



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

L'Univercittà



Ministero dell'Università e della
Ricerca Scientifica e Tecnologica

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Farmacia

Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche

DOTTORATO DI RICERCA

in

“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”

XXII CICLO, A.A. 2007/2008

SSD CHIM/09

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DERIVATI ANFIFILICI DEL PEG
COME 'SURFACE MODIFIERS' DI NANOCARRIER DI FARMACI**

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

Livia Basile

Tutor:

Ch.mo Prof. Rosario Pignatello

Indice

Indice	i
1. Introduzione.....	1
1.1 <i>Drug delivery systems</i> (DDS).....	1
1.1.1 Liposomi	2
1.1.2 Nanoparticelle Polimeriche o NP	7
1.1.3 Nanoparticelle Solide Lipidiche o SLN.....	8
1.1.4 <i>Carrier</i> Lipidici Nanostrutturati o NLC	12
1.2 Opsonizzazione e fagocitosi.....	14
1.3 PEGhilazione e sistemi <i>stealth</i> [®]	18
1.4 Il poli-(etilenglicole) o PEG.....	23
1.5 <i>Targeting passivo</i> con nanocarrier peghilati	29
1.6 <i>Targeting attivo</i> con nanocarrier peghilati.....	32
1.7 Rilascio del farmaco a livello intracellulare.....	35
1.8 I Lipoammino acidi o LAA.....	36
2 Attività di ricerca.....	39
3 Materiali e metodi.....	44
3.1 Materiali	44
3.1.1 Reagenti	44
3.1.2 Colture cellulari e animali da laboratorio	45
3.1.3 Strumentazione	46
3.2 Procedimenti generali di sintesi	47
3.2.1 Sintesi dei coniugati polimerici PEG-LAA	47
3.2.2 Sintesi dei Boc-derivati dei LAA.....	48

3.2.3	Sintesi dei coniugati ammidici dell'ammino-mPEG _{2000/5000} con i LAA.....	48
3.2.4	Sintesi degli esteri metilici dei LAA.....	49
3.2.5	Sintesi dei coniugati ammidici del carbossi-mPEG _{2000/5000} con i LAA	50
3.3	Preparazione dei nanocarrier, caratterizzazione chimico-fisica e valutazione <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	51
3.3.1	Liposomi	51
3.3.1.1	Preparazione.....	51
3.3.1.2	Caratterizzazione chimico-fisica.....	53
3.3.1.2.1	Analisi dimensionale e potenziale Zeta.....	53
3.3.1.3	Studi <i>in vitro</i>	53
3.3.1.3.1	Misura di attivazione del complemento (CH50 <i>assay</i>)	53
3.3.1.3.2	Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale su cellule J-774	55
3.3.1.3.3	Studi di <i>uptake</i> cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1	56
3.3.1.4	Studi <i>in vivo</i>	57
3.3.1.4.1	Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione.....	57
3.3.1.4.2	Determinazione della quantità di farmaco incapsulata.....	58
3.3.1.4.3	Esperimenti di crescita tumorale-Impianto delle cellule tumorali	58
3.3.2	SLN.....	59
3.3.2.1	Preparazione.....	59
3.3.2.2	Caratterizzazione chimico-fisica.....	60
3.3.2.2.1	Dimensione delle particelle e potenziale Zeta.....	60
3.3.2.3	Studi <i>in vitro</i>	60
3.3.2.3.1	Prove di stabilità.....	60
3.3.2.3.2	Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale su cellule J-774	61

3.3.3	LNC	61
3.3.3.1	Preparazione	61
3.3.3.2	Caratterizzazione chimico-fisica	62
3.3.3.2.1	Dimensione delle LNC e potenziale Zeta	62
3.3.3.3	Studi <i>in vitro</i>	63
3.3.3.3.1	Misura di attivazione del complemento (CH50 <i>assay</i>)	63
3.3.3.3.2	Studi di <i>uptake</i> cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1	63
3.3.3.4	Studi <i>in vivo</i>	64
3.3.3.4.1	Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione	64
3.3.3.4.2	Determinazione della quantità di farmaco incapsulata	64
3.3.3.5	Studio di crescita tumorale-Impianto delle cellule tumorali	64
4	Risultati	66
4.1	Liposomi	66
4.1.1	Analisi del potenziale Zeta	66
4.1.2	Valutazione <i>in vitro</i>	68
4.1.2.1	Misure di attivazione del complemento (CH50 <i>assay</i>)	68
4.1.2.2	Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale su cellule J-774 70	
4.1.2.3	Studi di <i>uptake</i> cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1	73
4.1.3	Valutazione <i>in vivo</i>	75
4.1.3.1	Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione	75
4.1.3.2	Efficienza di intrappolamento del paclitaxel	77
4.1.3.3	Esperimenti di crescita tumorale	77
4.2	SLN	79
4.2.1	Caratterizzazione chimico-fisica	79

4.2.1.1	Analisi dimensionale	79
4.2.2	Determinazione del potenziale Zeta	84
4.2.2.1	Studi di stabilità nel siero bovino.....	86
4.2.2.2	Incubazione con macrofagi	88
4.3	NLC.....	92
4.3.1	Caratterizzazione chimico-fisica.....	92
4.3.1.1	Analisi dimensionale e del potenziale Zeta.....	92
4.3.2	Valutazione <i>in vitro</i>	93
4.3.2.1	Misure di attivazione del complemento	93
4.3.2.2	Studi di <i>uptake</i> cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1	94
4.3.3	Valutazione <i>in vivo</i>	96
4.3.3.1	Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione	96
4.3.3.2	Efficienza di intrappolamento del paclitaxel.....	98
4.3.3.3	Esperimenti di crescita tumorale.....	98
5	Discussione.....	100
6	Conclusioni.....	104
7	Bibliografia.....	105
	<i>Ringraziamenti</i>	115

1. Introduzione

1.1 *Drug delivery systems* (DDS)

In questi ultimi anni, è sempre più evidente che lo sviluppo di nuovi farmaci da solo è insufficiente ad assicurare un progresso nella terapia; infatti, dati sperimentali molto promettenti in *vitro* sono stati molto spesso seguiti da deludenti risultati in *vivo*. Le cause maggiori del fallimento terapeutico includono:

- una concentrazione insufficiente del farmaco, dovuta allo scarso assorbimento ed eliminazione (ad es. peptidi, proteine, etc). La distribuzione del farmaco ad altri tessuti si associa all'elevata tossicità del farmaco;
- una scarsa solubilità del farmaco, che porta all'esclusione della somministrazione endovenosa di soluzioni acquose;
- un'ampia oscillazione dei livelli plasmatici, dovuta all'imprevedibile biodisponibilità dopo somministrazione orale, che include anche l'influenza del cibo sui livelli plasmatici (ad es. cefalosporine).

Un'interessante strategia per aggirare questi problemi coinvolge lo sviluppo di adatti sistemi trasportatori (*carriers*) di farmaci, i cosiddetti *drug delivery systems* (DDS). Si tratta di sistemi progettati e realizzati per rendere possibile la veicolazione di farmaci direttamente al sito *target* (cellula/tessuto), per migliorare la stabilità, l'assorbimento e la concentrazione terapeutica del principio attivo al tessuto bersaglio e quindi la sua biodisponibilità. Allo stesso tempo, questi sistemi permettono di ridurre la frequenza delle somministrazioni del farmaco, migliorando così la *compliance* del paziente, ma anche la

dose necessaria per raggiungere la concentrazione minima efficace, limitando la distribuzione dell'agente terapeutico ad altri distretti e riducendo di conseguenza gli effetti collaterali associati al farmaco stesso.

Nel *drug delivery* vengono impiegati micro e nanoparticelle, liposomi, matrici a gel, etc. ed è un settore in rapida crescita a cui si fa sempre più ricorso per ottimizzare le potenzialità degli agenti terapeutici stessi (Figura 1.1)

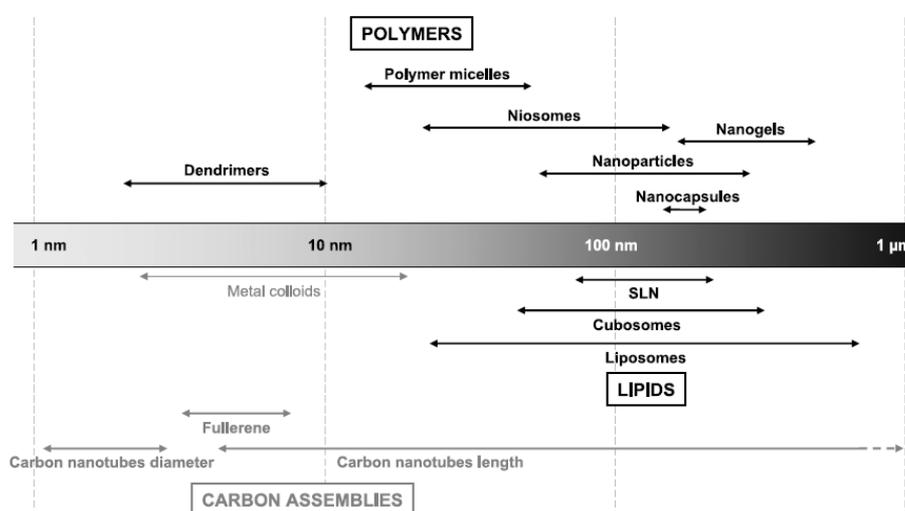


Figura 1.1: Tipi di nanoparticelle usate per il drug delivery e il targeting. La linea nera rappresenta il diametro delle nanoparticelle (da Couvreur and Vauthier, 2006)

1.1.1 Liposomi

Nell'ambito della ricerca sulle nanotecnologie, sono stati realizzati una grande varietà di vettori. Un esempio tipico di vettori colloidali è rappresentato dai liposomi (Figura 1.2), vettori costituiti prevalentemente da fosfolipidi, per questo motivo sono molto biocompatibili.

I liposomi sono stati impiegati inizialmente come *drug carriers* da Gregoriadis e coll. nel 1974 per il rilascio di chemioterapici nella terapia del cancro (Gregoriadis et al., 1974). Infatti, l'uso clinico della maggior parte dei chemioterapici convenzionali è spesso limitato dal rilascio di concentrazioni terapeutiche del farmaco inadeguate al tessuto tumorale bersaglio o a causa di gravi effetti tossici e nocivi sugli organi sani.

Un *carrier* liposomiale invece è in grado di proteggere il principio attivo in esso incapsulato e consentire un rilascio prolungato dello stesso. Inoltre, esso è capace di favorire l'accumulo del farmaco in alcuni organi piuttosto che in altri (*site-specific targeting*), migliorare la sua penetrazione nelle cellule e facilitare il trasporto del principio attivo fino ad organi difficili da raggiungere.

I liposomi sono aggregati macromolecolari di diametro compreso tra 20 nm e 1 μ m. In generale, una delle peculiarità dei fosfolipidi è quella di organizzarsi spontaneamente in estese strutture a foglietti bimolecolari (*bilayers*) delimitanti uno o più spazi acquosi al loro interno. La loro struttura è caratterizzata dalla presenza di uno o più doppi strati fosfolipidici esterni, che delimitano all'interno un *core* idrofilo che può ospitare sostanze in fase acquosa. In dispersioni acquose, i fosfolipidi possono assumere diverse configurazioni (Figura 1.2).

