando il metodo della siringa [155]. Basandosi su questi parametri, è stato calcolato il diametro aerodinamico teorico (d_a) delle microparticelle. In **Tab.10** sono riportati i dati di caratterizzazione ottenuti.

Tab.10: Densità *bulk* e *tapped*, indice di Hausner, diametro geometrici e aerodinamico delle matrici microparticellari ottenuti mediante SD.

Campione	ρ_{bulk} (g/cm ³)	ρ_{tapped} (g/cm ³)	HI	d_{geo} (μm)	d_a (μm)
MP_sA	0,23±0,04	0,31±0,02	1,31±0,12	4,28±3,44	2,90±0,35
MP_sB	0,26±0,03	0,37±0,03	1,41±0,14	4,00±2,33	2,43±0,24
MP_sC	0,30±0,04	0,39±0,04	1,28±0,17	4,37±2,38	2,72±0,31
MP_sD	0,33±0,04	0,43±0,06	1,30±0,11	3,72±2,92	2,45±0,27
MP_sE	0,35±0,05	0,46±0,05	1,31±0,14	3,58±2,6	2,43±0,27
MP_sF	0,34±0,03	0,42±0,04	1,24±0,11	3,31±2,25	2,15±0,35
NiMSor	0,261±0,03	0,34±0,04	1,31±0,19	1,84±1,07	1,07±0,18

Tutte le matrici microparticellari ottenute hanno mostrato un diametro aerodinamico teorico (d_a) inferiore a 5 μm, indicando la loro potenziale idoneità per la deposizione nelle vie respiratorie inferiori dopo l'inalazione. Tenendo conto dei valori di HI, indice di un adeguato scorrimento delle polveri, sono stati selezionati

i campioni di microparticelle identificati come MP_sE e MP_sF che sono stati caratterizzati mediante valutazione del comportamento aerodinamico con l'Andersen Cascade Impactor (ACI), come descritto nella sezione sperimentale.

La **Fig.31** mostra la distribuzione percentuale della deposizione della polvere nei vari stadi dell'ACI che mimano le diramazioni dell'albero bronchiale, mentre i principali parametri di performance aerodinamica sono riassunti nella **Tab.11**. Secondo le linee guida regolatorie attuali e la letteratura, le formulazioni di polveri secche inalabili destinate alla deposizione nel polmone profondo dovrebbero tipicamente presentare valori di MMAD compresi tra 1 e 5 μm e valori di FPF% superiori al 30% per garantire una deposizione efficiente nelle vie respiratorie inferiori [170], [171]. Tra i nostri campioni, sia MP_sE che MP_sF soddisfano questi criteri, confermando la loro idoneità come matrici da usare come veicolo per la somministrazione polmonare di farmaci.

Un confronto più dettagliato tra i campioni MP_sE e MP_sF ha rivelato che la formulazione MP_sF mostra prestazioni aerodinamiche superiori con un MMAD di 3,6 μm e un FPF del 64,5%, pertanto è stata selezionata per la produzione di microparticelle in cui incorporare PPP-FA-NPs@Sor mediante la cosiddetta strategia *Nano into Micro* (NiM).

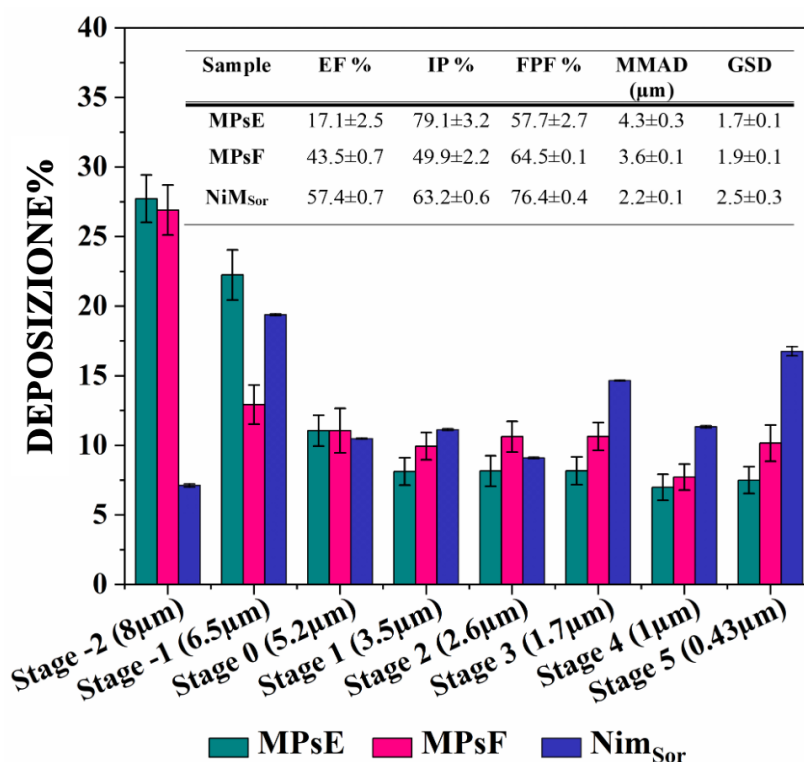


Fig.31: Percentuale di deposizione delle microparticelle negli stadi dell'Andersen Cascade Impactor (ACI), confronto tra i campioni MPSE e MPSEF e tra i e NiMSor.

Tab.11: Parametri di aerosolizzazione ottenuti dall'analisi con l'ACI.

Nome campione	EF %	IP %	FPF %	MMAD (µm)	GSD
MPSE	17,1±2,5	79,1±3,2	57,7±2,7	4,3±0,3	1,7±0,1
MPSEF	43,5±0,7	49,9±2,2	64,5±0,1	3,6±0,1	1,9±0,1
NiMSor	57,4±0,7	63,2±0,6	76,4±0,4	2,2±0,1	2,5±0,3

In particolare, una quantità nota di FA-PPP-NPs@Sor (0,45% p/v) è stata dispersa nel fluido di alimentazione dello SD che è stato poi processato nelle stesse condizioni operative e con la stessa composizione di eccipienti utilizzata per la formulazione MPSEF, ottenendo un campione NiM denominato NiMSor, con una resa finale di prodotto del 63% in peso e un diametro geometrico significativamente

ridotto rispetto alla matrice vuota (**Tab.11/ Fig.31**). La migliore resa ottenuta rispetto a quella della matrice vuota (57,4 vs 45,5) può essere giustificata dal fatto che la presenza delle nanoparticelle può modificare la reologia del fluido e la cinetica di essiccazione della dispersione. Inoltre, le nanoparticelle possono contribuire alla formazione di una matrice più coesa durante l'evaporazione del solvente, portando alla formazione di particelle più piccole e a un recupero più efficiente. La determinazione quantitativa della DL% e dell'EE% di NiM_{Sor} tramite HPLC ha dato valori pari a 0,35% p/p e 100% p/p rispettivamente, indicando un'efficace incorporazione del campione FA-PPP-NPs@Sor senza perdite di farmaco durante il processo di SD.

L'analisi morfologica del campione NiM_{Sor} tramite SEM (**Fig.32**) ha inoltre rivelato una forma prevalentemente sferica, coerente con le precedenti formulazioni vuote. Le particelle presentano un basso indice di polidispersità (PDI) e una buona scorrevolezza, ottenuta dalla determinazione di HI e riportata in **Tab.11**. Da notare che anche il d_a di NiM_{Sor}, ottenuto a partire dal d_{geo} seguendo la formula $da = d_{geo} \sqrt{\frac{\rho}{\rho_0 X}}$, è risultato significativamente inferiore a quello delle microparticelle vuote, inquanto dipendente dal diametro geometrico significativamente inferiore.

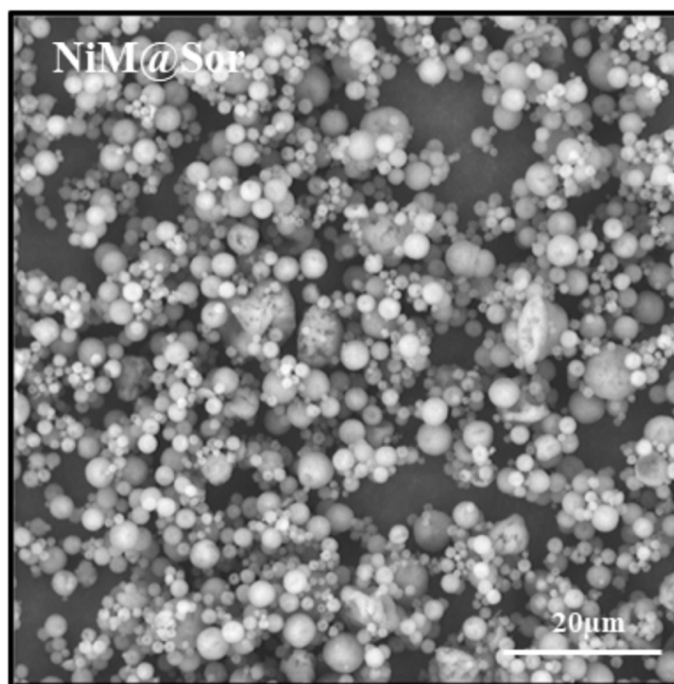


Fig.32: Immagine SEM del campione NiM_{Sor}.

La caratterizzazione del campione NiM_{Sor} è stata condotta anche mediante valutazione delle proprietà aerodinamiche con ACI. In particolare, dopo aerosolizzazione è stata quantificata la distribuzione nei vari stadi sia della RhB, usata come tracciante fluorescente, che del Sor incorporato all'interno delle nanoparticelle integrate nella matrice di eccipienti. I dati medi, riportati nella **Fig.32** e nella **Tab.11** mostrano che il sistema NiM_{Sor} presenta caratteristiche aerodinamiche superiori rispetto alla matrice vuota. In particolare, sono stati ottenuti un diametro aerodinamico medio (MMAD) di 2,2 µm e una frazione di particelle fini (FPF%) del 76%, calcolati come media dei valori ottenuti dall'analisi della RhB e del Sor. Questi risultati indicano una marcata efficienza nella formulazione, pienamente in linea con i requisiti ottimali per una deposizione efficace nel tratto respiratorio inferiore, definiti da valori di MMAD inferiori a 5 µm e FPF% superiori al 50% [172].

Essendo le matrici delle microparticelle costituite da eccipienti solubili in acqua, è stato condotto un test di ridispersione delle microparticelle NiM_{Sor} in acqua che ha dimostrato la formazione di una dispersione nanoparticellare con un valore di *Z-average* di circa 105 nm, un indice di polidispersione di 0,27 e un potenziale zeta di $-8,59 \pm 6,8$ mV, valori sovrapponibili a quelli misurati prima del processo di SD. Questi risultati indicano che il processo di *spray drying* ha avuto effetti non significativi sulle nanoparticelle senza indurne aggregazione.

Per valutare gli effetti della dissoluzione degli eccipienti funzionali sul muco polmonare, così come della presenza delle nanoparticelle, è stato condotto uno studio reologico su una dispersione di mucina al 6% p/v, preparata seguendo un protocollo sperimentale già riportato in letteratura [154], [157]. La dispersione mostra un comportamento pseudoplastico, caratterizzato da un profilo *shear-thinning* in cui la viscosità diminuisce all'aumentare della velocità di taglio, una proprietà reologica simile a quella osservata nel muco bronchiale [173], [174]. Lo studio è stato effettuato misurando la viscosità complessa (η^*) della dispersione di mucina in presenza di NiM_{Sor} (2, 5 e 10 mg/mL) immediatamente dopo avere disperso il campione o dopo tre ore di incubazione (t_0 e t_3) a 37°C, per valutare se la capacità del sistema di modificare le proprietà viscoelastiche della dispersione fosse dipendente dal tempo e dalla concentrazione. Inoltre, per valutare se NAC fosse il componente della matrice in grado di influenzare la η^* , l'analisi è stata eseguita anche su microparticelle prodotte utilizzando soltanto mannitolo (MANmicro). I risultati riportati in **Fig.33** mostrano che la presenza del campione NiM_{Sor} determina una riduzione della viscosità significativamente più marcata rispetto al campione MANmicro, dato che η^* della dispersione di mucina incubata

con NiM_{Sor} a t_0 è risultata significativamente più bassa rispetto a quella trattata con MANmicro, che mantiene una viscosità simile alla mucina non trattata. Dopo 3 ore di incubazione ($t=3h$) le differenze in η^* misurate nelle dispersioni di mucina incubate con MANmicro e quelle con NiM_{Sor} sono ancora più pronunciate, evidenziando un effetto dipendente dal tempo di contatto delle microparticelle con il sistema mimante il muco.