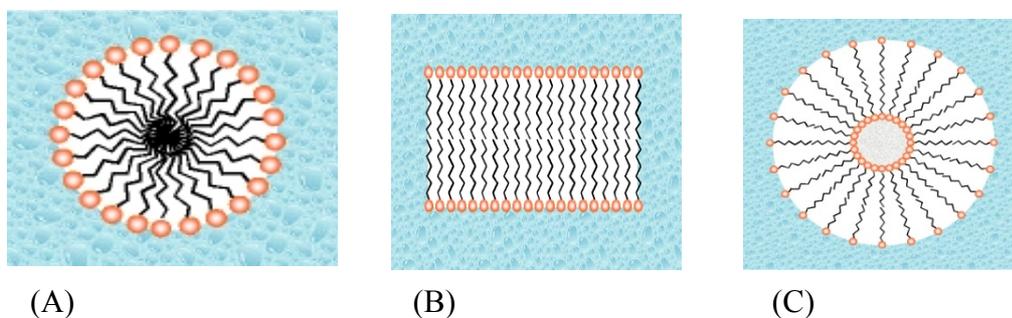


Figura 1.2: Possibili conformazioni di fosfolipidi puri in ambiente acquoso: (A) micelle; (B) doppio strato (*bilayer*); (C) vescicole chiuse in *bilayer*

Le proprietà dei liposomi dipendono proprio da questa loro particolare struttura; gli strati esterni, infatti, possiedono una notevole affinità per le membrane plasmatiche (fosfolipidi naturali come fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, ed esteri del colesterolo) (Castelli *et al.*, 1992; Pignatello *et al.*, 2001b; Castelli *et al.*, 2002; Pignatello *et al.*, 2006). In questo modo, le sostanze idrosolubili contenute all'interno delle microsferi liposomiali possono essere facilmente veicolate all'interno delle cellule (Fresta *et al.*, 2000).

Allo stesso modo, il liposoma può anche incorporare molecole lipofile farmacologicamente attive nel suo doppio strato fosfolipidico esterno. Per di più, eventuali sostanze anfotere potranno disporsi con la loro porzione idrofila protesa verso il mezzo acquoso e la parte idrofobica inserita tra i fosfolipidi costituenti le lamelle (Figura 1.3).

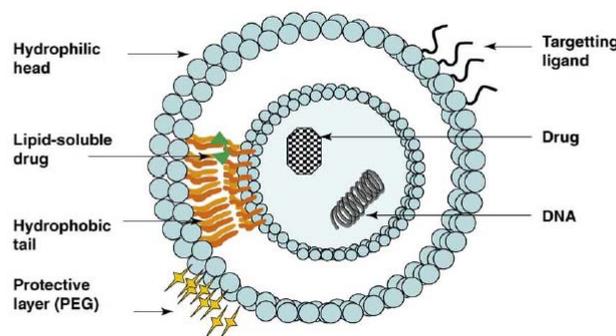


Figura 1.3: Rappresentazione di un liposoma bilamellare. La superficie esterna può essere funzionalizzata con ligandi (targeting attivo) o peghilata. I liposomi possono variare nel numero di bilayer lipidici ed essere classificati in: 1) multilamellar vesicles, 2) large unilamellar vesicles, 3) small unilamellar vesicles (da Malam *et al.*, 2010)

La duttilità del sistema liposomiale rende possibile la progettazione di vescicole particolarmente selettive nei confronti di determinati tessuti, permettendo, quindi, una distribuzione del farmaco incorporato più mirata e di conseguenza, una diminuzione degli

effetti collaterali sistemici del principio attivo. Infatti, i farmaci antitumorali con un ristretto indice terapeutico si presentano come candidati ideali per una formulazione liposomiale.

Tra i farmaci antitumorali occorre ricordare la Doxorubicina, per la quale, una formulazione liposomiale si è rivelata particolarmente vantaggiosa in quanto ha permesso sia di aumentare l'efficacia terapeutica del principio attivo sia di migliorare l'indice terapeutico. Questo tipo di prodotto è stato il primo preparato ad essere stato approvato per l'applicazione clinica e risulta attualmente in commercio sia in Europa che in America con il nome di Doxil[®]/Caelyx[®], una formulazione di doxorubicina inglobata in liposomi ricoperti da uno strato di PEG (polietilenglicole), con una emivita plasmatica otto volte superiore a quella mostrata dal farmaco libero e una minore incidenza degli effetti collaterali tossici (*Lasic, 1996*).

Pertanto si può dire che i liposomi come nuovi sistemi di rilascio vengono sviluppati quando le formulazioni convenzionali già esistenti non risultano soddisfacenti.

La riformulazione del farmaco in liposomi offre, spesso, in questi casi una maggiore sicurezza, una migliore efficacia terapeutica e la possibilità di superare alcune problematiche di tipo formulativo. Ad esempio, la formulazione di farmaci lipofili, come il paclitaxel risulta essere particolarmente adatta all'applicazione della tecnologia liposomiale. Tali farmaci, infatti, data la loro bassissima solubilità sono comunemente formulati con surfattanti e cosolventi organici i quali presentano tuttavia problemi di tossicità. Ad Esempio, la formulazione attualmente utilizzata per la somministrazione di paclitaxel, TAXOL[®], include tra i propri componenti il Cremofor EL (olio di ricino polietossilato) ed etanolo al fine di solubilizzare il farmaco; il prodotto mostra, tuttavia, vari effetti collaterali come reazioni di ipersensibilità, nefrotossicità e neurotossicità dovuti

al Chremophor EL (*Cabanes et al., 1998*). Per questo tipo di farmaci i liposomi costituiscono veicoli non tossici, biocompatibili e biodegradabili e, perciò, particolarmente utili nel veicolare in circolo tali molecole.

Il rilascio, nel caso dei liposomi, può essere controllato modificando, a seconda delle esigenze, la dimensione e/o la composizione dei vettori: ad esempio è possibile realizzare sistemi sia neutri che con cariche superficiali, questo permette di indirizzare i liposomi verso un sito piuttosto che un altro; oppure si possono ottenere membrane di diversa fluidità e quindi di diversa stabilità, piuttosto che sensibili a variazioni del pH (*Parmentier et al., 2010*).

Pertanto, se adattare il rilascio ad un bisogno clinico o terapeutico specifico è l'aspetto fondamentale dei sistemi a rilascio controllato, risulta di grande importanza conoscere in modo approfondito e controllare i meccanismi e le variabili chimico-fisiche che regolano il processo di liberazione dell'agente terapeutico dalle forme di rilascio.

Per esempio, nella preparazione di una sospensione liposomiale devono essere considerati oltre le caratteristiche chimico-fisiche importanti parametri tecnologico-formulativi:

- capacità di *loading* del carrier liposomiale;
- velocità di rilascio dei principi attivi;
- stabilità alla conservazione.

La capacità di *loading* dei liposomi dipende da diversi fattori tra i quali si può citare: la loro composizione lipidica, la natura chimico-fisica del principio attivo e il grado di interazione farmaco-liposoma.

Oltre al Doxil[®]/Caelyx[®], la disponibilità di una vasta gamma di prodotti, tra cui il DaunoXome[®] (Daunorubicin) (*Gill et al., 1995*) e l'AmBisome[®] (Amfotericina B) (*Lewis*

et al., 2009) in sperimentazione, indica chiaramente i potenziali vantaggi dei liposomi come nuovi vettori lipidici.

Tuttavia, la complessità e l'elevato costo relativi alla produzione di questi *carrier*, la difficoltà di *scale-up*, la limitata stabilità fisica delle vescicole liposomiali sono i principali ostacoli che ne limitano la commercializzazione (*Bunjes and Siekmann, 2007*).

1.1.2 Nanoparticelle Polimeriche o NP

Le nanoparticelle polimeriche o NP appartengono alla prima generazione di nuovi vettori colloidali sviluppati con l'obiettivo di migliorare la somministrazione parenterale dei farmaci. Esse differiscono dai liposomi in quanto non hanno un *core* acquoso ma una matrice polimerica solida e possono incorporare farmaci idrofilici o idrofobici e macromolecole come proteine e acidi nucleici (*Perez et al., 1991; Tobío et al., 1998*).

Sono due i meccanismi che regolano il rilascio del farmaco incorporato nella nanoparticella polimerica: nel primo caso si ha l'erosione della superficie particellare e la diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica, nel secondo caso si ha l'idratazione del polimero seguita dalla diffusione del farmaco.

I polimeri biodegradabili più utilizzati per ottenere nanoparticelle a rilascio controllato sono il poli(D,L)-lattide (PLA), poli(glicolide) (PLG) ed i loro copolimeri poli(D,L)-lattide-*co*-glicolide (PLGA). Le nanoparticelle polimeriche possono essere anche a base di polisaccaridi come il chitosano, le ciclodestrine e i destrani (*Liu Z et al., 2008*).

Per la loro natura biodegradabile, l'utilizzo di nanoparticelle di PLGA per il *drug delivery* o per applicazioni di biomateriali comporta una minima tossicità sistemica. Infatti, studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che nanomateriali di PLGA sono bio-compatibili e privi di tossicità significativa (*Athanasίου et al., 1996*). Una volta somministrate, le

nanoparticelle di PLGA subiscono idrolisi dei legami esterei, producendo i monomeri di partenza (acido lattico e acido glicolico), che sono sottoprodotti di diverse vie metaboliche del corpo in condizioni fisiologiche (*Athanasidou et al., 1996*). La velocità di degradazione dei polimeri di PLGA dipende dal rapporto dei monomeri utilizzati per la loro produzione; per esempio il polimero che contiene un rapporto 50:50 di acido lattico e acido glicolico è idrolizzato molto più velocemente rispetto a un polimero costituito da uno dei due monomeri in maggiore quantità (*Jain, 2000*).

Studi di biodistribuzione hanno dimostrato che il rilascio di agenti diagnostici o terapeutici da nanoparticelle di PLGA ne aumentava l'accumulo grazie all'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*). Inoltre, nanoparticelle di PLGA sono state studiate per il rilascio sostenuto di diverse sostanze, come farmaci, proteine e peptidi e recentemente DNA plasmidici, grazie alla loro capacità di proteggere il DNA dalla degradazione negli endosomi (*Panyam and Labhasetwar, 2003*).

Ad esempio, nanoparticelle polimeriche caricate con indocianina somministrate a topi sani hanno portato ad un aumento della quantità di farmaco a livello degli organi (da 2 a 8 volte) e del sangue (da 5 a 10 volte) rispetto alla soluzione libera del farmaco, indicando l'enorme potenziale delle nanoparticelle di PLGA nella diagnosi del tumore (*Saxena et al., 2006*).

1.1.3 Nanoparticelle Solide Lipidiche o SLN

Nonostante la vasta applicazione delle nanoparticelle polimeriche nel campo del *drug delivery*, i polimeri naturali o di sintesi impiegati possono presentare scarsa biocompatibilità e citotossicità dopo internalizzazione nelle cellule.

Per questo motivo a metà degli anni '90 l'attenzione si è focalizzata su nanoparticelle preparate a partire da lipidi solidi, le cosiddette nanoparticelle solide lipidiche o SLN (*Siekmann and Westesen, 1992*). Esse possiedono un *core* lipidico rivestito da tensioattivi, quali lecitine e sali biliari, tutti elementi fisiologicamente compatibili e biodegradabili che rendono tali sistemi meno tossici rispetto alle nanoparticelle polimeriche. Infatti, stabilità fisica e protezione dalla degradazione di farmaci le contraddistinguono rispetto ai nanocarrier convenzionali.

Oltre a presentare i vantaggi degli altri sistemi di rilascio di farmaci, le SLN possono essere facilmente prodotte su larga scala, e la scelta di utilizzare lipidi fisiologicamente biocompatibili riduce il rischio di tossicità acuta e cronica; inoltre, il *core* lipidico allo stato solido consente di modulare il profilo di rilascio del farmaco proteggendolo dalla degradazione chimica fotochimica o degradazione ossidativa (*Wissing et al., 2004*).

Le SLN sono state utilizzate per il rilascio di principi attivi attraverso il derma (*Müller et al., 2007*), per via orale (*Jenning and Gohla, 2001*), parenterale (*Wissing et al., 2004*), oculare (*Cavalli et al., 2002*), polmonare (*Liu et al., 2008*) e rettale (*Sznitowska et al., 2001*).

La somministrazione endovenosa delle SLN ha portato ad un miglioramento della biodisponibilità, del *targeting*, un aumento della citotossicità contro le cellule tumorali resistenti a diversi farmaci.

Le SLN, quindi, combinano i vantaggi dei *carrier* colloidali menzionati prima, liposomi e nanoparticelle polimeriche, ma al tempo stesso evitano o riducono al minimo gli svantaggi associati ad essi.

Le molecole di farmaco possono distribuirsi all'interno delle SLN a seconda delle loro proprietà chimiche. Infatti, i farmaci lipofili si disperdono bene per la loro alta miscibilità nella matrice lipidica, mentre i farmaci idrofili sono termodinamicamente immiscibili e si distribuiscono fuori la matrice lipidica. In genere, durante la formazione delle SLN si ha la dispersione e la ripartizione del farmaco nella fase lipidica fusa. Il rapido raffreddamento crea una struttura instabile e disordinata α -cristallina, che permette al farmaco di essere conservato nelle aree amorfe della nanoparticella. Durante il periodo di stoccaggio, questa struttura α -cristallina può essere convertita in uno stato termodinamicamente stabile β -cristallina. L'esatta ripartizione del farmaco nelle SLN dipende dalla velocità di ricristallizzazione della matrice lipidica e dalla struttura cristallina stessa. Poiché le molecole di farmaco sono incorporate tra le catene di acidi grassi, negli strati lipidici, e nelle zone meno ordinate del cristallo, una struttura altamente ordinata e organizzata non è auspicabile per incorporare una maggiore quantità di farmaco. Inoltre, la trasformazione strutturale dalla forma α - a quella β -cristallina delle SLN può causare un "burst release" del farmaco dopo somministrazione nel corpo.

Tra le proprietà delle SLN vi è anche la capacità di proteggere farmaci labili, perché sensibili all'idrolisi. Un esempio è dato dal composto SN-38, un pro-farmaco dell'irinotecano relativamente idrofilo, che trasporta anche un lattone labile come la camptotecina. A seguito dell'incorporazione del farmaco nelle SLN è stato appurato che le nanoparticelle proteggevano l'SN-38 dall'idrolisi, aumentandone l'efficacia terapeutica. Inoltre, tramite studi *in vivo* in topi nudi è stata osservata un'emivita plasmatica più lunga della forma attiva del farmaco nel sangue.

Un'ampia varietà di farmaci come il prednisolone, la doxorubicina, il retinolo sono stati incorporati con successo nelle SLN (Jenning *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2007).

Serpe e coll. hanno studiato l'efficacia di SLN contenenti butirrato di colesterolo e doxorubicina su una linea di cellule di cancro di colon-rettale umano HT-29. I risultati di questa analisi hanno dimostrato che le SLN risultavano più citotossiche rispetto alla quantità equivalente di farmaco libero (*Serpe et al., 2004*). Questo perché nel trattamento chemioterapico, le cellule tumorali sono continuamente esposte a livelli sub-ottimali di farmaci citotossici e quindi sono in grado di sviluppare resistenza agli agenti antitumorali grazie alla presenza di specifici trasportatori di efflusso (come ad esempio, la glicoproteina P). Grazie all'uso di nanovettori lipidici il farmaco penetra per endocitosi nella cellula, evitando in tal modo il meccanismo di efflusso. Questo effetto è stato riscontrato anche per SLN caricate con doxorubicina su linee cellulari umane e murine di cancro al seno (*Kang et al., 2010*).

Va detto anche che, al di là di questi vantaggi, questo tipo di sistema di rilascio presenta dei limiti: in primo luogo la sua natura idrofobica non lo rende un sistema ideale per incorporare farmaci idrofilici (*Hong et al., 2006*); inoltre la struttura cristallina della matrice lipidica, può determinare l'allontanamento del farmaco incorporato (*Martins, et al., 2007*).

In sintesi, i possibili svantaggi legati all'uso delle SLN sono rappresentati dalla bassa capacità di incorporazione dei farmaci e dalla complessità dello stato fisico del lipide, che possono causare problemi di stabilità durante la conservazione o dopo la somministrazione.

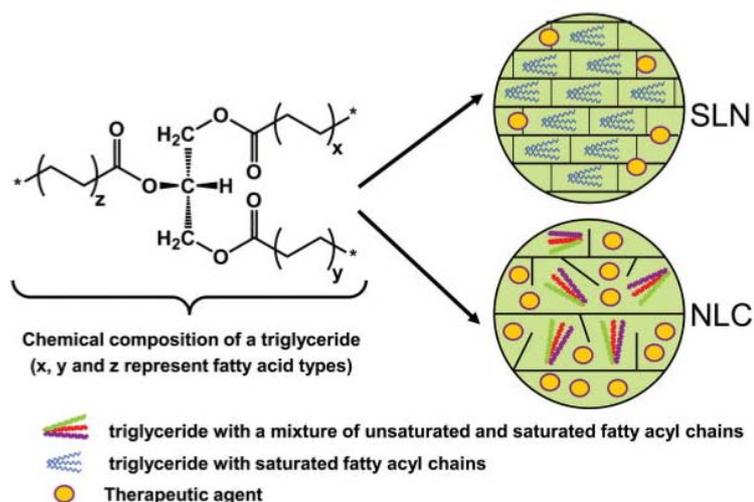


Figura 1.4: Nanoparticelle solide lipidiche (SLN) e carrier lipidici nanostrutturati (NLC)
(da Puri and Loomis, 2009).

1.1.4 Carrier Lipidici Nanostrutturati o NLC

I *carrier* lipidici nanostrutturati (NLC) sono stati sviluppati da Müller e coll. alla fine del 1990, rappresentando i sistemi di rilascio più innovativi insieme alle SLN e alle NP, formulate per aumentare il rilascio parenterale di un farmaco.

A differenza della matrice lipidica cristallina delle SLN, la matrice lipidica delle NLC è una struttura amorfa, che permette l'incapsulazione del farmaco, sia nella forma molecolare che in forma di aggregati, a livello delle imperfezioni reticolari (Figura 1.4). Per questo motivo queste nanoparticelle lipidiche sono capaci di incapsulare una maggiore quantità di farmaco, limitando così la perdita del principio attivo.

Sono costituite da una miscela di lipidi in fase solida e liquida, e a temperature superiori a 40°C sono generalmente solide.

Come le SLN, le NLC sono formate da lipidi in fase liquida e solida. Di solito nella fase iniziale di produzione circa il 5% (in peso) del farmaco è incorporato nella miscela

lipidica, ottenendo un *drug loading* di circa il 3-4% (con efficienze di incapsulamento di circa il 70%) (Zhang *et al.*, 2008). Esempi di lipidi in fase solida normalmente utilizzati includono monostearina, acido stearico, gliceril dilaurato, monostearato di glicerina e alcool cetilico. I lipidi in fase liquida tipicamente utilizzati sono l'acido oleico e i trigliceridi di acido caprilico/caprico.

Sono diversi i fattori che bisogna considerare nella formulazione delle NLC. In primo luogo, la scelta dei lipidi è fondamentale per ottenere NLC stabili e la stabilità chimica del farmaco dipende dal tipo di lipidi solidi incorporati nelle NLC. Allo stesso modo, l'incorporazione del farmaco a livello delle aree reticolari imperfette influenza la stabilità delle particelle (molto probabilmente accrescere la stabilità). Inoltre, bisogna considerare le possibili interazioni dei lipidi con il farmaco durante e dopo la produzione di queste particelle. Ad esempio, l'auto-ossidazione dei lipidi può causare la degradazione del principio attivo (Teeranachaiideekul *et al.*, 2007). Allo stesso modo, la percentuale di lipidi incorporati in fase liquida influenza la forma e le dimensioni delle particelle. Hu e coll. hanno dimostrato che aumentando la concentrazione dell'acido oleico in fase liquida fino a circa il 30%, le dimensioni delle particelle diminuivano e la forma diventava più sferica, liscia e regolare. Inoltre, in questo studio è stato riportato che la concentrazione di acido oleico era in grado di controllare la velocità iniziale di rilascio del farmaco (Hu *et al.*, 2006).

In generale, le NLC vengono considerate dei nanovettori alternativi ai liposomi, dal momento che sono capaci di incorporare composti lipofili o anfifilici all'interno del loro *core* oleoso. Per questo motivo, essendo costituite da trigliceridi a catena media e surfattanti idrofilici/lipofilici, strutturalmente sono a metà tra nanocapsule polimeriche e liposomi. Tali proprietà conferiscono grande stabilità alla struttura (> di 18 mesi). Inoltre,

questi sistemi di natura lipidica rappresentano una valida alternativa ai liposomi per le applicazioni farmaceutica dovuta alla loro stabilità e alle dimensioni ridotte (20-100 nm) (Hertault *et al.*, 2002a). Tra le diverse applicazioni delle NLC, la somministrazione di farmaci antitumorali è particolarmente importante, questo grazie alle loro piccole dimensioni e alle singolari proprietà della vascolatura dei tessuti tumorali (effetto EPR). Per esempio, sono state preparate NLC per la somministrazione degli antitumorali paclitaxel e doxorubicina (Zhang *et al.*, 2008).

Nonostante alcuni indubbi vantaggi, visti precedentemente, l'utilizzo di nano e microparticelle presenta delle difficoltà, soprattutto dovute alle loro ridotte dimensioni che comportano problemi di fabbricazione su larga scala e/o di impiego, spesso consentendo come unica via di somministrazione quella iniettabile che presenta una maggiore difficoltà di realizzazione.

Un' interessante soluzione a questo problema consiste nel preparare dei sistemi di dimensioni maggiore e più facilmente maneggiabili che possano, sotto opportune condizioni, ritornare alle dimensioni originarie delle nano o microparticelle senza compromettere le caratteristiche dei vettori originali. Nonostante esistano già diversi studi riguardo l'utilizzo di liposomi incapsulati in microsfele (Feng *et al.*, 2004), non è ancora stata sperimentata la possibilità di ottenere dei prodotti di dimensioni macroscopiche che, una volta assunti, siano in grado di liberare i nanovettori incorporati al loro interno.

1.2 Opsonizzazione e fagocitosi

Grazie alle loro piccole dimensioni, tutti questi *drug carriers* possono essere somministrati per via endovenosa per trasportare farmaci a specifici tessuti e/o organi.

Tuttavia, una volta in circolo, queste particelle vengono riconosciute come *non-self* dall'organismo e vengono rapidamente degradate ad opera di macrofagi circolanti o localizzati in specifici organi (fegato, milza, etc.). Per cui la loro rapida *clearance* dalla circolazione sistemica rappresenta uno dei principali limiti osservati nell'impiego *in vivo* di questi vettori.

Nel caso di alcune patologie, come ad esempio certe infezioni riguardanti i macrofagi (*Leishmania*) o gli organi di smaltimento (filtrazione e purificazione del sangue) (fegato e milza), è possibile sfruttare il rapido riconoscimento delle particelle da parte del sistema immunitario per ottenere un *targeting passivo*. Infatti, un primo sviluppo terapeutico dei liposomi, ha riguardato la terapia antimicrobica e in particolare l'attività antifungina. Si sa infatti che, le particelle dopo iniezione per via endovenosa, vengono riconosciute da parte di specifiche proteine plasmatiche appartenenti al sistema del complemento definite "opsonine" e successivamente direzionate verso i macrofagi epatici, che li ingeriscono per endocitosi convogliandoli nei lisosomi o in altre regioni del citoplasma, dove sono presenti gli agenti patogeni, che vengono direttamente distrutti dal principio attivo. L'opsonizzazione, quindi, è il processo tramite il quale un organismo estraneo o una particella viene ricoperta dalle opsonine, rendendosi così più visibile ai fagociti (Figura 1.5). Attraverso questo meccanismo vengono eliminati tutti quei componenti indesiderati nel sangue che superano la soglia limite renale. Le nanoparticelle, infatti, che normalmente non possono essere distrutte dai fagociti, vengono sequestrate negli organi del sistema fagocitico mononucleare MPS (*Mononuclear Phagocyte System*). L'opsonizzazione, in genere, avviene nel sangue e si completa nel giro di pochi secondi o di alcuni giorni.