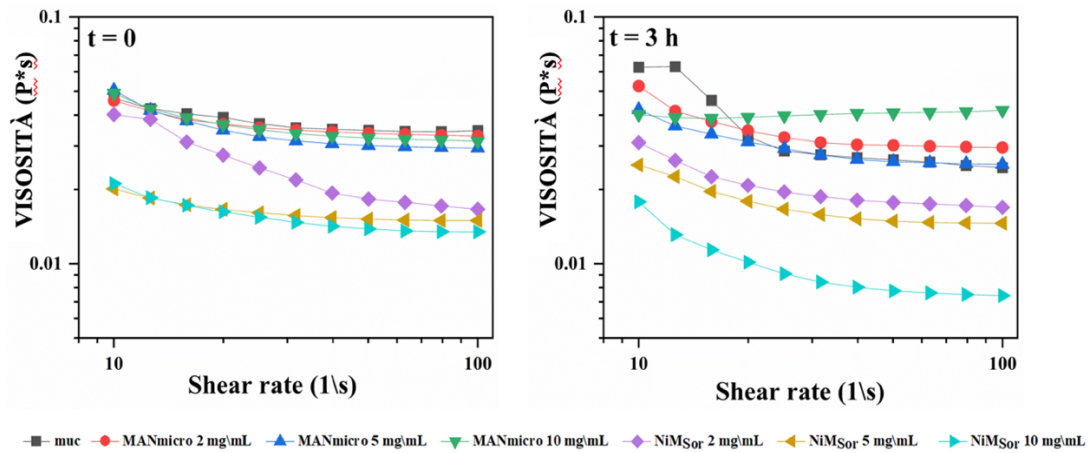


Fig.33: Andamento reologico di mucina al 6%, MANmicro e NiM_{Sor}.

Da notare che l'effetto di NiM_{Sor} è risultato anche dipendente dalla concentrazione, poiché è stata osservata una riduzione progressiva della viscosità all'aumentare della concentrazione di NiM_{Sor} (e di conseguenza di NAC) nella dispersione di mucina. Questi risultati sottolineano il potenziale effetto fluidificante dei sistemi NiM_{Sor}, che non solo è dipendente dalla concentrazione ma mostra anche un effetto marcato sulla η^* in funzione del tempo di incubazione.

4.10.CONCLUSIONI

In questo studio è stata sviluppata e caratterizzata con successo una formulazione a base di nanoparticelle contenenti sorafenib (Sor) (FA-PPP-NPs@Sor) per il trattamento locale del carcinoma polmonare.

Le nanoparticelle sono state prodotte a partire da un copolimero *graft* ottenuto mediante funzionalizzazione chimica dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartamide (PHEA), con acido poli(lattico-*co*-glicolico) (PLGA) per rendere il copolimero adatto alla formazione di nanoparticelle in mezzo acquoso capaci di incorporare farmaci idrofobici, e con polietilenglicole coniugato con acido folico (PEG-FA) per conferire capacità di direccionamento attivo a cellule tumorali e aumentare l'idrofilia superficiale delle particelle e ridurre le interazioni con la mucina.

Le nanoparticelle ottenute hanno mostrato un'elevata *drug loading* e un profilo di rilascio controllato del farmaco. La peghilazione superficiale ha garantito interazioni minime con la mucina, favorendo la penetrazione nello strato di muco polmonare.

La caratterizzazione biologica in vitro ha dimostrato una citotossicità selettiva delle FA-PPP-NPs@Sor verso le cellule tumorali polmonari (A549), con una ridotta citotossicità sulle cellule epiteliali bronchiali non tumorali (16HBE). In particolare, le nanoparticelle hanno ridotto in modo significativo la vitalità delle cellule A549 in maniera dose- e tempo-dipendente, mentre esperimenti di inibizione competitiva del recettore del folato hanno confermato che l'attività è mediata dal direccionamento attivo del *carrier*. Inoltre, lo *scratch test* ha evidenziato una marcata inibizione della migrazione delle cellule tumorali dopo trattamento con FA-PPP-

NPs@Sor, significativamente più elevata rispetto al farmaco libero, indicando un potenziale effetto nel limitare il comportamento metastatico.

Per ottimizzare la somministrazione polmonare, le nanoparticelle sono state successivamente incorporate in microparticelle inalabili (sistema *Nano-in-Micro*, NiM) tramite *spray drying* (SD). Le microparticelle ottenute hanno mostrato proprietà aerodinamiche favorevoli per la deposizione nel polmone. Inoltre, studi reologici hanno indicato che la formulazione NiM_{Sor}, ottenuta a partire da eccipienti funzionali, riduce in modo significativo la viscosità del muco, principalmente grazie alla presenza del NAC nella matrice, oltre a dare dopo contatto con il fluido polmonare una dispersione stabile delle nanoparticelle.

Nel complesso, questi risultati evidenziano il potenziale del sistema NiM_{Sor} come formulazione innovativa ed efficiente per la somministrazione inalatoria di farmaci nel trattamento del carcinoma polmonare.

PARTE SPERIMENTALE

5.MICELLE POLIMERICHE A BASE DI INULINA (INU)

5.1.MATERIALI E METODI

N,N'-dimetilformammide anidra (DMF-a), N,N'-dimetilacetamide anidra. Inulina (INU, $\bar{M}_w$ 5.000 Da), ossido di deuterio (D₂O), DMF deuterato (DMF-d₇), etilen diammina (EDA, M_w 60.1 Da), acido caprilico (C8, M_w 144,21 Da) b-ammino-monometossi-polietilenglicole 2000 (CH₃-PEG-NH₂, $\bar{M}_w$ = 2.000 Da), Anidride succinica (SUCC, $\bar{M}_w$ = 100 Da), paranitro fenil-carbonato (BNPC), 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimide (EDC), N-idrossisuccinimide (NHS), Sorafenib (Sor), etanolo, diclorometano (DCM), mucina di stomaco suino, soluzione tampone salina fosfata di Dulbecco (DPBS), standard in polistirene (10.000–150.000 Da) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Italia).

Le membrane per dialisi sono state acquistate da Spectrum Labs (USA). Tutti i reagenti utilizzati erano di grado analitico.

Le linee cellulari di carcinoma polmonare umano (A549) e cellule epiteliali bronchiali umane (16HBE) sono state fornite da Clini-Sciences (Guidonia Montecelio, Italia).

Gli spettri ¹H-NMR sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro Bruker Avance II300 operante a 300 MHz.

L'analisi mediante cromatografia di esclusione dimensionale (SEC) è stata effettuata utilizzando una colonna Phenomenex Phenogel 5u · 10⁴ (California, USA) collegata a un sistema Agilent 1260 Infinity Multi-Detector GPC/SEC con rivelatore a indice di rifrazione. La fase mobile era costituita da DMF contenente 0,1% p/v di LiBr, con una portata di 0,8 mL/min e la temperatura della colonna

mantenuta a 50 °C. Ogni campione (15 mg/mL) è stato solubilizzato nella fase mobile e filtrato con filtro da 0,2 µm prima dell'iniezione. La curva di calibrazione è stata ottenuta utilizzando standard di polietilenglicole (100–31.000 Da).

5.2.SINTESI DEL COPOLIMERO INU-EDA-C8-PEG

5.2.1.SINTESI DEL COPOLIMERO INU-EDA

La derivatizzazione di INU con EDA è stata effettuata utilizzando BNPC come agente attivante del gruppo ossidrilico dell'INU. In dettaglio, 236 mg di BNPC sono stati aggiunti ad una soluzione contenente 250 mg di INU dispersi in 4 mL di DMF-a. La miscela è stata irradiata per 1h con un microonde (CEM Discover Microwave Reactor) ad una potenza di 25 W. La temperatura della reazione è stata monitorata e mantenuta a 60 °C mediante raffreddamento con flusso di aria compressa esterna. Trascorso il tempo di attivazione, la reazione è stata aggiunta goccia a goccia a una soluzione di EDA preparata, solubilizzando 250 µl di quest'ultima in 1 mL di DMF-a. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione continua a 25 °C per 1 ora sotto atmosfera inerte. Il prodotto ottenuto è stato purificato mediante precipitazione in etere, lavaggi in acetone ed infine cromatografia su gel, usando una Sefadeg g-25 come fase stazionaria per rimuovere solvente organico, BNPC ed EDA non reagiti. La dispersione è stata quindi liofilizzata, ottenendo una polvere giallina.

Le proporzioni stechiometriche utilizzate sono state scelte in accordo con:

- moli BNPC/moli INU = 0,5
- moli EDA/moli INU = 5,0

La resa finale è risultata pari al 96,0% p/p rispetto al peso iniziale di INU. Il composto INU-EDA è stato caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ in D_2O . Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 25°C , TMS) ha evidenziato i seguenti picchi: δ 3,46-5,3 (7H, inulina); δ 3,2 e 2,8 (4H EDA, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$). Il grado di funzionalizzazione % (DD%) è stato uguale a $22,0 \pm 0,6$ %

5.2.2.SINTESI DEL COPOLIMERO INU-EDA-C8

La funzionalizzazione del INU-EDA con C8 è stata effettuata in DMF-a utilizzando EDC-NHS come agenti attivanti, secondo i seguenti rapporto stechiometrici:

- moli C8/moli INU = 0,1;
- moli NHS/moli C8 = 1,2;
- Moli EDC/moli C8 =1,2.

In particolare, 18,13 μL di C8 sono stati solubilizzati in 6 mL di DMF-a. Successivamente alla soluzione sono stati aggiunti EDC/NHS, in quantità adeguate, come attivatori del gruppo carbossilico di C8, mantenendo la miscela in agitazione a 40°C per 4 h.

Parallelamente, è stata preparata una soluzione di INU-EDA in DMF-a (25 mg/mL). Al termine del periodo di attivazione, la soluzione di C8 è stata aggiunta goccia a goccia alla dispersione di INU-EDA sotto agitazione.

La miscela di reazione è stata successivamente mantenuta a 25°C overnight. Al termine, la miscela è stata purificata tramite precipitazione e lavaggi in una miscela Etere:Acetone 1:1, per poi allontanare il solvente in eccesso tramite essiccatore di transito. Il prodotto finale è stato recuperato con una resa pari al 90,0% p/p rispetto al peso iniziale di INU-EDA. Il copolimero INU-EDA-C8 è stato caratterizzato

tramite analisi $^1\text{H-NMR}$. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMF-d_7 (300 MHz, 25°C , TMS) ha evidenziato i seguenti segnali: δ 3,46 e 5,3 (7H, inulina); δ 3,2 e 2,8 (4H EDA, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); δ 1,5 (2H C8, $\text{NH-C(O)-CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_3$); δ 1,25 (10H C8, $\text{NH-C(O)-CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_3$); δ 0,89 (3H C8, $\text{NH-C(O)-CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_3$). Il grado di funzionalizzazione % (DD%) è stato uguale a $4,4 \pm 0,2$ %

5.2.3.SINTESI DEL COPOLIMERO $\text{CH}_3\text{O-PEG-SUCCINATO}$

La derivatizzazione del $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$ con anidride succinica (SUCC) è stata effettuata miscelando due soluzioni organiche in DMF-a. La prima è stata preparata disperdendo 200 mg $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$ in 8 mL di DMF-a, mentre la seconda 82 mg di SUCC in 2 mL di DMF-a. Dopo completa solubilizzazione, la soluzione di SUCC è stata aggiunta goccia a goccia a quella di $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$, sotto agitazione ed è stata fatta reagire per 18 h a 40°C .

Dopo il tempo di reazione, il prodotto ottenuto è stato purificato mediante dialisi esaustiva, utilizzando una membrana con cut-off di 1 kDa contro acqua distillata per rimuovere solvente organico e SUCC non reagito. La dispersione dializzata è stata quindi liofilizzata, ottenendo una polvere bianca.

Le quantità utilizzate erano in accordo con:

- moli SUCC/moli $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2 = 10,0$

La resa finale è risultata pari al 60% p/p rispetto al peso iniziale di $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$. Il composto $\text{CH}_3\text{O-PEG-SUCC}$ è stato caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ in D_2O . Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 25°C , TMS) ha evidenziato i seguenti picchi: δ 3,50 (4H PEG, $\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2)_{44}\text{-OH}$); δ 2,40 (4H SUCC, $\text{C(O)-CH}_2\text{-}$

CH₂-C(O)-OH). Il grado di funzionalizzazione % (DD%) è stato uguale a 100,0±3,2 %.

5.2.4.SINTESI DEL COPOLIMERO INU-EDA-C8-PEG

La funzionalizzazione del INU-EDA-C8 con CH₃O-PEG-SUCC è stata effettuata in acqua distillata utilizzando EDC-NHS come agenti attivante, secondo i seguenti rapporti stechiometrici:

- moli CH₃O-PEG-SUCC /moli INU = 0,05;
- moli NHS/moli CH₃O-PEG-SUCC = 1,5;
- Moli EDC/moli CH₃O-PEG-SUCC =1,5.

In particolare, 80 mg di CH₃O-PEG-SUCC e 150 mg di INU-EDA-C8 sono stati dispersi rispettivamente in 4 e 6 mL di acqua distillata. Successivamente, le due dispersioni sono state unite e dopo avere portato il pH a 6,4, alla dispersione sono stati aggiunti EDC/NHS, in quantità adeguate, come attivatori del gruppo carbossilico di CH₃O-PEG-SUCC. La miscela di reazione è stata successivamente mantenuta in agitazione a 25 °C per 18 h ed a pH 6,4.

Dopo il tempo di reazione, il prodotto ottenuto è stato purificato mediante dialisi esaustiva, utilizzando una membrana con *cut-off* di 1 kDa contro acqua distillata per rimuovere solvente organico e CH₃O-PEG-SUCC non reagito. La dispersione dializzata è stata quindi liofilizzata, ottenendo una polvere bianca-gialla.