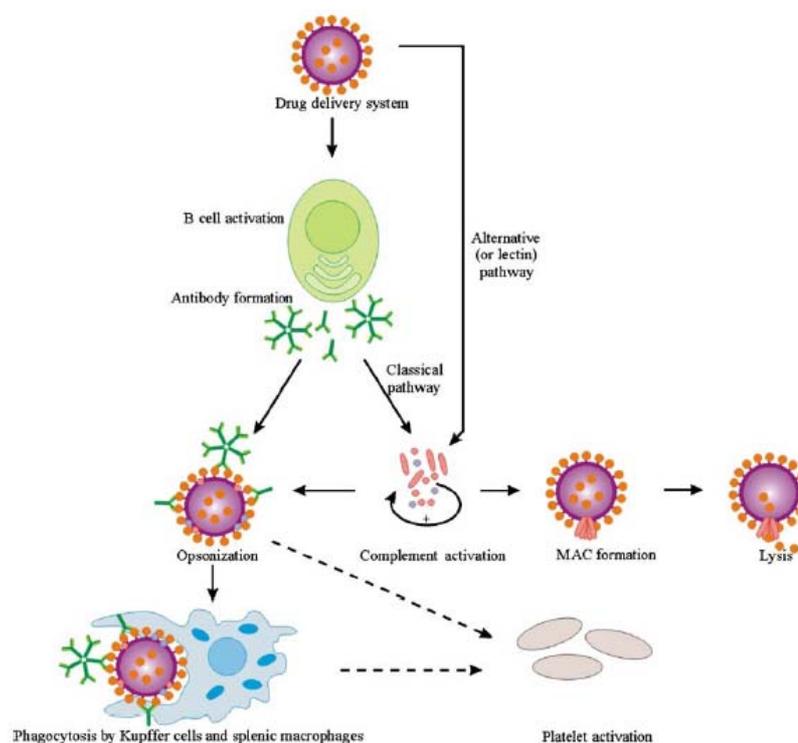


Figura 1.5: Rappresentazione schematica delle relazioni tra le reazioni immunologiche. Le frecce tratteggiate rappresentano possibili percorsi per l'attivazione delle piastrine (da Jiskoot et al., 2009)

Nonostante l'esatto meccanismo attraverso cui questo processo viene attivato sia molto complicato e non sia stato ancora del tutto compreso, i principali componenti coinvolti sono per la maggior parte ben noti. Alle comuni opsonine fanno parte le immunoglobuline e i componenti del sistema del complemento (C3, C4 e C5), come pure altre proteine del siero come la laminina, la fibronectina, la proteina c-reattiva, il collagene di tipo I e molte altre (Frank and Fries, 1991; Johnson, 2004). Attraverso movimenti browniani le opsonine vengono a contatto con le nanoparticelle iniettate e interagiscono con esse grazie a forze attrattive, di van der Waals, elettrostatiche, ioniche, idrofobiche/idrofile. dei fagociti, segnalando la presenza nell'organismo di materiale esterno. Quindi, in assenza di opsonine legate o adsorbite, i fagociti non sono in grado di

legare o riconoscere le particelle estranee. A seguito dell'interazione, le opsonine nella loro conformazione attiva si legano a recettori specializzati presenti sulla superficie. Una seconda modalità di attacco del fagocita è l'adesione aspecifica alle proteine del siero adsorbite sulla superficie, che può stimolare la fagocitosi (*Frank and Fries, 1991*). Questo processo, in genere, è dovuto all'associazione delle opsonine con una superficie più idrofobica della particella.

Un altro tipo di attacco da parte del fagocita alle particelle *non-self* è l'attivazione del complemento. Il sistema del complemento può essere attivato da diversi meccanismi, che includono quello classico, quello alternativo e quello della lectina (*Frank and Fries, 1991; Singer et al., 1994; Morgan, 1995; Johnson, 2004*).

La terza e ultima fase nel processo di *clearance* è l'ingestione del materiale estraneo da parte dei fagociti. Una volta fagocitato questo materiale, il fagocita secernerà enzimi ed altri fattori chimici reattivi-ossidativi, come i superossidi, molecole ossi-alogenate, ossido nitrico e perossido d'idrogeno, per degradare il materiale fagocitato (*Mitchell, 2004*).

Sfortunatamente, molti dei polimeri non biodegradabili non possono essere degradati significativamente da questo processo e, in base alle loro dimensioni e al peso molecolare, saranno rimossi dal sistema renale o sequestrati e accumulati in uno degli organi del sistema MPS. In prima approssimazione, la rimozione tramite i reni avviene solo per le molecole con un peso molecolare intorno a 5 kDa o meno, ma può essere più alto di 100 kDa per i polimeri più densi come i dendrimeri. Quindi, le particelle non biodegradabili e le molecole di degradazione con un peso molecolare maggiore della soglia renale vengono sequestrate negli organi del sistema MPS.

Dal momento che l'opsonizzazione iniziale delle particelle è così critica per il riconoscimento da parte dei fagociti e per la *clearance* dal sangue, molti studi nell'ambito dei sistemi di rilascio dei farmaci si sono basati sulla possibilità di bloccare questo processo. Non ci sono regole assolute o metodi per bloccare completamente ed effettivamente l'opsonizzazione delle particelle, ma la ricerca scientifica negli ultimi 30 anni ha trovato alcuni metodi in grado di rallentarlo, aumentando l'emivita plasmatica e l'efficacia dei sistemi particellari.

In generale, l'opsonizzazione di particelle idrofobiche, rispetto alle particelle idrofile, avviene più velocemente a causa dell'aumentato adsorbimento delle proteine del siero sulla loro superficie (*Carstensen et al., 1992; Muller et al., 1992; Norman et al., 1992*). Inoltre, è stata dimostrata *in vitro* una correlazione tra la carica superficiale e l'opsonizzazione; infatti, numerosi studi hanno mostrato come particelle neutre presentavano una velocità di opsonizzazione molto più bassa delle particelle cariche (*Roser et al., 1998*).

1.3 PEGhizzazione e sistemi *stealth*[®]

Una volta che la particella è riconosciuta dalle opsonine e rimossa dal sangue, viene sequestrata rapidamente in uno degli organi del sistema MPS, in genere nel giro di pochi minuti, concentrandosi solitamente nel fegato e nella milza (*Illum et al., 1986; Gref et al., 1995; Panagi et al., 2001*).

Quindi nei casi in cui gli obiettivi terapeutici siano diversi dal targeting passivo, sono stati sviluppati diversi metodi allo scopo di camuffare o mascherare la superficie delle nanoparticelle, che permettono di evitare il loro riconoscimento da parte del sistema MPS e

aumentare la loro emivita plasmatica (*Illum and Davis, 1984; Gref et al., 1994; Kaul and Amiji, 2002*).

Un metodo ampiamente usato per rallentare l'opsonizzazione, e quindi prolungare la circolazione plasmatica di *carrier* colloidali, è basato sull'assorbimento o sull'innesto di gruppi che schermano la superficie in modo da bloccare le interazioni elettrostatiche ed idrofobiche, che favoriscono il legame delle opsonine alla superficie della particella. E' necessario cioè modificare la superficie esterna dei *carrier* mediante macromolecole o polimeri idrofili, che "nascondono" fisicamente la particella ai meccanismi del complemento. I *carrier* così ottenuti sono comunemente noti come *stealth*[®]. L'uso di sistemi *stealth*, unitamente alle ridotte dimensioni (<100 nm), rappresentano lo standard per l'ammissione dei sistemi colloidali nei test clinici. Per ottenere dei sistemi *stealth* in genere vengono utilizzati polimeri idrofili e di tensioattivi non ionici a lunga catena, quali: polisaccaridi, poliacrilammide, poli(vinil-alcool), poli(N-vinil-2-pirrolidone), PEG e copolimeri contenenti il PEG come polossameri, poliossammine, polisorbati e copolimeri del PEG. I polimeri più efficaci e più comunemente usati sono i PEG e i copolimeri del PEG (*Shimada et al., 1997; Allen et al., 1991; Harris et al., 2001; Metselaar et al., 2003; Riche et al., 2004; Owens and Peppas, 2006*). Questi polimeri sono molto flessibili e altamente idrofili, sono quindi capaci di schermare anche particelle idrofobiche e particelle cariche dalle proteine del sangue.

Per il basso costo, la scarsa tossicità e la disponibilità in commercio di molecole a diverso peso molecolare, maggior interesse è stato rivolto al poli-(etilenglicole) (PEG), un polimero idrofilo inerte già utilizzato per legare proteine, peptidi e farmaci (*Zalipsky, 1995*). La PEGilazione, infatti, è la strategia più ampiamente utilizzata per prolungare l'emivita plasmatica dei *carrier*, prevenendone la rapida *clearance* e l'*uptake* da parte delle

cellule del RES/MPS. Essa rappresenta il metodo preferito per impartire caratteristiche *stealth* o proprietà di nanoparticelle stericamente stabilizzate e indica il rivestimento della superficie delle particelle tramite legame covalente, inclusione o adsorbimento di catene di PEG. Queste catene di PEG creano uno strato barriera che blocca l'adesione delle opsonine presenti nel siero, mimetizzando le particelle e rendendole invisibili ai fagociti (*Owens and Peppas, 2006*). Un esempio di polimeri del PEG è rappresentato dai poliossameri e dalle poliossammine, caratterizzati da unità ripetitive di poli-(etilenglicole) e di poli(propilen)glicole. Per la struttura chimica delle unità ripetitive, questi polimeri sono anche conosciuti come poli-(etilen ossido) (PEO) e poli-(propilene ossido) (PPO) (Figure 1.6 e 1.7). La principale differenza tra queste strutture è il gruppo metilico addizionale del PPO, che lo rende più idrofobico del PEO. Quindi, la porzione idrofobica del polimero che contiene l'unità dell'ossido di propilene (PO) può essere usata per adsorbire e ancorare le molecole di tensioattivo alla superficie della nanoparticella; viceversa i polimeri contenenti l'ossido di etilene (EO), più idrofilo o le frazioni di PEG possono estendersi in soluzione e schermare la superficie della particella. La peghilazione ha il vantaggio di essere una strategia abbastanza semplice per ottenere e per impartire migliori caratteristiche *stealth*. Tuttavia, i polimeri del PEG adsorbiti sulla superficie possono essere anche desorbiti, creando spazi liberi dove le opsonine possono legarsi (*Neal et al., 1998*).

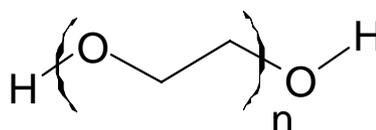


Figura 1.6: Poli(etilene glicole) (PEG)

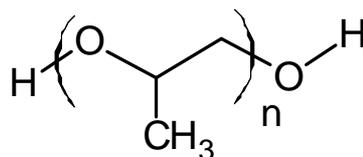


Figura 1.7: Poli(propilene glicole) (PPO)

Inoltre, si può avere il desorbimento delle catene di PEG adsorbite sulla superficie di nanoparticelle biodegradabili. Da qui la necessità di sviluppare dei metodi che permettono di legare il PEG tramite legame covalente sulla superficie delle nanoparticelle. Infatti, particelle con catene di PEG legate covalentemente presentano un'emivita più lunga di quelle in cui il PEG è adsorbito (*Harper et al., 1991; Bazile et al., 1995*). Sfortunatamente, questo metodo presenta molti svantaggi. Questo perché, spesso è difficile assicurare che le catene del PEG si leghino covalentemente alla superficie e non al materiale in *bulk*, se lo scopo è il rivestimento della superficie. Come risultato, può essere molto più difficile controllare e ottimizzare la densità del rivestimento della superficie e la conformazione del PEG.

Allo scopo di stabilizzare nel sangue nano e microcarrier, sono stati sintetizzati derivati lipidici del PEG come modificatori di superficie, in cui il PEG è stato coniugato a fosfolipidi con catena acilica a diversa lunghezza. I derivati più interessanti sono il 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG), il 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DPPE-PEG) e il 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DSPE-PEG).

Come riportato in letteratura, la presenza di molecole di DSPE-PEG₂₀₀₀ sulla superficie di liposomi contenenti prednisolone-palmitato manteneva elevata la concentrazione del farmaco nel sangue per un periodo di tempo più prolungato (*Teshima et al., 2006*). Inoltre, il DSPE-PEG₂₀₀₀ e il DSPE-PEG₅₀₀₀ sono stati utilizzati anche per

rivestire NLC, che hanno in tal modo acquisito proprietà di lunga circolazione (*Hoarau et al., 2004*). Garcia-Fuentes e coll. hanno riportato che il PEG40 steurato, un altro derivato fosfolipidico del PEG, formava uno strato polimerico di rivestimento sulla superficie di nanoparticelle lipidiche, bloccando così la loro rapida degradazione enzimatica (*Garcia-Fuentes et al., 2004*). Molti altri studi, oltre quelli già citati, sono stati effettuati per legare strutture lipidiche al PEG, tra cui ceramidi (*Webb et al., 1998*), digliceridi (*Shimada et al., 1997*), colesterolo (*Bradley et al., 1998*) ed acido fosfatidico (*Allen et al., 1991; Parr et al., 1994*), la cui natura anfifilica ha permesso di aumentare la loro incorporazione nel *bilayer* di liposomi o nel *core* lipidico delle NLC. Da quanto riportato in letteratura è evidente che, gli effetti dei derivati lipidici del PEG sulle proprietà di superficie dei liposomi dipendono dal peso molecolare del PEG e dalla concentrazione del PEG-lipide nella formulazione. Infatti, in base alle osservazioni sperimentali di Opanasopit e coll., è stato dimostrato che la *clearance* epatica di liposomi peghilati è proporzionale al peso molecolare del PEG in superficie ed un aumento della lunghezza della catena del PEG porta ad un riduzione dell'*uptake* epatico delle vescicole liposomiali, che risulta essere più evidente con il PEG₅₀₀₀ (*Opanasopit et al., 2003*). Quindi, da quanto detto finora la lunghezza delle catene di PEG ed il tipo di ancora del PEG-lipide sulla superficie influenza la *clearance* plasmatica di liposomi PEGhilati ad opera del RES (*Sadzuka et al., 2003*). Sembra, infatti, che la quantità di PEG-lipide incorporato decresca all'aumentare del peso molecolare delle catene di PEG. In realtà, i derivati lipidici del PEG con una lunga ancora presentano una percentuale di incorporazione minore. Ciò a indicare la maggior influenza della lunghezza delle catene di PEG sull'*uptake* cellulare rispetto alla lunghezza dell'ancora. Inoltre, una catena di PEG più lunga determina un maggiore *uptake* cellulare dei liposomi, anche a livello dei tessuti tumorali.

1.4 Il poli-(etilenglicole) o PEG

Il poli-(etilenglicole) o PEG è un polimero lineare dell'ossido di etilene (PM=44 Da) con un gruppo idrossilico terminale (Figura 1.8) (Eugene, 2004).

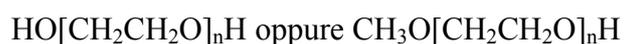


Figura 1.8: Struttura del poli-(etilenglicole) (PEG)

Per le sue diverse caratteristiche, il PEG viene impiegato in molteplici applicazioni, non solo in ambito farmaceutico (Delgado et al., 1992). E' un polimero neutro, idrosolubile, biocompatibile (Lec., 2002) non tossico e non immunogenico (Eugene, 2004). Presenta una elevata solubilità in acqua a temperature moderate e in un vasto intervallo di pesi molecolari. In ambiente acquoso, infatti, le catene di PEG formano delle spirali elicoidali che permettono la formazione di legami ad idrogeno (Kuhl et al., 1996) (Figura 1.9).

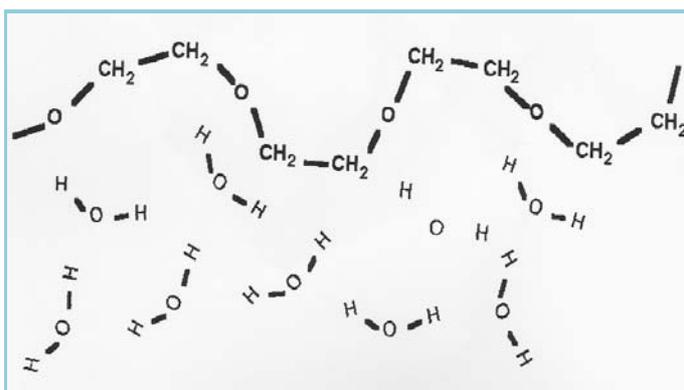


Figura 1.8: Interazione delle catene di PEG con le molecole di acqua

Questa alta affinità per l'acqua è responsabile dell'innalzamento della pressione osmotica delle soluzioni di PEG ed è stata utilizzata per regolare la quantità di acqua tra le macromolecole e i bilayer lipidici (*Blow et al., 1978*). Questo determina un elevatissimo volume di esclusione, che previene l'accesso di altre molecole (*Hermans, 1982*).

Per stabilizzare la superficie delle particelle, lo strato di polimero legato deve garantire una copertura adeguata e avere il giusto spessore. Molti studi indicano, infatti, che per impartire le caratteristiche *stealth* il peso molecolare del PEG deve essere almeno di 20 kDa o più alto (*Gref et al., 1994; Leroux et al., 1995; Peracchia et al., 1997; Peracchia, 2003*). Questo limite è dovuto molto probabilmente alla perdita di flessibilità delle catene più corte.

Il tipo di conformazione assunta dalle catene di PEG sulla superficie delle particelle di PEG sembra avere anche una grande influenza sul comportamento dei nanocarrier peghilati. A basse concentrazioni, i polimeri legati alla superficie assumono la cosiddetta forma a fungo o "*mushroom shape*", la superficie è poco mascherata e le catene di PEG hanno più spazio per muoversi (in media si dispongono più vicine alla superficie della particella). Si possono formare delle lacune nello strato protettivo del PEG, quando il rivestimento è molto basso, dove le opsonine possono liberamente legarsi alla superficie della particella. Quando la distanza tra i siti di legame è più larga della lunghezza del polimero, le catene non interagiscono tra loro, se invece la distanza viene diminuita o le catene allungate, i polimeri iniziano ad interagire l'uno con l'altro, fenomeno definito transizione da "*mushrooms*" a "*brush*", cioè a "spazzola" (*Hansen et al., 2003*). Viceversa, su una superficie più schermata viene fortemente ristretto lo spazio in cui si muovono le catene di PEG, che quindi esibiranno una configurazione semi-lineare o "*brush*". In questo modo la superficie è completamente coperta, diminuisce la mobilità

delle catene del PEG e quindi diminuiscono le proprietà di ingombro sterico dello strato di PEG (Storm *et al.*, 1995) (Figura 1.10). Quindi, la configurazione delle catene di PEG intermedia tra quella “mushroom” e “brush”, è la migliore configurazione per rivestire la superficie delle particelle. Questo perché la maggior parte delle catene sono in una configurazione leggermente costretta, ma ad una densità abbastanza alta da garantire la mancanza di spazi e lacune. Grazie alla natura flessibile e idrofila delle catene di PEG, esse sono in grado di assumere una conformazione più estesa in soluzione. Quando le opsonine e altre proteine sono attratte sulla superficie della particella, attraverso forze di Van der Waals e altre forze, incontrano le catene estese del PEG sulla superficie e iniziano a comprimerle. Questa compressione forza le catene di PEG in una conformazione a più alta energia. Tale variazione di conformazione crea una forza repulsiva che si oppone e che, quando è abbastanza grande, può completamente bilanciare e/o superare la forza attrattiva tra le opsonine e la superficie della particella.

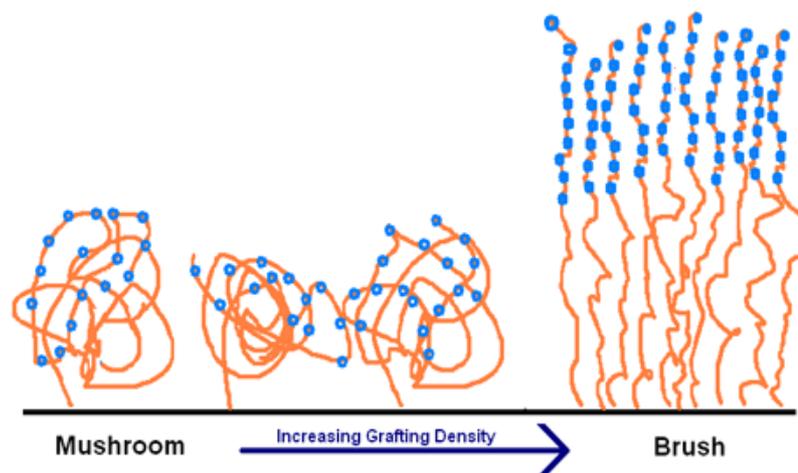


Figura 1.10: Conformazioni assunte dalle catene di PEG sulla superficie di una particella

E' importante notare che lo strato di rivestimento della superficie deve superare uno spessore minimo perché possa verificarsi il blocco effettivo o la repulsione delle opsonine. L'esatto spessore dello strato può variare a seconda della situazione ed è spesso difficile da controllare. Quindi, lo spessore dello strato è generalmente correlato ad altri fattori come il peso molecolare del PEG, la densità della catena e la sua conformazione.

Gref e coll. hanno dimostrato che il rivestimento di nanoparticelle biodegradabili di PLGA e di PLA con il PEG in configurazione *brush* modificava i profili di biodistribuzione delle particelle dopo somministrazione (Gref *et al.*, 1995) (Vittaz *et al.*, 1996).

Studi *in vivo* effettuati su topi hanno mostrato che l'aumento del peso molecolare delle catene di PEG in copolimeri a blocchi di PEG- PLGA da 5000 fino a 20,000 g/mole prolungava il tempo di circolazione delle particelle nel sangue (Gref *et al.*, 1994).

Inoltre, Labarre e coll. hanno prodotto nanoparticelle a partire da copolimeri di PEG_(2000 o 5000)-PLA o miscele di polimeri di PLA e PEG_(2000 o 5000)-PLA. Queste particelle hanno mostrato un aumento dell'emivita plasmatica rispetto a particelle di PLA modificate in superficie da Poloxamer 188 (Labarre *et al.*, 1994).

Da quanto detto finora possiamo dire che la peghilazione è una valida strategia per migliorare la farmacocinetica di proteine, peptidi, piccole molecole di farmaci, cofattori, oligonucleotidi, lipidi o saccaridi. Le molecole peghilate hanno infatti un tempo di circolazione più lungo e una immunogenicità ridotta.

Per tale motivo la modificazione delle tradizionali formulazioni tramite peghilazione è stata attuata allo scopo di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche, quali biodistribuzione, targeting, solubilità e quindi biodisponibilità, di diversi farmaci.

Diversi studi in letteratura hanno dimostrato che la peghilazione migliora i profili farmacocinetici delle nanoparticelle. Ad esempio, uno studio di Kommareddy ha dimostrato che la modifica di nanoparticelle di gelatina con il PEG aumentava l'emivita plasmatica da 3 a 15 ore rispetto a nanoparticelle di gelatina non modificate, accompagnate da una riduzione della *clearance* totale di tre volte (Kommareddy and Amiji, 2007). Allo stesso modo, il mascheramento di nanoparticelle di PLGA con il PEG ha migliorato il tempo di circolazione delle stesse (Gref et al., 1994).

L'adsorbimento delle proteine plasmatiche è stato studiato anche su nanoparticelle costituite da copolimeri di PEG-PLGA. In questo studio la presenza del PEG ha determinato una riduzione dell'assorbimento delle proteine sulle particelle modificate rispetto a quelle di PLGA non peghilate. In particolare, la quantità delle apolipoproteine J e C-III sulle particelle di PEG-PLGA è stata drasticamente ridotta, così come è stato anche ridotto l'assorbimento di fibrinogeno e di immunoglobulina G (Gref et al., 1995).