Il prodotto finale recuperato ha presentato una resa pari al 98,0% p/p rispetto al peso iniziale di INU-EDA-C8. Il copolimero INU-EDA-C8-PEG è stato caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR. Lo spettro ¹H-NMR in DMF-d₇ (300 MHz, 25°C, TMS) ha evidenziato i seguenti segnali: δ 3,46 e 5,3 (7H, inulina); δ 3,2 e 2,8 (4H EDA,

NH-CH₂-CH₂-NH₂); δ 1,5 (2H C8, NH-C(O)-CH₂-(CH₂)₅-CH₃); δ 1,25 (10H C8, NH-C(O)-CH₂-(CH₂)₅-CH₃); δ 0,89 (3H C8, NH-C(O)-CH₂-(CH₂)₅-CH₃); δ 3,50 (4H PEG, CH₃-O-(CH₂-CH₂)₄₄-O-). Il grado di funzionalizzazione % (DD%) è stato uguale a 5,39±0,4 %.

5.3.DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI AGGREGAZIONE CRITICA (CAC)

La concentrazione critica di aggregazione (CAC) di INU-EDA-C8-PEG è stata determinata mediante analisi di fluorescenza, utilizzando il pirene come sonda. Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorofotometro Shimadzu RF-5301 PC. È stata preparata una soluzione madre di pirene (6.0×10^{-5} M in acetone) e successivamente aliquote di 20 µL sono state poste in acqua e la miscela sottoposta a pressioni ridotte per rimuovere l'acetone fino a concentrazione finale di 12×10^{-7} M. Successivamente, 2 mL di dispersione acquosa di copolimero a concentrazioni comprese tra 1×10^{-5} e 10 mg mL⁻¹ sono stati aggiunti alla soluzione acquosa di pirene. Le soluzioni sono state mantenute a 37°C per 24 ore sotto agitazione. Gli spettri di eccitazione ed emissione del pirene sono stati acquisiti a 37°C. Lo spettro di eccitazione è stato registrato applicando un'emissione di 373 nm e calcolando il rapporto tra le intensità a 338 e 332 nm (I₃₃₈/I₃₃₂), mentre lo spettro di emissione è stato ottenuto eccitando a 333 nm e analizzando il rapporto tra i picchi a 373 e 384 nm (I₁/I₃ = I₃₇₃/I₃₈₄).

5.4.PRODUZIONE MICELLE DI INU-EDA-C8-PEG@SOR

Micelle caricate con Sor (INU-EDA-C8-PEG@Sor) sono state ottenute tramite il metodo *kneading*, una tecnica per preparare micelle, basata sull'idratazione di un film secco. In dettaglio, 45 mg di INU-EDA-C8-PEG e 5 mg di Sor sono stati umettati, in un mortaio, con 1 mL di EtOH ad aliquote da 200 μ L. Ad ogni aliquota il copolimero ed il farmaco sono stati pestati fino a completa evaporazione del solvente organico. Successivamente il film secco è stato raccolto con cinque aliquote da 1 mL di acqua. La dispersione ottenuta è stata sottoposta a quattro cicli di sonicazione e agitazione ognuno di 30 minuti. Infine, il Sor non incapsulato è stato rimosso mediante centrifugazione (4.500 rpm per 5 min) e filtrazione, utilizzando un filtro a siringa in cellulosa rigenerata (RC) da 1,2 μ m. Inoltre, sono state preparate come controllo micelle vuote (INU-EDA-C8-PEG) e micelle non peghilate (INU-EDA-C8) utilizzando la stessa procedura.

5.5.ANALISI DIMENSIONALE E POTENZIALE Z

La dimensione media (nm), l'indice di polidispersità (PDI) e i valori di potenziale- ζ di ciascun campione sono stati determinati su dispersioni acquose di micelle (1 mg/mL) mediante *dynamic light scattering* (DLS), utilizzando un Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Regno Unito). Le misurazioni sono state effettuate con un angolo fisso di 173° a 25°C. Ogni dispersione è stata analizzata in triplicato.

5.6.DETERMINAZIONE DELLA DRUG LOADING (DL%) E DELL'EFFICIENZA DI INCAPSULAZIONE (EE%)

La quantità di Sor incapsulato nelle micelle di INU-EDA-C8-PEG è stata determinata tramite analisi HPLC secondo un metodo precedentemente riportato [175]. In breve, è stato utilizzato un Agilent 1260 Infinity II con autosampler (volume di iniezione 100 μ l) e rivelatore UV-Vis, con colonna C6-fenile (250 $\times$ 4,6 mm, Phenomenex) e fase mobile costituita da metanolo e acqua bidistillata (85:15 v/v) a un flusso di 1 mL/min, in condizioni isocratiche a 25°C con rilevazione dell'assorbanza a 207 nm. I campioni sono stati preparati disperdendo una quantità nota di micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor in 100 μ L di DMSO e agitati per 30 minuti, aggiungendo successivamente 900 μ l della fase mobile. Prima dell'iniezione, i campioni sono stati filtrati con filtri a siringa RC da 0,22 μ m. La quantità di farmaco incorporato è stata quantificata utilizzando una curva di calibrazione con diverse concentrazioni standard di Sor ($y=149.016x$; $R^2=0,9996$).

5.7.STUDI DI RILASCIO

Il rilascio di Sor da micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor è stato determinato in due diversi mezzi di rilascio ovvero, fluido polmonare simulato a pH 7,4 (SLF4) [154] e tampone citrato a pH 5,5, entrambi miscelati con siero fetale bovino (FBS) al 50% v/v, e utilizzando il metodo della dialisi. In particolare, 5 mg di micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor sono stati dispersi in 2,5 mL di ciascun mezzo senza FBS e trasferiti in tubi con membrana da dialisi (MCWO di 12.000 Da), immersi in 22,5 mL di mezzo esterno ed incubati a 37°C con agitazione continua (100 rpm). Ai tempi prestabiliti (0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 ore) aliquote da 1 mL del mezzo esterno sono

state prelevate e sostituite con un uguale volume di mezzo fresco. Ogni campione prelevato è stato miscelato con 4 mL di MeOH, lasciato 1 ora ad agitare, filtrato con filtro RC da 0,22 μm e analizzato mediante HPLC nelle condizioni precedentemente descritte. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato con risultati concordi entro $\pm 5\%$ di errore standard.

5.8.INTERAZIONE CON LA MUCINA

L'interazione tra mucina e ciascun campione di micelle (INU-EDA-C8-PEG o INU-EDA-C8-PEG@Sor) è stata valutata utilizzando la turbidimetria [146], [158]. L'esperimento è stato condotto disperdendo sia i campioni di micelle sia la mucina in PBS a pH 7,4 a una concentrazione di 2 mg/mL. Queste dispersioni sono state poi miscelate in rapporto 1:1 v/v ottenendo una concentrazione finale di 1 mg/mL sia per le micelle che per la mucina. Dopo un'incubazione a 37 °C, è stata analizzata la torbidità del campione mediante spettrofotometria UV, misurando la trasmittanza a 650 nm in diversi intervalli temporali: al tempo 0, dopo 30 minuti, 1 ora, 2 ore e 3 ore. Per una valutazione più completa, sono state esaminate anche la trasmittanza della mucina e quella delle micelle disperse in PBS a pH 7,4. Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato per garantire l'affidabilità dei dati. Come controllo, la stessa procedura è stata applicata a micelle non peghilate costituite dal copolimero INU-EDA-C8.

5.9.VALUTAZIONE PENETRAZIONE DELLA MUCINA TRAMITE LA CELLA DI FRANZ

La valutazione delle interazioni tra le micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor e la mucina, è stata eseguita con un test di permeazione utilizzando celle di diffusione verticali di Franz [158]. La temperatura e l'agitazione del sistema sono state mantenute costanti a 37 °C e 180 rpm grazie all'uso di un *horbital shaker*. Il compartimento accettore è stato riempito con 5 mL di SLF4 e tra i due compartimenti è stata applicata una membrana idrofila di carta filtro (dimensione dei pori: 10-20 µm).

Gli esperimenti sono stati condotti posizionando nella camera donatrice uno strato di muco di fibrosi cistica (CF) (500 µL) (100 mg di acido desossiribonucleico (DNA), 50 mg di mucina, 0,059 mg di acido dietilentriaminopentaacetico (DTPA), 200 µL di soluzione di amminoacidi RPMI 1640, 50 µL di emulsione di *egg yolk*, 50 mg di cloruro di sodio (NaCl) e 22 mg di cloruro di potassio (KCl), per un volume finale di 10 mL, utilizzando acqua priva di DNasi), interposto tra la membrana e 150 µL di dispersione di SLF4 contenente INU-EDA-C8-PEG@Sor (ciascuna contenente 0,8mg/mL mg di Sor). Come controllo, sono stati effettuati esperimenti posizionando nella camera donatrice, sopra lo strato di muco CF, 150 µL di dispersione di SLF4 con Sor alla concentrazione di 0,8 mg/mL.

Campioni (1 mL) sono stati prelevati dalla camera di accettazione a intervalli di tempo prestabiliti (0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 ore) e sostituiti con uguali volumi di mezzo fresco. Ogni campione prelevato è stato miscelato con 4 mL di MeOH, lasciato 1 ora, filtrato con filtro RC da 0,22 µm e analizzato mediante HPLC nelle condizioni

precedentemente descritte. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato con risultati concordi entro $\pm 5\%$ di errore standard.

5.10.ANDERSON CASCADE IMPACTOR (ACI)

Il comportamento aerodinamico delle micelle di INU-EDA-C8-PEG@Sor è stato valutato, utilizzando un nebulizzatore (Kramer new basic 3000) collegato a un *Andersen Cascade Impactor* a 8 stadi (ACI Xearpro, InPharmaTec, composizione 25L/min) a un flusso d'aria di 4 L/min [159]. La composizione dell'impattatore e il flusso selezionato sono stati scelti per simulare le condizioni tipiche di un paziente con difficoltà respiratorie. Tali parametri riflettono infatti il comportamento respiratorio di un soggetto che si sottopone a terapia per aerosol, il quale tende a respirare in modo spontaneo e regolare, senza compiere inspirazioni forzate, e quindi senza partecipare attivamente alla somministrazione del farmaco. Per ogni analisi, 10 mg di micelle sono state disperse in 1mL di acqua distillata e aerosolizzate nell'ACI per 1 minuto, utilizzando una pompa Bravo X Bio. Il processo di aerosolizzazione è stato effettuato più volte, effettuando cicli di aerosolizzazione di 1 min fino a completa aerosolizzazione del liquido (tempo tot 12-15 min). Dopo l'aerosolizzazione, le gocce depositate in ciascuno stadio sono state recuperate con un volume noto di acqua e la quantità di Sor è stata quantificata tramite analisi HPLC media.

Il comportamento aerodinamico delle formulazioni è stato valutato calcolando:

- **Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD):** diametro aerodinamico mediano di massa;

- **Geometric Standard Deviation (GSD)**: calcolato dividendo il diametro al punto 84,1% della distribuzione cumulativa per l'MMAD;
- **Fine Particle Fraction (FPF%)**: percentuale di particelle con diametro aerodinamico $<5\ \mu\text{m}$ [176].

5.11. CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA

La caratterizzazione biologica delle micelle di INU-EDA-C8-PEG vuote e caricate con Sor è stata effettuata su cellule di carcinoma polmonare umano (A549) e su una linea di cellule epiteliali bronchiali umane (16HBE). Le cellule sono state fatte crescere in *flask* a 37°C in atmosfera umidificata con 5% CO₂. Il mezzo di crescita è stato *Dulbecco Minimum Essential Medium* (DMEM) (Costar, Corning, MA, USA) supplementato con 10% di FBS, 1% di L-glutamina e 1% di penicillina/streptomicina (Euroclone).

5.12. VITALITÀ SULLE CELLULE 16 HBE E A549

Gli effetti citotossici di Sor libero, INU-EDA-C8-PEG e INU-EDA-C8-PEG@Sor sono stati valutati in vitro sulle linee cellulari A549 e 16HBE utilizzando il test MTS. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a 5×10^3 cellule/pozzetto e fatte crescere in DMEM. Dopo 24 ore, il mezzo è stato sostituito con 200 μL di DMEM contenente INU-EDA-C8-PEG e INU-EDA-C8-PEG@Sor a concentrazioni variabili, equivalenti a concentrazioni di Sor da 10 a 100 μM . Dopo 24 e 48 ore di incubazione, è stato effettuato il test MTS secondo le istruzioni del produttore. Le dispersioni di Sor libero, preparate diluendo una soluzione *stock* in DMSO (1 mg/mL) in DMEM, sono state utilizzate come controllo positivo. Le

cellule non trattate hanno costituito il controllo negativo. La vitalità cellulare è stata espressa come percentuale relativa all'assorbanza del gruppo di controllo non trattato, considerato al 100% di vitalità. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i risultati sono stati espressi come medie $\pm$ deviazione standard.

6. MICROPARTICELLE INALABILI DI TIPO NANO INTO MICRO PER LA SOMMINISTRAZIONE POLMONARE E IL DIREZIONAMENTO DI SOR AL CANCRO POLMONARE

6.1. MATERIALI E METODI

N,N'-dimetilformammide anidra (DMF-a), N,N'-dimetilacetamide anidra (DMA-a), acido folico (FA), acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA privo di acidi, $\bar{M}_w$ 10.000–12.000 Da), ossido di deuterio (D₂O), DMF deuterato (DMF-d₇), bis-amminopolietilenglicole 2.000 (NH₂-PEG-NH₂, $\bar{M}_w$ = 2.000 Da), dietilamina (DEA), trietilamina (TEA), 1,1'-carbodiimmidazolo (CDI), carbonato di disuccinimidile (DSC), polivinilpirrolidone 40 kDa (PVP), sorafenib (Sor), etere dietilico, acetone, etanolo, acetonitrile (ACN), diclorometano (DCM), mucina di stomaco suino, soluzione tampone salina fosfata di Dulbecco (DPBS), D-mannitolo (MAN), leucina (LEU), N-acetilcisteina (NAC), bicarbonato di ammonio (AB) e standard in polistirene (10.000–150.000 Da) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Italia).

Le membrane per dialisi sono state acquistate da Spectrum Labs (USA). Tutti i reagenti utilizzati erano di grado analitico.

Le linee cellulari di carcinoma polmonare umano (A549) e cellule epiteliali bronchiali umane (16HBE) sono state fornite da Clini-Sciences (Guidonia Montecelio, Italia).

Gli spettri ¹H-NMR sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro Bruker Avance II300 operante a 300 MHz.

L'analisi mediante cromatografia di esclusione dimensionale (SEC) è stata effettuata utilizzando una colonna Phenomenex Phenogel 5u · 10⁴ (California, USA)

collegata a un sistema Agilent 1260 Infinity Multi-Detector GPC/SEC con rivelatore a indice di rifrazione. La fase mobile era costituita da DMF contenente 0,1% p/v di LiBr, con una portata di 0,8 mL/min e la temperatura della colonna mantenuta a 50 °C. Ogni campione (15 mg/mL) è stato solubilizzato nella fase mobile e filtrato con filtro da 0,2 µm prima dell'iniezione. La curva di calibrazione è stata ottenuta utilizzando standard in polistirene (10.000–150.000 Da).

La preparazione e la purificazione del polimero α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartamide (PHEA) è stata effettuata seguendo metodiche precedentemente consolidate [155].

6.2.SINTESI DEL COPOLIMERO PHEA-*G*-PLGA-*G*-PEG-FA

6.2.1.SINTESI DEL COPOLIMERO POLIETILENGLICOLE-AMMINO-FOLATO (H₂N-PEG-FA)

La derivatizzazione di H₂N-PEG-NH₂ con acido folico (FA) è stata effettuata utilizzando CDI come agente attivante del gruppo carbossilico del FA. In dettaglio, 74 mg di CDI sono stati aggiunti a 100 mg di FA precedentemente dispersi in 6 mL di DMSO-a. La dispersione risultante è stata mantenuta a 40 °C sotto atmosfera inerte per 3 ore. Parallelamente, è stata preparata una soluzione di H₂N-PEG-NH₂, solubilizzando il polimero in DMSO-a ad una concentrazione di 113 mg/mL e utilizzando DEA come catalizzatore.

Dopo l'attivazione, la soluzione di H₂N-PEG-NH₂ è stata aggiunta goccia a goccia alla soluzione di FA. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione continua a 40 °C per 20 ore sotto atmosfera inerte. Il prodotto ottenuto è stato purificato mediante dialisi esaustiva, utilizzando una membrana con cut-off di 2

kDa contro acqua distillata aggiustata a pH 9 con NaOH per rimuovere solvente organico, CDI e FA non reagiti. La dispersione dializzata è stata quindi liofilizzata, ottenendo una polvere gialla. Tale polvere è stata risolubilizzata in 2 mL di acqua distillata e ulteriormente purificata tramite cromatografia su gel (GPC), utilizzando Sephadex G-25 come fase stazionaria.

Le proporzioni stechiometriche utilizzate sono state:

- moli CDI/moli FA = 2,0
- moli FA/moli H₂N-PEG-NH₂ = 2,0
- moli DEA/moli H₂N-PEG-NH₂ = 0,75.

La resa finale è risultata pari al 44,5% p/p rispetto al peso iniziale di NH₂-PEG-NH₂. Il composto H₂N-PEG-FA è stato caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR in D₂O. Lo spettro ¹H-NMR (300 MHz, 25°C, TMS) ha evidenziato i seguenti picchi: δ 3,6 (4H PEG, -[CH₂CH₂O]₄₄-); δ 6,6 (2H FA, -[C(O)-C-CH=CH]-); δ 7,5 (2H FA, -[NH-C(O)-CH=CH]-); δ 8,5 (1H FA, -[C-CH=N]-). Il grado di funzionalizzazione % (DD%) è stato uguale a 100,0±2,4 %.

6.2.2.SINTESI DEL COPOLIMERO PHEA-g-PLGA

La derivatizzazione di PHEA con Acido polilattico co-glicolico (PLGA) è stata effettuata utilizzando CDI come agente attivante del gruppo carbossilico del PLGA. In dettaglio, 2,1 mg di CDI sono stati aggiunti a 780 mg di PLGA precedentemente dispersi in 8,5 mL di DMF-a. La dispersione risultante è stata mantenuta a 40 °C per 4 ore. Parallelamente, è stata preparata una soluzione di PHEA, solubilizzando il polimero in DMF-a ad una concentrazione di 33,33 mg/mL e utilizzando DEA come catalizzatore.

Dopo l'attivazione, la soluzione di PHEA è stata aggiunta goccia a goccia alla soluzione di PLGA. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione continua a 40 °C per 48 ore. Il prodotto ottenuto è stato purificato mediante precipitazione in etere e con lavaggi in etere:DCM (45:55) per rimuovere solvente organico, CDI e PLGA non reagiti. Infine, il prodotto è stato fatto seccare in essiccatore di transito.

Le quantità utilizzate sono in accordo con:

- moli PLGA/moli PHEA = 0,05
- moli CDI/moli PLGA = 2,0
- moli DEA/moli PLGA = 5,0

La resa finale è risultata pari al 61% p/p rispetto al peso iniziale di PHEA. Il composto PHEA-PLGA è stato caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ in DMF- d_7 . Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 25°C, TMS) ha evidenziato i seguenti picchi: δ 1,5–1,7 (3H PLGA, $-\text{[OCO-CH(CH}_3\text{)]}_{92}-$); δ 3,0 (2H PHEA, $-\text{COCHCH}_2\text{CONH-}$); δ 3,3 (2H PHEA, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O-}$); δ 3,6 (2H PHEA, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O-}$); δ 5,0 (1H PHEA, $-\text{NHCH(CO)CH}_2-$); δ 4,2–4,5 e 5,4–5,8 (1H PLGA, $-\text{[OCOCH(CH}_3\text{)]}_{92}-$); δ 5,3 (2H PLGA, $-\text{[OCOCH}_2\text{]}_{92}-$). Il grado di funzionalizzazione % (DD%) è stato uguale a $3,4 \pm 0,2$ %

6.2.3.SINTESI DEL COPOLIMERO PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA

La funzionalizzazione del PHEA-g-PLGA [170] con $\text{H}_2\text{N-PEG-FA}$ è stata effettuata in DMA-a, utilizzando DSC come agente accoppiante e TEA come catalizzatore, secondo le seguenti condizioni stechiometriche:

- moli di DSC/moli di unità ripetitiva di PHEA = 0,1;

- moli di TEA/moli di DSC = 1.
- Moli di H₂N-PEG-FA/moli di unità ripetitiva di PHEA= 0,075.

In particolare, a una dispersione di PHEA-g-PLGA in DMA-a (50 mg/mL) sono stati aggiunti DSC e TEA in quantità adeguate, mantenendo la miscela in agitazione a 40 °C per 4 ore per attivare i gruppi ossidrilici dell'unità ripetitiva del PHEA.

Parallelamente, è stata preparata una soluzione di H₂N-PEG-FA in DMA-a (17 mg/mL), utilizzando un rapporto molare di 0,075 mol di H₂N-PEG-FA per mol di unità ripetitiva di PHEA. Al termine del periodo di attivazione, la dispersione di PHEA-g-PLGA è stata aggiunta goccia a goccia alla dispersione di H₂N-PEG-FA sotto agitazione.

La miscela di reazione è stata successivamente mantenuta a 25 °C per 24 ore. Al termine, la miscela è stata posta in un tubo per dialisi, utilizzando una membrana con MWCO di 25 kDa contro acqua distillata, per rimuovere solventi organici e H₂N-PEG-FA non reagito. Il prodotto finale è stato recuperato tramite liofilizzazione, ottenendo una resa pari al 75% p/p rispetto al peso iniziale di PHEA-g-PLGA. Il copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG-FA è stato caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR. Lo spettro ¹H-NMR in DMF-d₇ (300 MHz, 25°C, TMS) ha evidenziato i seguenti segnali: δ 1,5–1,7 (3H PLGA, -[OCO-CH(CH₃)]₉₂-); δ 3,0 (2H PHEA, -COCHCH₂CONH-); δ 3,3 (2H PHEA, -NHCH₂CH₂O-); δ 3,6 (2H PHEA, -NHCH₂CH₂O-); δ 3,7 (4H PEG, -[CH₂CH₂O]₄₄-); δ 5,0 (1H PHEA, -NHCH(CO)CH₂-); δ 4,2–4,5 e 5,4–5,8 (1H PLGA, -[OCOCH(CH₃)]₉₂-); δ 5,3 (2H PLGA, -[OCOCH₂]₉₂-). Il grado di funzionalizzazione % (DD%) è stato uguale a 4,5±0,4 %

6.3.PRODUZIONE DI NANOPARTICELLE DI PHEA-*G*-PLGA-*G*-PEG-FA

Nanoparticelle caricate con Sor (FA-PPP-NPs@Sor) sono state ottenute tramite il metodo di nanoprecipitazione. In dettaglio, 50 mg di PHEA-*g*-PLGA-*g*-PEG-FA e 10 mg di Sor sono stati solubilizzati in 2 mL di DMSO ed aggiunti goccia a goccia sotto agitazione a 20 mL di dispersione di PVP 40 kDa (0,4% p/v). Le nanoparticelle ottenute sono state purificate mediante dialisi esaustiva, utilizzando una membrana con MWCO di 12-14 kDa per rimuovere il solvente DMSO, e dopo sei ore trasferite in dialisi con MWCO di 100 kDa per tutta la notte per rimuovere l'eccesso di PVP. Infine, il Sor non incapsulato è stato rimosso mediante filtrazione utilizzando un filtro a siringa in cellulosa rigenerata (RC) da 5 µm. Inoltre, sono state preparate come controllo nanoparticelle vuote (FA-PPP-NPs) e nanoparticelle non peghilate (PP-NPs) utilizzando la stessa procedura.

6.4.ANALISI DIMENSIONALE E POTENZIALE Z

La dimensione media (nm), l'indice di polidispersità (PDI) e i valori di potenziale- ζ di ciascun campione sono stati determinati su dispersioni acquose di nanoparticelle (1 mg/mL) mediante dinamic light scattering (DLS) utilizzando un Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Regno Unito). Le misurazioni sono state effettuate con un angolo fisso di 173° a 25°C. Ogni dispersione è stata analizzata in triplicato.

6.5.INTERAZIONE CON LA MUCINA

L'interazione tra mucina e ciascun campione di nanoparticelle (FA-PPP-NPs o FA-PPP-NPs@Sor) è stata valutata utilizzando la turbidimetria [146], [158].

L'esperimento è stato condotto preparando due dispersioni ovvero, una di nanoparticelle e una di mucina in PBS a pH 7,4 a una concentrazione di 2 mg/mL. Queste dispersioni sono state poi miscelate in rapporto 1:1 v/v, ottenendo una concentrazione finale di 1 mg/mL sia per le nanoparticelle che per la mucina. Dopo incubazione a 37°C, la torbidità è stata valutata misurando la trasmittanza a 650 nm al tempo 0 e dopo 30 minuti, 1, 2 e 3 ore. Sono stati valutati anche l'assorbanza della mucina e delle nanoparticelle disperse in PBS a pH 7,4. Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato. Come controllo, è stata applicata la stessa procedura su nanoparticelle non peghilate costituite dal copolimero PHEA-g-PLGA (PP-NPs).

6.6.DETERMINAZIONE DELLA DRUG LOADING (DL%) E DELL'EFFICIENZA DI INCAPSULAZIONE (EE%)

La quantità di Sor incorporato nelle FA-PPP-NPs è stata determinata tramite analisi HPLC secondo un metodo precedentemente riportato [175]. In breve, è stato utilizzato un Agilent 1260 Infinity II con autosampler (volume di iniezione 100 µl) e rivelatore UV-Vis, con colonna C6-fenile (250 × 4,6 mm, Phenomenex) e fase mobile costituita da metanolo e acqua bidistillata (85:15 v/v) a un flusso di 1 mL/min, in condizioni isocratiche a 25°C con rilevazione dell'assorbanza a 207 nm. I campioni sono stati preparati disperdendo una quantità nota di PPP-FA-NPs@Sor in 100 µl di DMSO e agitati per 30 minuti, aggiungendo successivamente 900 µl della fase mobile. Prima dell'iniezione, i campioni sono stati filtrati con filtri a siringa RC da 0,22 µm. La quantità di farmaco incapsulato, espressa come *drug*

loading % (DL%), è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione con diverse concentrazioni standard di Sor.

6.7.STUDI DI RILASCIO

Il rilascio di Sor da FA-PPP-NPs@Sor è stato determinato in due diversi mezzi di rilascio ovvero, fluido polmonare simulato a pH 7,4 (SLF4) [154] e tampone citrato a pH 5,5, entrambi supplementati con siero fetale bovino (FBS) al 50% v/v, utilizzando il metodo della dialisi. In breve, 5 mg di FA-PPP-NPs@Sor sono stati dispersi in 2,5 mL di ciascun mezzo senza FBS e trasferiti in tubi con membrana da dialisi (MCWO di 12.000 Da), immersi in 22,5 mL di mezzo esterno ed incubati a 37°C con agitazione continua (100 rpm). Ai tempi prestabiliti (0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 ore) aliquote da 1 mL del mezzo esterno sono state prelevate e sostituite con un uguale volume di mezzo fresco. Ogni campione prelevato è stato miscelato con 4 mL di MeOH, lasciato 1 ora ad agitare, filtrato con filtro RC da 0,22 µm e analizzato mediante HPLC nelle condizioni precedentemente descritte. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato con risultati concordi entro $\pm 5\%$ di errore standard.