Sahli e coll. hanno studiato le interazioni di nanoparticelle di PLA stabilizzate da tensioattivi e nanoparticelle a base di copolimeri a blocchi PLA-PEG con i fattori plasmatici della coagulazione. Gli autori hanno dimostrato che le particelle di PLA stabilizzate da colato di sodio interagivano con la trombina, il fattore V e gli ioni calcio. Mentre, le particelle di PEG-PLA si sono dimostrate inerti nei confronti degli stessi fattori di coagulazione e degli ioni calcio, anche in presenza di colato (Sahli and Tapon-Brethaudiere, 1997).

Tramite modelli matematici è stato dimostrato che catene di PEG lunghe e soprattutto una elevata densità superficiale di PEG sono condizioni ottimali contro l'attacco delle proteine del sangue (Jeon and Andrade, 1991). L'influenza della corona (lunghezza della catena e densità di superficie del PEG) e della composizione del *core* di

NP sull'*uptake* macrofagico e sull'assorbimento delle proteine plasmatiche è stato studiato da Gref e coll. Lo studio è stato condotto su nanoparticelle biodegradabili di PLA, PGA e PLC rivestite da PEG tramite elettroforesi bidimensionale. I risultati hanno mostrato come l'adsorbimento delle proteine dipende dalla lunghezza e dalla densità del polimero. Nel caso particolare, confrontando particelle di PEG-PLA con catene di PEG a diverso peso molecolare, è stato riscontrato che il PEG₅₀₀₀ determina la massima stabilizzazione delle particelle.

Secondo quanto è stato riportato in letteratura, la percentuale di PEG compresa tra il 2 e il 5% (in peso) rappresenta il valore soglia in grado di garantire una resistenza ottimale alle proteine. A concentrazioni al di sopra del 5% in peso non è stata ottenuta nessuna stabilizzazione ulteriore. Inoltre, è stato dimostrato che la natura del *core* delle particelle influenza il tipo e la quantità di proteine adsorbite. Infatti, dai modelli di adsorbimento di nanoparticelle di PLGA, PLA e PCL peghilate (serie crescente di idrofobicità) è stato dimostrato che, la natura e il tipo di proteina differiva nettamente tra i diversi tipi di particelle (Gref *et al.*, 2000).

La stabilizzazione *in vitro* e *in vivo* di SLN e NLC è stata ottenuta con successo incorporando il PEG in matrici lipidiche tramite la coniugazione con monostearato (PEG-SA). Tuttavia, l'incorporazione di PEG-SA nelle NLC ha ridotto l'efficienza di incapsulazione del farmaco e aumentato la velocità di rilascio del farmaco (Yuan *et al.*, 2007). In genere, i derivati lipidici del PEG si mescolano ad altri lipidi solidi e fusi.

Precedenti studi hanno riportato un aumento di 5 volte della concentrazione plasmatica di SLN caricate con doxorubicina, e un aumento di 7 volte per SLN di acido stearico stabilizzate con il PEG (Fundarò *et al.*, 2000).

E' stato dimostrato inoltre che la peghilazione aumenta la biodisponibilità di farmaci peptidici, tra cui la calcitonina dopo somministrazione orale (*Almeida and Souto , 2007*).

Le nanoparticelle lipidiche possono anche veicolare farmaci idrofili utilizzando coniugati lipidici del farmaco (*Joshi and Müller, 2008*).

E' importante sapere anche che la natura non adesiva del PEG, in molti casi, aiuta a prevenire l'aggregazione delle nanoparticelle, un problema che ne compromette fortemente l'uso. Ad esempio, Mishra e coll. hanno dimostrato che lo strato di PEG in superficie impediva l'aggregazione di nanoparticelle a base di ciclodestrina e di PEI (polietilenimmide), un problema che si è verificato con particelle a base di PEI e ciclodestrina non peghilate (*Mishra et al., 2004*). Allo stesso modo, il PEG non solo ostacola l'aggregazione di liposomi modificati in superficie, ma anche notevolmente ritarda la perdita dell'agente terapeutico dalle particelle rispetto a quelle non modificate. E' stato dimostrato che questo fenomeno dipendeva dalla lunghezza della catena del PEG e dalla quantità crescente di PEG incorporato sulla particella (*Li et al., 2005*).

1.5 Targeting passivo con nanocarrier peghilati

Come affermato precedentemente, una delle cause principali della tossicità dei farmaci antineoplastici è la loro scarsa selettività per le cellule tumorali. Gli agenti antitumorali agendo indistintamente anche sulle cellule sane, causano diversi effetti collaterali, quali nausea, vomito, diarrea, febbre, alopecia, e in alcuni casi anche effetti più gravi, quali tossicità a livello epatico o cardiaco (*Iver and Ratain, 1998*). Per questo motivo la sfida terapeutica a cui tutti ricercatori mirano è ottenere un farmaco terapeuticamente

selettivo attraverso strategie di *targeting attivo* o *passivo* (Figura 1.11). Il primo si basa sull'effetto EPR che si manifesta nel caso di sistemi macromolecolari che non essendo in grado di extravasare, si accumulano passivamente solo nella massa tumorale (Maeda and Matsumara, 1989).

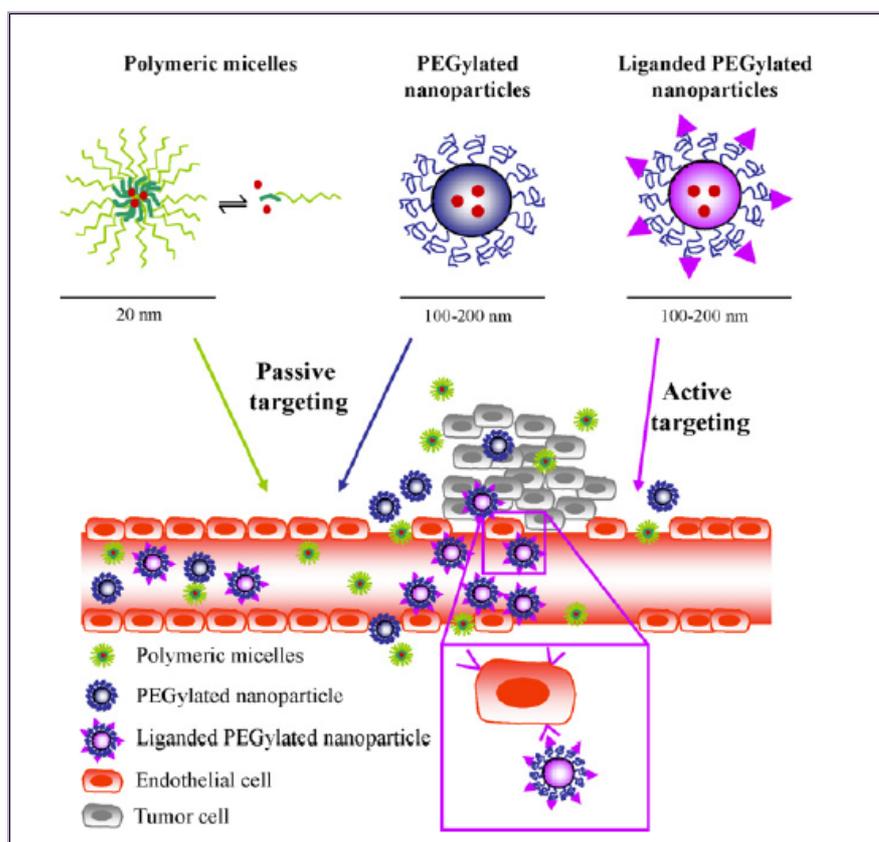


Figura 1.11: Rappresentazione di targeting passivo e attivo di nanoparticelle peghilate

Diversi esempi di *targeting passivo* sono riportati in letteratura. Per esempio, nanoparticelle di poli-(ϵ)-caprolattone (PCL) modificate con il PEG sono state formulate per il rilascio del tamoxifene nel carcinoma mammario. In questo studio, è stato osservato che non solo l'aggiunta del PEG riduceva le dimensioni delle particelle e la loro aggregazione, ma significativamente migliorava il tempo di circolazione consentendo circa

al 18% della dose iniettata di accumularsi nella massa tumorale entro 1 ora, contro un valore pari al 5% delle particelle non modificate (*Shenoy e Amiji, 2005*).

In uno studio condotto da Brigger e coll. è stato riportato che, somministrando la doxorubicina in nanosfere di poli(esadecilcianoacrilato) rivestite con il PEG, la dose massima tollerata del farmaco aumentava di 1,5 volte rispetto alle nanoparticelle convenzionali (*Brigger et al., 2004*).

Inoltre, nanoparticelle di poli(cianoacrilato) modificate con il PEG e caricate con paclitaxel hanno portato ad un accumulo del farmaco di 4,8 volte superiore nella massa tumorale accompagnato da una significativa regressione del tumore nel tempo (*Xu et al., 2005*).

Allo stesso modo, la modifica della superficie con metossi-PEG di particelle di cianoacrilato (PEG-PHDCA) caricate con il fattore ricombinante α -TNF, provocava la riduzione della fagocitosi da parte dei macrofagi e quindi della opsonizzazione. I valori dell'emivita del α -TNF sono stati aumentati (da 28,2 min a 11,33 ore), così come il picco della concentrazione di α -TNF è stato incrementato di 2,85 volte al sito tumorale e l'AUC di 7,44 volte, un fenomeno che aumentava sorprendentemente con il peso molecolare del PEG. Questo risultato è stato attribuito dagli autori ad un aumento dello spessore della strato solubile di PEG in superficie unito ad una diminuzione della distanza tra catene di PEG vicine (*Fang et al., 2006*).

Kaul e Amiji hanno preparato nanoparticelle di gelatina B stabilizzate con il PEG in superficie per il rilascio di DNA indirizzato a un tessuto tumorale. I dati *in vitro*, hanno mostrato che le nanoparticelle di gelatina peghilate portavano ad un aumento dell'efficienza di trasfezione dal 43 al 61% (38), suggerendo che la peghilazione ha aumentato l'*uptake* cellulare delle particelle, o impedito il danneggiamento endosomiale

del DNA incapsulato. I risultati *in vitro* sono stati coerenti con i dati ottenuti dall'applicazione *in vivo* di queste nanoparticelle di gelatina su un modello murino di carcinoma polmonare di Lewis, da cui è risultato che la peghilazione ha portato ad un aumento significativo dell'emivita plasmatica e dell'area sotto la curva rispetto alle nanoparticelle non modificate (Kaul and Amiji, 2005). La stabilizzazione con il PEG di queste particelle di gelatina ha portato ad un incremento dell'emivita plasmatica nella sede del tumore (121 ore) rispetto a quelle non peghilate (19 ore), favorendo l'aumento dell'espressione del DNA nelle cellule tumorali (Kaul and Amiji, 2005).

1.6 Targeting attivo con nanocarrier peghilati

Da quanto detto finora, il *targeting passivo* è quindi caratterizzato da un maggiore quantità di nanovettori a livello del sito tumorale più che nel plasma o in altri tessuti (Huynh et al., 2010). Tuttavia, un sistema di *drug delivery* basato sul *targeting passivo* è spesso limitato dalla mancanza di specificità del sito di destinazione e, inoltre, i vasi tumorali permeabili sono molto eterogenei e non ci sono grandi differenze nell'effetto EPR tra diversi tipi di tumore.

La strategia di *targeting attivo* permette di superare questi limiti tramite la modifica con opportuni ligandi della superficie del vettore. In questo modo il ligando aggiunto è in grado di riconoscere un antigene associato al tumore o uno specifico recettore e di catalizzare il rilascio del principio attivo al suo sito di azione, riducendo l'assorbimento del farmaco a livello delle cellule sane.

Recenti studi *in vitro* hanno dimostrato che le nanoparticelle modificate con opportuni ligandi hanno una attività antitumorale superiore a quella di vettori non

modificati (*Farokhzad et al., 2006; Kirpotin et al., 2006; Bartlett et al., 2007; Gu et al., 2008*).