6.8.CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA

La caratterizzazione biologica delle FA-PPP-NPs vuote e caricate con Sor è stata effettuata su cellule di carcinoma polmonare umano (A549) e su una linea di cellule epiteliali bronchiali umane (16HBE). Le cellule sono state coltivate in flask a 37°C in atmosfera umidificata con 5% CO₂. Il mezzo di crescita era Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM) (Costar. Corning. MA. USA) supplementato con 10% di FBS. 1% di L-glutamina e 1% di penicillina/streptomicina (Euroclone).

6.9.CITOTOSSICITÀ CELLULARE

Gli effetti citotossici di Sor libero, FA-PPP-NPs e FA-PPP-NPs@Sor sono stati valutati in vitro sulle linee cellulari A549 e 16HBE utilizzando il test MTS. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a 5×10^3 cellule/pozzetto e fatte crescere in DMEM. Dopo 24 ore, il mezzo è stato sostituito con 200 μ l di DMEM contenente FA-PPP-NPs e FA-PPP-NPs@Sor a concentrazioni variabili equivalenti a concentrazioni di Sor da 10 a 100 μ M. Dopo 24 e 48 ore di incubazione è stato effettuato il test MTS secondo le istruzioni del produttore. Le dispersioni di Sor libero, preparate diluendo una soluzione *stock* in DMSO (1 mg/mL) in DMEM, sono state utilizzate come controllo positivo. Le cellule non trattate hanno costituito il controllo negativo. La vitalità cellulare è stata espressa come percentuale relativa all'assorbanza del gruppo di controllo non trattato, considerato al 100% di vitalità. Un ulteriore test di citotossicità è stato effettuato su cellule A549 per valutare l'effetto competitivo dell'acido folico. Le cellule sono state pretrattate con una soluzione di FA (100 μ g/mL) per 4 ore prima dell'incubazione con Sor libero o FA-PPP-NPs@Sor nelle stesse condizioni sperimentali. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i risultati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

6.10.UPTAKE SULLE CELLULE A549

Per studiare l'assorbimento delle nanoparticelle da parte delle cellule, è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza (Zeiss "AXIO Vert. A1", rovesciato). Le cellule A549 (un tipo di cellule tumorali polmonari umane) sono state seminate in piastre da 8 pozzetti, con una densità di 25.000 cellule per pozzetto, e coltivate per

24 ore. Dopo questo tempo, il mezzo di coltura è stato sostituito con 500 μ L di nuovo mezzo (DMEM) contenente una sospensione di nanoparticelle FA-PPP-NPs@Sor marcate con rodamina (RhB), in modo da ottenere una concentrazione di Sor pari a 20 μ M. Le cellule sono state poi incubate per quattro ore. Terminata l'incubazione, il mezzo è stato rimosso, le cellule sono state lavate due volte con PBS (una soluzione salina tampone a pH 7,4), fissate con formaldeide al 4% per 10 minuti e poi lavate nuovamente con DPBS. I nuclei cellulari sono stati colorati con DAPI, un colorante che evidenzia il DNA, per 10 minuti a temperatura ambiente. Le immagini sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza dotato di fotocamera Axio Cam MRm (Zeiss). Le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo per stabilire il livello di autofluorescenza naturale.

6.11.SCRATCH TEST

Lo *scratch test* è stato eseguito su cellule A549 per valutare la capacità delle nanoparticelle caricate con Sor di inibire o ridurre la migrazione cellulare. Le cellule sono state seminate a 5×10^3 cellule/pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate a 37°C per formare un monostrato uniforme. Dopo 24 ore, in ciascun pozzetto è stato effettuato un graffio lineare utilizzando una punta sterile da 200 μ l. Le cellule non aderenti e distaccate sono state rimosse lavando delicatamente due volte con PBS. Le cellule sono state quindi trattate con Sor o FA-PPP-NPs@Sor a 25 μ M. Come controllo sono stati utilizzati pozzetti contenenti solo il mezzo di coltura. La chiusura della ferita è stata monitorata a 0 ore, 24 ore e 48 ore, acquisendo immagini al microscopio. La percentuale di chiusura della ferita,

indicativa della migrazione cellulare, è stata calcolata misurando la distanza tra i bordi della ferita e confrontandola nel tempo.

6.12.PRODUZIONE DELLE MICROPARTICELLE E NiM

Le formulazioni MPs e NiM sono state prodotte utilizzando un *Mini Spray Dryer* B-290 (Buchi. Milano. Italia). Inizialmente, la composizione della matrice è stata ottimizzata producendo un campione di microparticelle vuote (MPs) variando la composizione della soluzione di alimentazione in termini di concentrazione di mannitolo (MAN), leucina (LEU), N-acetil cisteina (NAC) e bicarbonato di ammonio (AB) [170]. Inoltre, la rodamina B (RhB) alla concentrazione dello 0,05% p/v è stata aggiunta alla soluzione di alimentazione di tutti i campioni per consentire il tracciamento delle particelle tramite fluorescenza.

In dettaglio, la concentrazione di MAN è stata regolata tra il 5% e il 6% p/v, il rapporto NAC/LEU variato tra 1:1 e 1:2 p/p, mentre il contenuto di AB (porogeno) è stato modulato tra 0,5% e 1% p/v. Inoltre, le condizioni operative, tra cui la portata della pompa e i parametri di aspirazione, sono stati ottimizzati per valutarne l'influenza sulla formazione delle microparticelle. L'intero set di MPs in funzione della composizione della soluzione di alimentazione e dei parametri operativi è riportato nella **Tab.12**.

Tab.12: Composizione qualitativa-quantitativa del fluido di alimentazione e condizioni operative per la produzione dei campioni di microparticelle vuote e NiM mediante *spray drying* (SD).

Campione	MAN % p/v	NAC % p/v	LEU % p/v	AB % p/v	NPs % p/v	T. (°C)	Pompa	Asp.	Resa % p/p
MPsA	6	1	2	1	---	110	7	100	67,5
MPsB	6	1	2	1	---	110	7	70	57,5
MPsC	6	1	1	0,5	---	110	7	70	46,7
MPsD	6	1	1	0,5	---	110	10	100	50,5
MPsE	5	1	1	0,5	---	110	7	70	54,0
MPsF	5	1	1	0,5	---	110	10	100	53,9
NiM	5	1	1	0,5	0,45	110	10	100	63,0

Dopo completa dissoluzione degli eccipienti, la dispersione ottenuta è stata filtrata tramite filtri a siringa da 5 µm per garantire chiarezza e uniformità, quindi spruzzata usando un ugello atomizzatore da 140 mm, con temperatura di ingresso di 110 °C e temperatura di uscita tra 60–66 °C. L'aria deumidificata è stata utilizzata come gas di essiccazione con portata della pompa impostata al 10%.

Per ottenere le particelle NiM, FA-PPP-NPs@Sor sono state aggiunte alla soluzione di alimentazione del campione MPsF a una concentrazione finale di 4,5 mg/mL (0,45% p/v) prima dello *spray drying*, ottenendo la formulazione NiM_{Sor}. Il processo è stato effettuato alle stesse condizioni descritte per le MPs. Per valutare la ridispersibilità delle microparticelle e verificare che lo *spray drying* non avesse alterato dimensione e carica superficiale, 15 mg di NiM sono stati ridispersi in 1 mL di acqua bidistillata sotto agitazione per 15 minuti. La dimensione delle

particelle, l'indice di polidispersione (PDI) e il potenziale- ζ sono stati misurati tramite DLS.

6.13.MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

La morfologia dei campioni di microparticelle ottenuti è stata analizzata tramite microscopia elettronica a scansione (SEM), utilizzando un Phenom™ ProX Desktop SEM (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). Prima dell'acquisizione delle immagini, i campioni sono stati fissati su supporti in acciaio inox con nastro biadesivo. La distribuzione dimensionale ed il diametro geometrico (d_{geo}) delle particelle sono stati calcolati tramite software ImageJ analizzando più di 500 particelle. Il diametro aerodinamico teorico (d_a) è stato calcolato utilizzando un'equazione riportata in letteratura [155].

6.14.DENSITA TAPPED

La densità *tapped* (d_{tapp}) di ciascun campione di polvere è stata determinata con il metodo della siringa come precedentemente riportato. Brevemente, una quantità nota di polvere è stata introdotta in una siringa graduata da 1 mL e la massa determinata per differenza di peso. Per misurare il volume *tapped*, la siringa è stata delicatamente battuta contro una superficie piana da un'altezza di 2,5 cm per 100 volte fino a stabilizzazione del volume. La ρ_{tapp} è stata calcolata dividendo la massa della polvere per il volume stabilizzato. Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato.

6.15.ANDERSEN CASCADE IMPACTOR (ACI)

Il comportamento aerodinamico dei campioni MP_sE, MP_sF e NiM_{Sor} è stato valutato, utilizzando un inalatore DPI Handihaler® collegato a un Andersen Cascade Impactor a 8 stadi (ACI, InPharmaTec) a un flusso d'aria di 90 L/min.

Per ottimizzare la deposizione delle particelle durante l'aerosolizzazione, piatti e coppe di impatto di tutti gli stadi sono stati rivestiti con una soluzione all'1% di Tween 80 in etanolo e lasciati asciugare completamente.

Per ogni analisi, sei capsule in metilcellulosa (type 3) sono state riempite manualmente con 40 mg di ciascuna polvere e aerosolizzate nell'ACI per 5 secondi, utilizzando una pompa Bravo X Bio. Dopo l'aerosolizzazione, la polvere depositata in ciascuno stadio è stata recuperata con un volume noto di acqua e le intensità di assorbanza misurate a 540 nm. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per NiM_{Sor}, quantificando la quantità di farmaco depositato tramite HPLC e misurando simultaneamente la fluorescenza della rodamina B per tracciare la distribuzione della matrice delle microparticelle.

Per caratterizzare le prestazioni aerodinamiche delle formulazioni, sono stati calcolati diversi parametri:

- **Emitted Fraction Percentage (EF%)**: quantità di polvere rilasciata dal DPI rispetto alla massa totale caricata;
- **Inhaled Powder Percentage (IP%)**: frazione della polvere emessa che si deposita sugli stadi dell'ACI;
- **Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)**: diametro aerodinamico mediano di massa;

- **Geometric Standard Deviation (GSD)**: calcolato dividendo il diametro al punto 84,1% della distribuzione cumulativa per il MMAD;
- **Fine Particle Fraction (FPF%)**: percentuale di particelle con diametro aerodinamico $<5\ \mu\text{m}$ [176].

6.16. ANALISI REOLOGICA

Le analisi reologiche sono state condotte su dispersioni acquose di mucina (6% p/v), sia in assenza che in presenza di NiM_{Sor} a concentrazioni di 2, 5 e 10 mg/mL. Le misurazioni sono state eseguite a 37°C immediatamente dopo la preparazione ($t=0$) e dopo 3 ore di incubazione ($t=3$), utilizzando un reometro rotazionale (TA Instruments, New Castle, DE, USA) con piatto Peltier da 20 mm e piatto parallelo e con gap costante di 200 μm [146]. La regione lineare viscoelastica (LVR) della mucina è stata identificata tramite test di *sweep* di deformazione da 0,01% a 1%. Successivamente, su tutti i campioni è stato eseguito uno *sweep* di flusso a shear rate 10-100 1/s per misurare la viscosità complessa (η^*). Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato e i dati analizzati con il software Trios v3.3 (TA Instruments). Come controllo, lo stesso protocollo è stato applicato alle microparticelle contenenti solo mannitolo (MANmicro).

7.BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Islami *et al.*, “American Cancer Society’s report on the status of cancer disparities in the United States, 2023,” *CA Cancer J Clin*, vol. 74, no. 2, pp. 136–166, Mar. 2024, doi: 10.3322/CAAC.21812.
- [2] M. Gozlu, O. Senol, U. Cirakli, H. Aslan, F. Akbulut, and D. Gokkaya, “The effect of air pollution quality on lung cancer rates in middle-income and high-income countries: a panel data analysis approach,” *Front Public Health*, vol. 12, p. 1372320, Aug. 2024, doi: 10.3389/FPUBH.2024.1372320/BIBTEX.
- [3] S. S. Salvi and P. J. Barnes, “Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers,” *The Lancet*, vol. 374, no. 9691, pp. 733–743, Sep. 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)61303-9.
- [4] A. Passaro, T. Mok, S. Peters, S. Popat, M. J. Ahn, and F. de Marinis, “Recent Advances on the Role of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in the Management of NSCLC With Uncommon, Non Exon 20 Insertions, EGFR Mutations,” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 16, no. 5, pp. 764–773, May 2021, doi: 10.1016/J.JTHO.2020.12.002.
- [5] E. Castellanos, E. Feld, and L. Horn, “Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non–Small Cell Lung Cancer,” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 12, no. 4, pp. 612–623, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.JTHO.2016.12.014.
- [6] B. J. Solomon *et al.*, “First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer ,” *New England Journal of Medicine*, vol. 371, no. 23, pp. 2167–2177, Dec. 2014, doi: 10.1056/NEJMOA1408440,.
- [7] S. Gendarme, O. Bylicki, C. Chouaid, and F. Guisier, “ROS-1 Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date,” *Current Oncology 2022, Vol. 29, Pages 641-658*, vol. 29, no. 2, pp. 641–658, Jan. 2022, doi: 10.3390/CURRONCOL29020057.
- [8] M. Santarpia *et al.*, “Targeted therapies for KRAS-mutant non-small cell lung cancer: from preclinical studies to clinical development—a narrative review,” *Transl Lung Cancer Res*, vol. 12, no. 2, pp. 346–368, Feb. 2023, doi: 10.21037/TLCR-22-639/COIF).
- [9] B. El Osta, “KRAS G12C mutation: from undruggable target to potentially agnostic biomarker,” *Transl Lung Cancer Res*, vol. 12, no. 6, pp. 1147–1151, 2023, doi: 10.21037/TLCR-23-174.
- [10] A. G. Nicholson *et al.*, “The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015,” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 17, no. 3, pp. 362–387, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jtho.2021.11.003.
- [11] K. C. Thandra, A. Barsouk, K. Saginala, J. S. Aluru, and A. Barsouk, “Epidemiology of lung cancer,” *Wspolczesna Onkologia*, vol. 25, no. 1, pp. 45–52, 2021, doi: 10.5114/WO.2021.103829,.
- [12] R. L. Siegel, K. D. Miller, N. S. Wagle, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2023,” *CA Cancer J Clin*, vol. 73, no. 1, pp. 17–48, Jan. 2023, doi: 10.3322/caac.21763.

- [13] A. F. Gazdar, P. A. Bunn, and J. D. Minna, "Small-cell lung cancer: What we know, what we need to know and the path forward," *Nat Rev Cancer*, vol. 17, no. 12, pp. 725–737, Dec. 2017, doi: 10.1038/NRC.2017.87.
- [14] Z. Megyesfalvi *et al.*, "Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions," *CA Cancer J Clin*, vol. 73, no. 6, pp. 620–652, Nov. 2023, doi: 10.3322/CAAC.21785;CTYPE:STRING:JOURNAL.
- [15] "An Update on WHO Classification of Thoracic Tumours 2021-Newly Described Entities and Terminologies", doi: 10.7860/JCDR/2023/62583.18076.
- [16] J. C. Chang and N. Rekhtman, "Pathologic Assessment and Staging of Multiple Non-Small Cell Lung Carcinomas: A Paradigm Shift with the Emerging Role of Molecular Methods," *Modern Pathology*, vol. 37, no. 5, p. 100453, May 2024, doi: 10.1016/J.MODPAT.2024.100453.
- [17] W. Pao and N. Girard, "New driver mutations in non-small-cell lung cancer," *Lancet Oncol*, vol. 12, no. 2, pp. 175–180, Feb. 2011, doi: 10.1016/S1470-2045(10)70087-5.
- [18] T. J. Lynch *et al.*, "Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib," *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 21, pp. 2129–2139, May 2004, doi: 10.1056/NEJMOA040938/SUPPL_FILE/NEJMOA040938_APPENDIX.PDF.
- [19] A. J. Alberg, M. V. Brock, J. G. Ford, J. M. Samet, and S. D. Spivack, "Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines," *Chest*, vol. 143, no. 5, pp. e1S-e29S, May 2013, doi: 10.1378/CHEST.12-2345.
- [20] P. Goldstraw *et al.*, "The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 11, no. 1, pp. 39–51, 2016, doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
- [21] V. W. Rusch *et al.*, "The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for the M Descriptors and for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Mesothelioma," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 11, no. 12, pp. 2112–2119, 2016, doi: 10.1016/j.jtho.2016.09.124.
- [22] "Small Cell Lung Cancer Stages | Stages of Small Cell Lung Cancer | American Cancer Society." Accessed: Jun. 21, 2025. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/staging-sclc.html>
- [23] K. A. Powers and A. S. Dhamoon, "Physiology, Pulmonary Ventilation and Perfusion," *StatPearls*, Jan. 2023, Accessed: Jun. 21, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539907/>
- [24] A. R. Larici *et al.*, "ESR Essentials: imaging in fibrotic lung diseases—practice recommendations by the European Society of Thoracic Imaging," *Eur Radiol*, vol. 35, no. 4, pp. 2245–2255, Apr. 2024, doi: 10.1007/S00330-024-11054-2/FIGURES/7.

- [25] D. J. Lederer and F. J. Martinez, "Idiopathic Pulmonary Fibrosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 19, pp. 1811–1823, May 2018, doi: 10.1056/NEJMRA1705751.
- [26] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases," *Nature Reviews Drug Discovery* 2011 10:6, vol. 10, no. 6, pp. 417–427, Jun. 2011, doi: 10.1038/nrd3455.
- [27] Y. Sato, K. Marutsuka, Y. Asada, M. Yamada, T. Setoguchi, and A. Sumiyoshi, "Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy," *Pathol Int*, vol. 45, no. 6, pp. 436–440, 1995, doi: 10.1111/J.1440-1827.1995.TB03481.X,.
- [28] B. R. O'driscoll, L. S. Howard, J. Earis, and V. Mak, "BTS guideline for oxygen use in adults in healthcare and emergency settings," 2016, doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209729.
- [29] L. G. Franciosi *et al.*, "Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease," 2006, doi: 10.1186/1465-9921-7-74.
- [30] L. Richeldi, H. R. Collard, and M. G. Jones, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *The Lancet*, vol. 389, no. 10082, pp. 1941–1952, May 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)30866-8.
- [31] D. F. Quail and J. A. Joyce, "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis," *Nature Medicine* 2013 19:11, vol. 19, no. 11, pp. 1423–1437, Nov. 2013, doi: 10.1038/nm.3394.
- [32] L. E. L. Hendriks *et al.*, "Non-small-cell lung cancer," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 10, no. 1, p. 71, Dec. 2024, doi: 10.1038/S41572-024-00551-9.
- [33] R. S. Herbst, D. Morgensztern, and C. Boshoff, "The biology and management of non-small cell lung cancer," *Nature* 2018 553:7689, vol. 553, no. 7689, pp. 446–454, Jan. 2018, doi: 10.1038/nature25183.
- [34] F. Skoulidis and J. V. Heymach, "Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy," *Nature Reviews Cancer* 2019 19:9, vol. 19, no. 9, pp. 495–509, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41568-019-0179-8.
- [35] P. Lu, V. M. Weaver, and Z. Werb, "The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression," *Journal of Cell Biology*, vol. 196, no. 4, pp. 395–406, 2012, doi: 10.1083/JCB.201102147,.
- [36] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [37] D. I. S. Rosenbloom, P. G. Camara, T. Chu, and R. Rabadan, "Evolutionary scalpels for dissecting tumor ecosystems," *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, vol. 1867, no. 2, pp. 69–83, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.bbcan.2016.11.005.
- [38] R. Kalluri, "The biology and function of fibroblasts in cancer," *Nature Reviews Cancer* 2016 16:9, vol. 16, no. 9, pp. 582–598, Aug. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.73.

- [39] M. A. Nieto, R. Y. Y. J. Huang, R. A. A. Jackson, and J. P. P. Thiery, "EMT: 2016," *Cell*, vol. 166, no. 1, pp. 21–45, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.06.028.
- [40] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Angiogenesis in cancer and other diseases," *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 249–257, Sep. 2000, doi: 10.1038/35025220;KWRD=SCIENCE.
- [41] V. Bronte *et al.*, "Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards," *Nature Communications* 2016 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2016, doi: 10.1038/ncomms12150.
- [42] T. F. Gajewski, H. Schreiber, and Y. X. Fu, "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment," *Nat Immunol*, vol. 14, no. 10, pp. 1014–1022, Sep. 2013, doi: 10.1038/NI.2703;SUBJMETA=2152,250,262,327,580,631,67;KWRD=ADAPTIVE+IMMUNITY,CANCER+MICROENVIRONMENT,INNATE+IMMUNITY,TUMOUR+IMMUNOLOGY.
- [43] E. B. Rankin, J. M. Nam, and A. J. Giaccia, "Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade," *Trends Cancer*, vol. 2, no. 6, pp. 295–304, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.trecan.2016.05.006.
- [44] S. Valastyan and R. A. Weinberg, "Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms," *Cell*, vol. 147, no. 2, pp. 275–292, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024.
- [45] K. Kessenbrock, V. Plaks, and Z. Werb, "Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment," *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 52–67, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- [46] N. N. Pavlova and C. B. Thompson, "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism," *Cell Metab*, vol. 23, no. 1, pp. 27–47, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
- [47] P. Cirri and P. Chiarugi, "Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 31, no. 1–2, pp. 195–208, Jun. 2012, doi: 10.1007/s10555-011-9340-x.
- [48] Z. L. Liu, H. H. Chen, L. L. Zheng, L. P. Sun, and L. Shi, "Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer," *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1, vol. 8, no. 1, pp. 1–39, May 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01460-1.
- [49] I. Larionova, E. Kazakova, T. Gerashchenko, and J. Kzhyshkowska, "New angiogenic regulators produced by tams: Perspective for targeting tumor angiogenesis," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 13, Jul. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13133253;
- [50] D. T. Edirisinghe *et al.*, "The role of the tumour microenvironment in lung cancer and its therapeutic implications," *Medical Oncology*, vol. 42, no. 6, Jun. 2025, doi: 10.1007/S12032-025-02765-7,.
- [51] A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, and P. Allavena, "Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology," *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 14:7, vol. 14, no. 7, pp. 399–416, Jan. 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217.

- [52] C. Yang, W. Liu, C. A. Powell, and Q. Wang, "Heterogeneity and therapeutic implications of cancer-associated fibroblasts in lung cancer: Recent advances and future perspectives," *Chinese Medical Journal Pulmonary and Critical Care Medicine*, vol. 2, no. 4, Dec. 2024, doi: 10.1016/J.PCCM.2024.08.009,.
- [53] H. Zheng *et al.*, "Analysis of cancer-associated fibroblasts related genes identifies COL11A1 associated with lung adenocarcinoma prognosis," *BMC Med Genomics*, vol. 17, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1186/S12920-024-01863-1,.
- [54] M. Iwai *et al.*, "Cancer-associated fibroblast migration in non-small cell lung cancers is modulated by increased integrin $\alpha 11$ expression," *Mol Oncol*, vol. 15, no. 5, pp. 1507–1527, May 2021, doi: 10.1002/1878-0261.12937,.
- [55] D. M. Pardoll, "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy," *Nature Reviews Cancer* 2012 12:4, vol. 12, no. 4, pp. 252–264, Mar. 2012, doi: 10.1038/nrc3239.
- [56] M. D. Buck, R. T. Sowell, S. M. Kaech, and E. L. Pearce, "Metabolic Instruction of Immunity," *Cell*, vol. 169, no. 4, pp. 570–586, May 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.04.004,.
- [57] R. J. Seager, C. Hajal, F. Spill, R. D. Kamm, and M. H. Zaman, "Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression," *Converg Sci Phys Oncol*, vol. 3, no. 3, p. 034002, Jul. 2017, doi: 10.1088/2057-1739/AA7E86.
- [58] J. Massagué and A. C. Obenauf, "Metastatic colonization by circulating tumour cells," *Nature*, vol. 529, no. 7586, pp. 298–306, Jan. 2016, doi: 10.1038/NATURE17038;SUBJMETA=631,67;KWRD=CANCER.
- [59] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition," *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014 15:3, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, Feb. 2014, doi: 10.1038/nrm3758.
- [60] M. Labelle, S. Begum, and R. O. Hynes, "Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis," *Cancer Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 576–590, 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.009.
- [61] S. Paget, "THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST.," *The Lancet*, vol. 133, no. 3421, pp. 571–573, Mar. 1889, doi: 10.1016/S0140-6736(00)49915-0.
- [62] X. Lin and L. M. DeAngelis, "Treatment of brain metastases," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 33, no. 30, pp. 3475–3484, Oct. 2015, doi: 10.1200/JCO.2015.60.9503,.
- [63] A. S. Berghoff and M. Preusser, "The inflammatory microenvironment in brain metastases: Potential treatment target?," *Chin Clin Oncol*, vol. 4, no. 2, 2015, doi: 10.3978/J.ISSN.2304-3865.2015.06.03,.