Sebbene questi risultati dimostrino come questa strategia di *targeting* sia molto promettente nel trattamento delle malattie neoplastiche, la ricerca è ancora allo stadio iniziale di sviluppo, e solo pochi esempi di nanoparticelle bersaglio sono attualmente in fase clinica e nessuna sul mercato. Questo è dovuto alla complessità del processo di preparazione delle nanoparticelle, ai costi elevati dei ligandi e alla necessità di preparare questi sistemi in grande quantità per le applicazioni *in vivo* (*Huynh et al., 2010*).

Di conseguenza, la strategia di *targeting passivo* costituisce oggi un campo interessante e promettente nello sviluppo delle nanotecnologie, dal momento che le nanoparticelle per questo tipo di applicazione sono più facili da preparare e i costi correlati sono più bassi (*Eaton, 2006*).

In generale la maggior parte dei ligandi sono accoppiati a nanovettori attraverso un legame con il PEG. Esempi di ligandi sono rappresentati da piccole molecole, come il folato (*Sun et al., 2006*) e la tiamina (*Oyewumi et al., 2003*), le proteine come la transferrina (*Bellocq et al., 2003*), le lectine (*Gao et al., 2006*), gli anticorpi e frammenti di anticorpi (*Elbayoumi and Torchilin*), i polisaccaridi come il galattosio (*Jeong et al., 2006*), e gli aptameri (*Farokhzad et al., 2006*).

Indipendentemente dal tipo di ligando, lo scopo principale è sostanzialmente lo stesso, e cioè un migliore riconoscimento del sito bersaglio, dell'*uptake* delle cellule tumorali, e un ridotto riconoscimento dei siti non-specifici.

Pertanto, la peghilazione delle nanoparticelle oltre alle applicazioni menzionate prima, offre il vantaggio di funzionalizzare i gruppi terminali del PEG a gruppi reattivi tramite legame covalente. Più comunemente, il PEG è funzionalizzato ad acidi carbossilici,

ammine o gruppi sulfidrilici reattivi, consentendo la formazione di un legame ammidico o un ponte disolfuro con i vari tipi di ligandi. Quindi è evidente che il PEG svolge una doppia funzione, una è quella di modificare la superficie delle nanoparticelle, l'altra di funzionare come *linker* per l'attacco covalente di frazioni di *targeting attivo*. Il Folato è un ligando ampiamente usato perché riconosce il recettore della vitamina dell'acido folico, comunemente over-espressa da diversi tipi di tumore (*Russell-Jones et al., 2004*).

E' stato dimostrato che la presenza del PEG-folato sulla superficie di nanoparticelle di PLGA, ha provocato un maggiore *uptake* delle nanoparticelle nelle cellule tumorali KB positive che esprimevano il recettore per il folato (FR), rispetto all'internalizzazione delle particelle prive di ligando e delle particelle su cellule tumorali A549 FR negative (*Kim et al., 2005*). Allo stesso modo, nanoplessi caricati con DNA, in cui il folato è stato legato covalentemente al PEG, ha portato ad un aumento dell'espressione genica intracellulare rispetto ai nanoplessi privi di ligando, e i vettori sono stati indirizzati non soltanto verso cellule KB FR positive, ma anche verso cellule LNCaP che esprimevano l'antigene prostatico specifico di membrana (PSMA) (*Hattori and. Maitani, 2004*).

Pun e coll. hanno utilizzato la transferrina per trasportare attivamente nanoparticelle *stealth* verso le cellule tumorali che esprimevano il recettore della transferrina (TR), evitando l'adesione delle particelle sulle cellule TR negative (*Pun et al., 2004*).

Tuttavia, uno studio su nanoparticelle contenenti gadolinio su carcinoma nasofaringeo KB FR positivo, in cui l'acido folico è stato covalentemente legato al rivestimento di PEG delle particelle, ha dimostrato che la strategia di *targeting attivo* non ha apportato nessun beneficio in termini di selettività dell'azione terapeutica del farmaco nei confronti delle cellule tumorali (*Kim et al., 2005*).

Da quanto detto finora, il PEG risulta una molecola altamente versatile, perché, oltre a stabilizzare le nanoparticelle in circolo a seguito della loro somministrazione, è in grado di facilitare il *targeting attivo* delle stesse tramite l'incorporazione di ligandi recettoriali, di peptidi, di aptameri, e anche di macromolecole come le proteine (come gli anticorpi). Infatti, la peghilazione delle nanoparticelle indirizza l'agente terapeutico al sito tumorale bersaglio in modo molto più efficiente delle nanoparticelle non-modificate. Pertanto, il rivestimento con il PEG permette alle particelle di conservare le caratteristiche *stealth* e di accumularsi nella sede del tumore tramite *targeting passivo*; inoltre fornisce la base per l'incorporazione versatile di vari ligandi, migliorando quindi notevolmente l'efficacia anti-cancro della strategia terapeutica.

In realtà, in alcuni casi è possibile che il PEG mascheri i ligandi o i gruppi funzionali in superficie riducendo in tal modo la possibilità di una associazione o una interazione con le cellule. Questo porterebbe a una diminuzione dell'efficienza di rilascio intracellulare delle nanoparticelle modificate (*van Vlerken et al., 2007*).

1.7 Rilascio del farmaco a livello intracellulare

Una terapia che ha come *target* terapeutico quello tumorale è limitata non solo nella capacità di raggiungere il sito tumorale, ma anche nella capacità di penetrare all'interno delle cellule per raggiungere il sito bersaglio intracellulare, evitando al contempo la degradazione endosomiale (*Nori and Kopecek, 2005*).

La localizzazione intracellulare a livello di organelli bersaglio è particolarmente importante, ad esempio, nelle terapie geniche e chemioterapiche, per farmaci che hanno come *target* terapeutico il DNA e il RNA quali, il fluorouracile, la gemcitabina e la

doxorubicina, la cui localizzazione al di fuori del nucleo porta al loro fallimento terapeutico (Nori and Kopecek, 2005). Inoltre, l'internalizzazione del farmaco a livello endosomiale-lisomiale, può causare la sua degradazione con conseguente intrappolamento nell'organello. La Figura 1.12 mostra i possibili bersagli intracellulari e i limiti del *target* terapeutico.

Indipendentemente dal fatto che il farmaco si accumula in modo efficiente all'interno della massa tumorale, la risposta terapeutica dipende sempre dalla sua capacità di raggiungere il sito bersaglio (Torchilin, 2006).

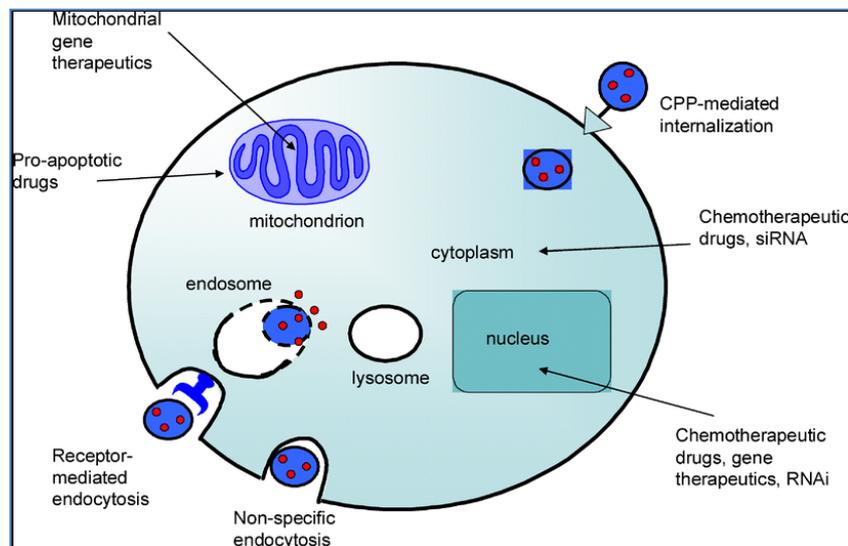


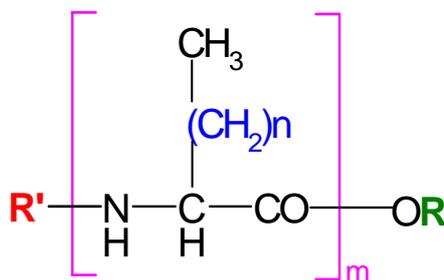
Figura 1.12: Illustrazione schematica dei target intracellulari di base di un farmaco tra cui citosol, nucleo e mitocondri (da van Vlerken et al., 2007)

1.8 I Lipoammino acidi o LAA

Uno degli approcci chimici progettati allo scopo di aumentare l'efficienza di farmaci, incrementandone la stabilità in circolo e/o il trasporto attraverso le membrane

biologiche, è rappresentato dall'uso dei lipoamminoacidi (LAA) (Figura 1.13). I LAA sono α -amminoacidi con una catena alchilica laterale di diversa lunghezza. Essi rappresentano una classe di composti che combinano le caratteristiche strutturali dei lipidi (per la presenza della catena idrofobica), con quelle degli amminoacidi (per la presenza dei gruppi NH_2 e COOH); possiedono, infatti, un'elevata lipofilia dovuta alle catene alchiliche, mentre mantengono le caratteristiche polari degli amminoacidi (Toth 1994; Wong and Toth 2001).

Particolarmente interessante è tuttavia il loro impiego come sistemi di rilascio di farmaci. Grazie alla loro natura bifunzionale hanno la capacità di essere coniugati a farmaci con vari gruppi funzionali, in modo da formare un legame chimicamente o biologicamente labile che dà vita a un *prodrug*. In tal modo, questi derivati avranno una struttura con caratteristiche anfifiliche simili a quelle del doppio strato delle membrane cellulari, che ne potrà facilitare il passaggio attraverso le membrane stesse. La catena alchilica, inoltre, può avere l'effetto addizionale di proteggere il farmaco dall'attacco enzimatico, prolungando l'emivita plasmatica del farmaco.



$n = 1-15$; $m = 0, 1, 2$; $\text{R} = \text{OH}; \text{OCH}_3$; $\text{R}' = \text{H}; \text{Boc}; \text{Fmoc}$

Figura 1.12: Struttura generale del LAA

Le notevoli possibilità di modulazione e manipolazione chimica, li rendono molecole estremamente interessanti per le loro potenzialità biofarmaceutiche e terapeutiche. Essi infatti offrono:

- la possibilità di proteggere/deproteggere agevolmente l'estremità carbossilica (tramite esterificazione) o amminica del LAA (ad esempio, con gruppi Boc, Fmoc, etc.);
- una reattività diversa o selettiva della funzione terminale libera (COOH, NH₂);
- la possibilità di ottenere dimeri, trimeri od oligomeri di LAA, modulando le proprietà fisico-chimiche del coniugato;
- la possibilità di inserire un opportuno *spacer* (es. un oligopeptide) che modifichi la cinetica di degradazione del coniugato.

I LAA presentano inoltre tre requisiti fondamentali per lo sviluppo industriale, quali multifunzionalità, bassa tossicità e riciclabilità dei materiali grezzi.

2 Attività di ricerca

I *carrier* nanoparticellari sono delle forme farmaceutiche innovative capaci di incorporare nel loro interno sostanze biologicamente attive e di accrescere ed ottimizzare il profilo biofarmaceutico e/o l'efficacia terapeutica delle molecole incorporate. Tali sistemi sono spesso progettati in modo da consentire un rilascio lento del farmaco per periodi prolungati, permettendo anche un direzionamento selettivo del principio attivo nei siti in cui esso deve agire.

Uno dei principali tentativi per ottenere sistemi a lunga circolazione è quello di modificare la loro superficie mediante l'impiego di polimeri idrofili in grado di "mascherare" fisicamente tali *carrier* ai meccanismi del complemento, i sistemi così ottenuti sono detti *stealth*.