- [64] M. Kuchuk, I. Kuchuk, E. Sabri, B. Hutton, M. Clemons, and P. Wheatley-Price, "The incidence and clinical impact of bone metastases in non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 89, no. 2, pp. 197–202, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.lungcan.2015.04.007.
- [65] K. Y. Lam and C. Y. Lo, "Metastatic tumours of the adrenal glands: a 30-year experience in a teaching hospital," *Clin Endocrinol (Oxf)*, vol. 56, no. 1, pp. 95–101, Jan. 2002, doi: 10.1046/J.0300-0664.2001.01435.X.
- [66] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [67] N. Duma, R. Santana-Davila, and J. R. Molina, "Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment," *Mayo Clin Proc*, vol. 94, no. 8, pp. 1623–1640, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013.
- [68] R. P. Young and R. J. Hopkins, "Link between COPD and lung cancer," *Respir Med*, vol. 104, no. 5, pp. 758–759, May 2010, doi: 10.1016/j.rmed.2009.11.025.
- [69] B. Ballester, J. Milara, and J. Cortijo, "Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: Mechanisms and molecular targets," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 3, Feb. 2019, doi: 10.3390/IJMS20030593,.
- [70] P. Luczynski, P. Poulin, K. Romanowski, and J. C. Johnston, "Tuberculosis and risk of cancer: A systematic review and meta-analysis," *PLoS One*, vol. 17, no. 12 December, Dec. 2022, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0278661,.
- [71] M. Carbone *et al.*, "Malignant mesothelioma: Facts, Myths, and Hypotheses," *J Cell Physiol*, vol. 227, no. 1, pp. 44–58, Jan. 2012, doi: 10.1002/JCP.22724,.
- [72] N. P. Rowell and F. V. Gleeson, "Steroids, radiotherapy, chemotherapy and stents for superior vena caval obstruction in carcinoma of the bronchus: A systematic review," *Clin Oncol*, vol. 14, no. 5, pp. 338–351, 2002, doi: 10.1053/clon.2002.0095.
- [73] M. Raspotnig, C. Vedeler, and A. Storstein, "Paraneoplastic neurological syndromes in lung cancer patients with or without onconeural antibodies," *J Neurol Sci*, vol. 348, no. 1–2, pp. 41–45, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.jns.2014.10.040.
- [74] A. A. Khorana, "Cancer-associated thrombosis: updates and controversies," *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, vol. 2012, pp. 626–630, 2012, doi: 10.1182/ASHEDUCATION-2012.1.626.
- [75] D. Planchard *et al.*, "Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Annals of Oncology*, vol. 29, no. Suppl 4, pp. iv192–iv237, Oct. 2018, doi: 10.1093/annonc/mdy275.
- [76] Y. J. Chen, L. X. Chen, M. X. Han, T. S. Zhang, Z. R. Zhou, and D. S. Zhong, "The efficacy and safety of chemotherapy in patients with nonsmall cell lung cancer and interstitial lung disease: A PRISMA-compliant Bayesian meta-analysis and systematic review," *Medicine (United States)*, vol. 94, no. 36, Sep. 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000001451.

- [77] Y.-L. Wu *et al.*, “Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 383, no. 18, pp. 1711–1723, Oct. 2020, doi: 10.1056/NEJMOA2027071,.
- [78] G. V. Scagliotti *et al.*, “Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 21, pp. 3543–3551, 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.15.0375,.
- [79] A. Sandler *et al.*, “Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 355, no. 24, pp. 2542–2550, Dec. 2006, doi: 10.1056/NEJMOA061884.
- [80] H. Branco *et al.*, “Preclinical studies on the antitumor and non-toxic effect of combining pirfenidone with vinorelbine and carboplatin in non-small cell lung cancer,” *Int J Cancer*, vol. 156, no. 9, pp. 1756–1769, May 2024, doi: 10.1002/IJC.35276;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.
- [81] M. C. Garassino *et al.*, “Pembrolizumab Plus Pemetrexed and Platinum in Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: 5-Year Outcomes from the Phase 3 KEYNOTE-189 Study,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 41, no. 11, pp. 1992–1998, Apr. 2023, doi: 10.1200/JCO.22.01989,.
- [82] L. Horn *et al.*, “First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 23, pp. 2220–2229, Dec. 2018, doi: 10.1056/NEJMOA1809064,.
- [83] T. S. Mok *et al.*, “Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 376, no. 7, pp. 629–640, Feb. 2017, doi: 10.1056/NEJMOA1612674,.
- [84] M. Hendrixson, Y. Gladkiy, A. Thyagarajan, and R. P. Sahu, “medical sciences Efficacy of Sorafenib-Based Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer,” 2024, doi: 10.3390/medsci12020020.
- [85] S. M. Wilhelm, L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J. M. Llovet, and M. Lynch, “Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling,” Oct. 01, 2008. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0013.
- [86] C. Rolfo *et al.*, “Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer,” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 16, no. 10, pp. 1647–1662, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.jtho.2021.06.017.
- [87] C. M. Rudin, E. Brambilla, C. Faivre-Finn, and J. Sage, “Small-cell lung cancer,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 7, no. 1, pp. 1–20, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41572-020-00235-0;SUBJMETA=1612,2143,322,631,67,692,699;KWRD=METASTASIS,SMALL-CELL+LUNG+CANCER.

- [88] G. P. Kalemkerian *et al.*, “Small cell lung cancer: Clinical practice guidelines in oncology,” *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 11, no. 1, pp. 78–98, Jan. 2013, doi: 10.6004/JNCCN.2013.0011,.
- [89] M. C. Pietanza *et al.*, “Randomized, double-blind, phase II study of temozolomide in combination with either veliparib or placebo in patients with relapsed-sensitive or refractory small-cell lung cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 36, no. 23, pp. 2386–2394, Aug. 2018, doi: 10.1200/JCO.2018.77.7672,.
- [90] L. L. Siu *et al.*, “Phase I trial of sorafenib and gemcitabine in advanced solid tumors with an expanded cohort in advanced pancreatic cancer,” *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 1, pp. 144–151, Jan. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1571.
- [91] L. A. Byers and C. M. Rudin, “Small cell lung cancer: Where do we go from here?,” *Cancer*, vol. 121, no. 5, pp. 664–672, Mar. 2015, doi: 10.1002/CNCR.29098,.
- [92] M. Hendrixson, Y. Gladkiy, A. Thyagarajan, and R. P. Sahu, “Efficacy of Sorafenib-Based Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer,” *Med Sci (Basel)*, vol. 12, no. 2, Jun. 2024, doi: 10.3390/MEDSCI12020020,.
- [93] J. Zhang, K. A. Gold, and E. Kim, “Sorafenib in non-small cell lung cancer,” Sep. 2012. doi: 10.1517/13543784.2012.699039.
- [94] G. R. Blumenschein *et al.*, “Phase II, multicenter, uncontrolled trial of single-agent sorafenib in patients with relapsed or refractory, advanced non-small-cell lung cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 26, pp. 4274–4280, Sep. 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.22.0541,.
- [95] M. Hendrixson, Y. Gladkiy, A. Thyagarajan, and R. P. Sahu, “Efficacy of Sorafenib-Based Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer,” *Med Sci (Basel)*, vol. 12, no. 2, Jun. 2024, doi: 10.3390/MEDSCI12020020,.
- [96] B. J. Gitlitz *et al.*, “Sorafenib in platinum-treated patients with extensive stage small cell lung cancer: A Southwest oncology group (SWOG 0435) phase II trial,” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 5, no. 11, pp. 1835–1840, 2010, doi: 10.1097/JTO.0B013E3181F0BD78,.
- [97] M. Reck, J. Remon, and M. D. Hellmann, “First-Line Immunotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 40, no. 6, pp. 586–597, Feb. 2022, doi: 10.1200/JCO.21.01497,.
- [98] L. Gandhi *et al.*, “Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 22, pp. 2078–2092, May 2018, doi: 10.1056/NEJMOA1801005,.
- [99] M. Reck *et al.*, “Updated analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 37, no. 7, pp. 537–546, 2019, doi: 10.1200/JCO.18.00149,.

- [100] R. S. Herbst *et al.*, “Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC,” *New England Journal of Medicine*, vol. 383, no. 14, pp. 1328–1339, Oct. 2020, doi: 10.1056/NEJMOA1917346,.
- [101] J. Duan *et al.*, “Use of Immunotherapy with Programmed Cell Death 1 vs Programmed Cell Death Ligand 1 Inhibitors in Patients with Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis,” *JAMA Oncol*, vol. 6, no. 3, pp. 375–384, Mar. 2020, doi: 10.1001/JAMAONCOL.2019.5367,.
- [102] M. A. Postow, R. Sidlow, and M. D. Hellmann, “Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade,” *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 2, pp. 158–168, Jan. 2018, doi: 10.1056/NEJMRA1703481,.
- [103] A. O. Al Khatib, M. El-Tanani, and H. Al-Obaidi, “Inhaled Medicines for Targeting Non-Small Cell Lung Cancer,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 12, Dec. 2023, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS15122777,.
- [104] T. Okuda and H. Okamoto, “Present situation and future progress of inhaled lung cancer therapy: Necessity of inhaled formulations with drug delivery functions,” *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, vol. 68, no. 7, pp. 589–602, Jul. 2020, doi: 10.1248/CPB.C20-00086,.
- [105] Z. Wang, Z. Liu, J. Mei, S. Xu, and Y. Liu, “The next generation therapy for lung cancer: taking medicine by inhalation,” *Nanotechnology*, vol. 32, no. 39, Sep. 2021, doi: 10.1088/1361-6528/AC0E68,.
- [106] L. Xie *et al.*, “A novel therapeutic outlook: Classification, applications and challenges of inhalable micron/nanoparticle drug delivery systems in lung cancer (Review),” *Int J Oncol*, vol. 64, no. 4, p. 38, Apr. 2024, doi: 10.3892/IJO.2024.5626.
- [107] S. Zhang *et al.*, “Inhalable nanomedicine for lung cancer treatment,” *Smart Mater Med*, vol. 5, no. 2, pp. 261–280, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.SMAIM.2024.04.001.
- [108] C. Darquenne, T. E. Corcoran, F. Lavorini, A. Sorano, and O. S. Usmani, “The effects of airway disease on the deposition of inhaled drugs,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 21, no. 8, 2024, doi: 10.1080/17425247.2024.2392790,.
- [109] P. Kumbhar *et al.*, “Inhalation delivery of repurposed drugs for lung cancer: Approaches, benefits and challenges,” *Journal of Controlled Release*, vol. 341, pp. 1–15, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.JCONREL.2021.11.015.
- [110] H. M. Abdelaziz *et al.*, “Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates,” *Journal of Controlled Release*, vol. 269, pp. 374–392, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.036.
- [111] F. Lavorini and G. A. Fontana, “Inhaler technique and patient’s preference for dry powder inhaler devices,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 11, no. 1, pp. 1–3, 2014, doi: 10.1517/17425247.2014.846907;WGROU:STRING:PUBLICATION.

- [112] Z. Zhang, M. Jin, X. Yang, H. Zhu, H. Li, and Q. Yang, "Particulate platform for pulmonary drug delivery: Recent advances of formulation and fabricating strategies," *Int J Pharm*, vol. 676, p. 125601, May 2025, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2025.125601.
- [113] S. Zhang *et al.*, "Inhalable nanomedicine for lung cancer treatment," *Smart Mater Med*, vol. 5, no. 2, pp. 261–280, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.SMAIM.2024.04.001.
- [114] "Aulton - Taylor Aulton 's Pharmaceuticals - The Design and Manufacture of Medicines Elsevier - Eng." Accessed: Jun. 24, 2025. [Online]. Available: https://www.libreriauniverso.it/articolo/92383/9780702081545-aulton-s-pharmaceutics-design-manufacture-medicines-taylor-elsevier-eng?srsltid=AfmBOoqV23f57jiaZq049l7EEjD_r-lx_ik29JH1vNXcXSTFiDHfDk1m
- [115] W. Longest, B. Spence, and M. Hindle, "Devices for Improved Delivery of Nebulized Pharmaceutical Aerosols to the Lungs," *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, vol. 32, no. 5, pp. 317–339, Oct. 2019, doi: 10.1089/JAMP.2018.1508,.
- [116] W. Wang, Y. Hao, Y. Liu, R. Li, D. B. Huang, and Y. Y. Pan, "Nanomedicine in lung cancer: Current states of overcoming drug resistance and improving cancer immunotherapy," Jan. 01, 2021, *Wiley-Blackwell*. doi: 10.1002/wnan.1654.
- [117] S. M. Karim and J. Zekri, "Chemotherapy for small cell lung cancer: A comprehensive review," 2012. doi: 10.4081/oncol.2012.e4.
- [118] A. Garg, "Polymeric Nanoparticles to Target Lung Cancer," pp. 351–371, 2022, doi: 10.1007/978-3-031-14848-4_13.
- [119] "Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer | ScienceDirect." Accessed: Jun. 24, 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128157206/nanotechnology-based-targeted-drug-delivery-systems-for-lung-cancer>
- [120] F. Fu *et al.*, "Inhalable Biomineralized Liposomes for Cyclic Ca²⁺-Burst-Centered Endoplasmic Reticulum Stress Enhanced Lung Cancer Ferroptosis Therapy," *ACS Nano*, vol. 17, no. 6, pp. 5486–5502, Mar. 2023, doi: 10.1021/ACSNANO.2C10830/SUPPL_FILE/NN2C10830_SI_001.PDF.
- [121] G. Zhao *et al.*, "Inhalable siRNA Nanoparticles for Enhanced Tumor-Targeting Treatment of KRAS-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 15, no. 26, pp. 31273–31284, Jul. 2023, doi: 10.1021/ACSAMI.3C05007,.
- [122] Y. Xu, J. C. Hsu, L. Xu, W. Chen, W. Cai, and K. Wang, "Nanomedicine-based adjuvant therapy: a promising solution for lung cancer," Dec. 01, 2023, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12951-023-01958-4.
- [123] L. Paz-Ares *et al.*, "Monotherapy Administration of Sorafenib in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (MISSION) Trial: A Phase III, Multicenter, Placebo-Controlled Trial of Sorafenib in Patients with Relapsed or Refractory Predominantly Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer after 2 or 3 Previous Treatment Regimens," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 10, no. 12, pp. 1745–1753, Dec. 2015, doi: 10.1097/JTO.0000000000000693.

- [124] B. Escudier *et al.*, “Phase I trial of sorafenib in combination with IFN α -2a in patients with unresectable and/or metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 6, pp. 1801–1809, Mar. 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1432.
- [125] Y. Zhanget *et al.*, “Effectiveness of neoadjuvant chemotherapy on the survival outcomes of patients with resectable non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials,” *Surg Oncol*, vol. 38, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.suronc.2021.101590.
- [126] Z. Li *et al.*, “Comparison of quick recovery outcome of inhalable doxorubicin and cisplatin in lung cancer patients: a randomized, double-blind, single-center trial,” *Drug Deliv Transl Res*, vol. 8, no. 5, pp. 985–993, Oct. 2018, doi: 10.1007/s13346-018-0529-1.
- [127] “Polymeric Micelles: Principles, Perspectives and Practices,” *Polymeric Micelles: Principles, Perspectives and Practices*, 2023, doi: 10.1007/978-981-99-0361-0.
- [128] I. Khan, A. Gothwal, G. Mishra, and U. Gupta, “Polymeric Micelles,” pp. 73–101, 2019, doi: 10.1007/978-3-319-95990-0_11.
- [129] S. Croy and G. Kwon, “Polymeric Micelles for Drug Delivery,” *Curr Pharm Des*, vol. 12, no. 36, pp. 4669–4684, Nov. 2006, doi: 10.2174/138161206779026245,.
- [130] D. Hwang, J. D. Ramsey, and A. V. Kabanov, “Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 156, pp. 80–118, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.addr.2020.09.009.
- [131] L. P. Sze *et al.*, “Oral delivery of paclitaxel by polymeric micelles: A comparison of different block length on uptake, permeability and oral bioavailability,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 184, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110554.
- [132] D. W. Kim *et al.*, “Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer,” *Annals of Oncology*, vol. 18, no. 12, pp. 2009–2014, 2007, doi: 10.1093/annonc/mdm374.
- [133] T. Hamaguchi *et al.*, “A phase II study of NK012, a polymeric micelle formulation of SN-38, in unresectable, metastatic or recurrent colorectal cancer patients,” *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 82, no. 6, p. 1021, Dec. 2018, doi: 10.1007/S00280-018-3693-6.
- [134] “Fundamentals of Nanoparticles | ScienceDirect.” Accessed: Jun. 24, 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/book/9780323512558/fundamentals-of-nanoparticles>
- [135] C. De Mello Donega, Ed., “Nanoparticles,” 2024, doi: 10.1007/978-3-031-71460-3.
- [136] M. Aliofkhazraei, “Handbook of nanoparticles,” *Handbook of Nanoparticles*, pp. 1–1426, Sep. 2015, doi: 10.1007/978-3-319-15338-4/COVER.

- [137] F. Wang, Y. Wang, Q. Ma, Y. Cao, and B. Yu, "Development and characterization of folic acid-conjugated chitosan nanoparticles for targeted and controlled delivery of gemcitabine in lung cancer therapeutics," *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 45, no. 8, pp. 1530–1538, Nov. 2017, doi: 10.1080/21691401.2016.1260578.
- [138] H. K. Sanoff *et al.*, "Phase I/II Trial of Nano-camptothecin CRLX101 with Capecitabine and Radiotherapy as Neoadjuvant Treatment for Locally Advanced Rectal Cancer," *Nanomedicine*, vol. 18, p. 189, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.NANO.2019.02.021.
- [139] X. Tian *et al.*, "CRLX101, a nanoparticle-drug conjugate containing camptothecin, improves rectal cancer chemoradiotherapy by inhibiting DNA repair and HIF1 α ," *Cancer Res*, vol. 77, no. 1, pp. 112–122, Jan. 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2951,.
- [140] C. Chen *et al.*, "Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors," *Nature*, vol. 500, no. 7463, pp. 486–489, 2013, doi: 10.1038/nature12327.
- [141] M. I. Nunez *et al.*, "High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and mutation," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 7, no. 5, pp. 833–840, 2012, doi: 10.1097/JTO.0b013e31824de09c.
- [142] S. Iwakiri, M. Sonobe, S. Nagai, T. Hirata, H. Wada, and R. Miyahara, "Expression status of folate receptor α is significantly correlated with prognosis in non-small-cell lung cancers," *Ann Surg Oncol*, vol. 15, no. 3, pp. 889–899, Mar. 2008, doi: 10.1245/s10434-007-9755-3.
- [143] M. Fernández, F. Javaid, and V. Chudasama, "Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers," 2018, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c7sc04004k.
- [144] M. Scaranti, E. Cojocaru, S. Banerjee, and U. Banerji, "Exploiting the folate receptor α in oncology," Jun. 01, 2020, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41571-020-0339-5.
- [145] S. Zhang *et al.*, "Inhalable nanomedicine for lung cancer treatment," Jun. 01, 2024, *KeAi Communications Co*. doi: 10.1016/j.smaim.2024.04.001.
- [146] E. F. Craparo, S. E. Drago, F. Quaglia, F. Ungaro, and G. Cavallaro, "Development of a novel rapamycin loaded nano- into micro-formulation for treatment of lung inflammation," *Drug Deliv Transl Res*, vol. 12, no. 8, pp. 1859–1872, Aug. 2022, doi: 10.1007/s13346-021-01102-5.
- [147] L. Mancini, M. Paolantoni, A. Schoubben, and M. Ricci, "Development of spray-dried N-acetylcysteine dry powder for inhalation," *Int J Pharm*, vol. 631, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122550.
- [148] K. B. Shepard *et al.*, "Local Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with a Spray-Dried Bevacizumab Formulation," *AAPS PharmSciTech*, vol. 22, no. 7, pp. 1–11, Oct. 2021, doi: 10.1208/S12249-021-02095-7/FIGURES/5.

- [149] C. Unsworth *et al.*, “Development of solid drug nanoparticle dispersions for pulmonary delivery of niclosamide and nitazoxanide via vibrating mesh nebulisation,” *RSC Pharmaceuticals*, vol. 2, no. 3, pp. 517–526, May 2025, doi: 10.1039/D5PM00006H.
- [150] Z. Jiang *et al.*, “Inhalable mucin-permeable nanomicelles deliver antibiotics for effective treatment of chronic pneumonia,” *J Mater Chem B*, vol. 12, no. 34, pp. 8465–8476, Aug. 2024, doi: 10.1039/D3TB02970K.
- [151] T. M. M. Ways *et al.*, “Mucus-penetrating nanoparticles based on chitosan grafted with various non-ionic polymers: Synthesis, structural characterisation and diffusion studies,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 626, pp. 251–264, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.jcis.2022.06.126.
- [152] N. Mauro, M. A. Utzeri, R. Cillari, C. Scialabba, G. Giammona, and G. Cavallaro, “Cholesterol-Inulin Conjugates for Efficient SN38 Nuclear Delivery: Nanomedicines for Precision Cancer Therapy,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 19, Oct. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14194857,.
- [153] Y. Su *et al.*, “Sorafenib-loaded polymeric micelles as passive targeting therapeutic agents for hepatocellular carcinoma therapy,” *Nanomedicine*, vol. 13, no. 9, pp. 1009–1023, May 2018, doi: 10.2217/nnm-2018-0046.
- [154] M. R. C. Marques, R. Loebenberg, and M. Almukainzi, “Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing,” 2011, *Dissolution Technologies Inc.* doi: 10.14227/DT180311P15.
- [155] C. Scialabba, E. F. Craparo, M. Cabibbo, S. Emanuele Drago, and G. Cavallaro, “Exploiting inhalable microparticles incorporating hybrid polymer-lipid nanoparticles loaded with Iloprost manages lung hyper-inflammation,” *Int J Pharm*, vol. 666, Dec. 2024, doi: 10.1016/j.ijpharm.2024.124813.
- [156] E. F. Craparo *et al.*, “Lung Disease Management by Iloprost-Loaded Nanoparticles to Address Hyperinflammation Associated with Cystic Fibrosis,” *ACS Appl Nano Mater*, vol. 7, no. 12, pp. 14077–14089, Jun. 2024, doi: 10.1021/acsanm.4c01379.
- [157] J. T. Huckaby and S. K. Lai, “PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 124, pp. 125–139, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.ADDR.2017.08.010,.
- [158] B. Porsio, E. F. Craparo, N. Mauro, G. Giammona, and G. Cavallaro, “Mucus and Cell-Penetrating Nanoparticles Embedded in Nano-into-Micro Formulations for Pulmonary Delivery of Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 1, pp. 165–181, Jan. 2018, doi: 10.1021/acsami.7b14992.
- [159] S. K. Shukla *et al.*, “Sorafenib Loaded Inhalable Polymeric Nanocarriers against Non-Small Cell Lung Cancer,” *Pharm Res*, vol. 37, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.1007/s11095-020-02790-3.
- [160] C. Di Meo *et al.*, “Polyaspartamide-Doxorubicin Conjugate as Potential Prodrug for Anticancer Therapy,” *Pharm Res*, vol. 32, no. 5, pp. 1557–1569, May 2015, doi: 10.1007/S11095-014-1557-2,.

- [161] D. Triolo, E. F. Craparo, B. Porsio, C. Fiorica, G. Giammona, and G. Cavallaro, "Polymeric drug delivery micelle-like nanocarriers for pulmonary administration of beclomethasone dipropionate," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 151, pp. 206–214, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.025.
- [162] A. Narmani, S. Ganji, M. Amirishoar, R. Jahedi, M. S. Kharazmi, and S. M. Jafari, "Smart chitosan-PLGA nanocarriers functionalized with surface folic acid ligands against lung cancer cells," *Int J Biol Macromol*, vol. 245, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125554.
- [163] E. F. Craparo, M. Cabibbo, C. Scialabba, G. Giammona, and G. Cavallaro, "Inhalable Formulation Based on Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for the Macrophage Targeted Delivery of Roflumilast," *Biomacromolecules*, vol. 23, no. 8, pp. 3439–3451, Aug. 2022, doi: 10.1021/acs.biomac.2c00576.
- [164] J. M. Xia, X. Wei, X. W. Chen, Y. Shu, and J. H. Wang, "Folic acid modified copper nanoclusters for fluorescent imaging of cancer cells with over-expressed folate receptor," *Microchimica Acta*, vol. 185, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.1007/S00604-018-2743-4,.
- [165] Z. Deng *et al.*, "Dual targeting with cell surface electrical charge and folic acid via superparamagnetic fe₃o₄@cu₂-xs for photothermal cancer cell killing," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 21, Nov. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13215275,.
- [166] M. Licciardi, C. Scialabba, G. Cavallaro, C. Sangregorio, E. Fantechi, and G. Giammona, "Cell uptake enhancement of folate targeted polymer coated magnetic nanoparticles," *J Biomed Nanotechnol*, vol. 9, no. 6, pp. 949–964, Jun. 2013, doi: 10.1166/jbn.2013.1606.
- [167] M. Zhang *et al.*, "Folate-conjugated polyspermine for lung cancer-targeted gene therapy," *Acta Pharm Sin B*, vol. 6, no. 4, pp. 336–343, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.apsb.2016.03.010.
- [168] H. Zeng *et al.*, "Folic Acid-Functionalized Metal-Organic Framework Nanoparticles as Drug Carriers Improved Bufalin Antitumor Activity Against Breast Cancer," *Front Pharmacol*, vol. 12, p. 747992, Jan. 2022, doi: 10.3389/FPHAR.2021.747992/BIBTEX.
- [169] D. Zillen, M. Beugeling, W. L. J. Hinrichs, H. W. Frijlink, and F. Grasmeijer, "Natural and bioinspired excipients for dry powder inhalation formulations," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 56, p. 101497, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.COCIS.2021.101497.
- [170] E. F. Craparo, M. Cabibbo, C. Scialabba, L. Casula, F. Lai, and G. Cavallaro, "Rapamycin-based inhaled therapy for potential treatment of COPD-related inflammation: production and characterization of aerosolizable nano into micro (NiM) particles," *Biomater Sci*, vol. 12, no. 2, pp. 387–401, Nov. 2024, doi: 10.1039/d3bm01210g.
- [171] H. M. Abdelaziz *et al.*, "Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates," Jan. 10, 2018, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.036.

- [172] W. Yang, J. I. Peters, and R. O. Williams, "Inhaled nanoparticles—A current review," *Int J Pharm*, vol. 356, no. 1–2, pp. 239–247, May 2008, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2008.02.011.
- [173] L. Wei, J. Zhao, J. Bao, Y. Ma, Y. Shang, and Z. Gao, "The characteristics and clinical significance of mucin levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung disease," *Journal of Investigative Medicine*, vol. 67, no. 4, pp. 761–766, Apr. 2019, doi: 10.1136/JIM-2018-000785,.
- [174] B. Hazt, D. J. Read, O. G. Harlen, W. C. K. Poon, A. O'Connell, and A. Sarkar, "Mucoadhesion across scales: Towards the design of protein-based adhesives," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 334, Dec. 2024, doi: 10.1016/J.CIS.2024.103322,.
- [175] G. Giammona *et al.*, "Galactosylated Polymer/Gold Nanorods Nanocomposites for Sustained and Pulsed Chemo-Photothermal Treatments of Hepatocarcinoma," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14112503.
- [176] R. Ahmed, F. Tewes, M. Aucamp, and A. Dube, "Formulation and clinical translation of inhalable nanomedicines for the treatment and prevention of pulmonary infectious diseases," *Drug Deliv Transl Res*, pp. 1–27, Apr. 2025, doi: 10.1007/S13346-025-01861-5/METRICS.