L'uso di derivati lipidici del PEG per prolungare il tempo di circolazione di liposomi è stato ben documentato (*Allen et al., 1991; Woodle et al., 1992; Woodle et al., 1994*). E' stato dimostrato, infatti, che la presenza di PEG-lipidi sulle superficie di nanoparticelle può ridurre il legame non specifico di diverse proteine, tra cui BSA, laminina e fibronectina sulla superficie del vetro (*Bradley et al., 1998; Du et al., 1997*). Inoltre, esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che l'*uptake* di liposomi da parte dei macrofagi viene ridotta attraverso l'uso di derivati lipidici del PEG (*Zeisig et al., 1996; Miller et al., 1998; Johnstone et al., 2001*).

Questo comportamento spiega la tendenza sempre più crescente di utilizzare un'ampia varietà di polimeri idrofili flessibili, resi anfifilici tramite derivatizzazione con porzioni idrofobiche. La struttura che deriva permette di migliorare l'integrazione di questi coniugati nel doppio strato fosfolipidico. Per questo motivo i derivati fosfolipidici del PEG

possono essere considerati i modificatori di superficie più adatti, soprattutto per i liposomi (Li et al., 2002).

Tuttavia, l'ingombro sterico dato dalla frazione fosfolipidica può ridurre l'efficacia di questi derivati del PEG nel rivestire la superficie di altri vettori colloidali, come nanoparticelle polimeriche o lipidiche.

Per questo motivo, nell'ambito di un progetto di ricerca condotto all'interno del laboratorio del Prof. Pignatello è stata sintetizzata una nuova serie di coniugati tra i diversi polimeri del PEG e i LAA a lunga catena alifatica (da 16 a 20 atomi di carbonio). Questo lavoro è stato realizzato con l'obiettivo di creare strutture anfifiliche alternative ai derivati fosfolipidici del PEG.

Pertanto lo studio svolto in questa tesi di dottorato ha come scopo la **realizzazione**, la caratterizzazione fisico-chimica e la valutazione biologica **di sistemi colloidali stericamente stabilizzati**, utilizzando nuovi derivati del PEG con i LAA, **per la veicolazione ed il targeting di farmaci**, prevalentemente di agenti antitumorali.

In particolare, in questi tre anni di ricerca sono stati preparati **sistemi liposomiali e nanoparticelle a base lipidica** (SLN, NLC).

La procedura sintetica eseguita per l'ottenimento dei coniugati amidici PEG-LAA consiste nella coniugazione del PEG scelto (mPEG-propionato, ammino-mPEG) con un equivalente in moli del LAA desiderato.

La presenza del residuo di LAA in questi nuovi derivati polimerici del PEG per la loro natura lipofila dovrebbe garantire un migliore ancoraggio ed un innesto più stabile del polimero sulla superficie dei liposomi e delle nanoparticelle.

In particolare, i coniugati saggiati sono stati selezionati allo scopo di valutare l'influenza di vari parametri fisico-chimici: il peso molecolare del PEG utilizzato (2000 o

5000 Da), la lunghezza della catena alifatica del LAA (16, 18 o 20 atomi di carbonio) e il tipo di legame tra il PEG ed il residuo di LAA. I derivati del PEG impiegati per la coniugazione con i LAA sono stati: l' α -ammino- ω -metossi-PEG con peso molecolare sia 2000 che 5000 Da ed il metossi-PEG-propionato con peso molecolare sia 2000 che 5000 Da. Infatti, i polimeri sono stati legati ai LAA in due diversi modi: il primo è un legame tra il gruppo carbossilico del LAA ed il gruppo amminico dell'ammino-PEG, in questo caso il coniugato verrà indicato con la sigla PEGN-LAA; il secondo è un legame tra il gruppo amminico del LAA e il carbossile del metossi-PEG-propionato, in quest'altro caso il coniugato sarà indicato con la sigla PEGC-LAA. Grazie alla presenza di una doppia funzionalità reattiva (COOH e NH₂ terminali), è stato possibile infatti realizzare la sintesi di due tipi di derivati, coniugando un residuo di LAA, opportunamente protetto (ad es., come N-Boc o come estere metilico) a una catena di PEG₂₀₀₀ o di PEG₅₀₀₀ a loro volta contenente una corrispondente funzione amminica (es. amminoetil-metossi-PEG) o carbossilica (es. carbossietil-metossi-PEG). Per questo lavoro di ricerca sono stati dunque selezionati i seguenti composti, di cui le formule di struttura sono di seguito riportate:

- PEGC_{2000/5000}LAA16, 18 e 20 (Figura 2.1);
- PEGN_{2000/5000}LAA16, 18 e 20 (Figura 2.2).

Le proprietà di stabilizzazione sterica indotte da questi nuovi coniugati polimerici sono state confrontate con quelle di particelle *stealth* preparate con derivati anfifilici del PEG commercialmente reperibili, quali il derivato distearoilfosfatidil-etanolamminico (DSPE-PEG₂₀₀₀) e il PEG40-monostearato (PEG-40). L'efficienza di mascheramento della superficie delle particelle, garantita dai PEG-LAA, è stata verificata tramite test *in vitro*, quali:

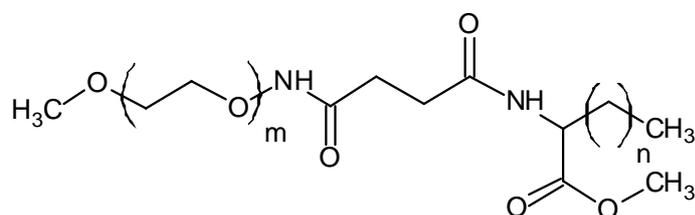
- misure di variazione della carica superficiale (potenziale Zeta);

- saggi di *uptake* macrofagico in coltura (J-774 e THP-1);
- misure di attivazione di specifici anticorpi del sistema immunitario (CH50);
- prove di stabilità nel tempo;
- prove di stabilità in siero bovino;

e test *in vivo*, quali:

- studi farmacocinetici;
- studi di crescita tumorale.

In particolare, parte di questo lavoro che riguarda: le misure di CH50, gli studi di *uptake* su cellule THP-1, gli studi farmacocinetici e di crescita tumorale, sono stati condotti presso l'INSERM U646 dell'Università d'Angers (Francia) in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Jean-Pierre Benoit e della Prof.ssa Catherine Passirani.

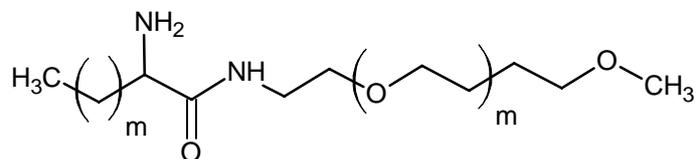


PEGC₂₀₀₀LAA16 n=13, m=44 o PEGC₅₀₀₀LAA16 n=3, m=96

PEGC₂₀₀₀LAA18 n=15, m=44 o PEGC₅₀₀₀LAA18 n=15, m=96

PEGC₂₀₀₀LAA20 n=17, m=44 o PEGC₅₀₀₀LAA20 n=17, m=96

Figura 2.1: Coniugati ammidici del carbossi-mPEG con i LAA



PEGN₂₀₀₀LAA16 n=13, m=44 o PEGN₅₀₀₀LAA16 n=13, m=96

PEGN₂₀₀₀LAA18 n=15, m=44 o PEGN₅₀₀₀LAA18 n=15, m=96

PEGN₂₀₀₀LAA20 n=17, m=44 o PEGN₅₀₀₀LAA20 n=17, m=96

Figura 2.2: Coniugati ammidici dell'ammino-mPEG con i LAA

3 Materiali e metodi

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti

I derivati PEG-LAA sono stati sintetizzati presso i nostri laboratori. Per queste sintesi sono stati utilizzati l' α -ammino- ω -metossi-PEG con peso molecolare di 2000 e 5000 Da ed il metossi-PEG-propionato (2000 e 5000 Da), acquistati dall'Iris Biotech (Marktredwitz, Germania).

I cloridrati degli esteri metilici ed i Boc-derivati dei LAA sono stati preparati secondo la procedura descritta di seguito (*Gibbons et al., 1990*). Per la sintesi dei coniugati PEG-LAA sono stati utilizzati: la 1,3-dicicloesilcarbodiimide (DCC, soluzione 1M in diclorometano), la 4-dimetilamminopiridina (DMAP), l'acido trifluoroacetico (TFA), l'1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide cloridrato (EDAC), e l'1-idrossibenzotriazolo (HOBt), tutti prodotti Aldrich; la trietilammina (TEA) e il diclorometano anidro (DCM) sono prodotti Fluka. Tutti i reattivi ed i solventi adoperati nei procedimenti di sintesi sono prodotti commerciali di qualità analitica o superiore, acquistati presso la Sigma-Aldrich Chimica (Milano). Per la purificazione dei derivati lipidici del PEG con i LAA sono state usate delle membrane di cellulosa della Cellu Sep (Seguin, TX, USA) con un diametro dei pori di 2000 e 5000.

I fosfolipidi impiegati per la preparazione dei sistemi liposomiali, quali il 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfocolina (DPPC), il 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DPPS) e il 1,2-distearoil-fosfatidil-etanolammina-methyl-poli(etilenglicole) (DSPE-PEG₂₀₀₀) sono prodotti dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera). Il colesterolo (CHol) è stato acquistato presso la Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA); il PEG 40 monostearato è un prodotto Sigma-Aldrich (Milano).

Per la preparazione delle SLN sono stati utilizzati: il Lipoid S 100 (fosfatidilcolina, 94%) della Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germania); l'acido stearico è stato acquistato presso la Carlo

Erba (Milano); la rodamina B 1,2-diesadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sale di trietilammonio (rodamina-DHPE) è un prodotto InVitrogen (UK).

Per le prove *in vitro* su cellule THP-1 e *in vivo* di biodistribuzione è stato utilizzato il colorante lipofilo 1,1¹-diottadecil-3,3,3¹,3¹-tetrametil-indocarbocianina perclorato (DiI: $\lambda_{em} = 544$ nm; $\lambda_{exc} = 590$ nm) acquistato dalla InVitrogen (Cergy-Pontoise, Francia).

Per la preparazione delle LNC sono stati utilizzati: il Labrafac WL 1349 (trigliceridi di acido caprilico-caprico) gentilmente donato da Gatefossé S.A. (Saint-Priest, Francia), il Lipoïd S75-3 (lecitina di soia al 69% di fosfatidilcolina e al 10% di fosfatidiletanolamina) acquistato dalla Lipoïd GmbH, (Ludwigshafen, Germany) e il Solutolo HS-15 (70% di idrossistearato di PEG₆₆₀, e 30% di PEG 660 libero) fornito da BASF (Ludwigshafen, Germania). Il NaCl è stato fornito dalla Prolabo (Fontenay-sous-Bois, Francia). L'acqua bidistillata è stata ottenuta tramite un Milli-Q plus system Millipore (Parigi, Francia).

Il Paclitaxel (PTX) usato per gli esperimenti di crescita tumorale *in vivo* è stato acquistato presso la Bioxel Pharma (Saint-Foy, Quebec, Canada).

3.1.2 Colture cellulari e animali da laboratorio

Il siero umano normale (NHS) utilizzato per l'analisi CH50 è stato fornito dallo Stabilimento Francese del Sangue (CHU, Angers, Francia). Gli eritrociti di pecora al 50% e gli anticorpi anti-eritrociti di pecora sono stati acquistati presso la bioMérieux, Marcy-l'Étoile.

Le cellule J-774 (linea cellulare murina di monociti-macrofagi) sono state acquistate dall'American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, MD, USA).

Le cellule THP-1 (linea cellulare di monociti/macrofagi) sono stati acquistati da ATCC (Manassas, VA, USA).

Porbol-12-miristato-13-acetato (PMA), è un prodotto Sigma (Saint-Quentin Fallavier, Francia). Il glucosio, la l-glutammina e il siero di feto di vitello (FCS) sono prodotti BioWhittaker

(Verviers, Belgio). La penicillina, e la streptomina sono prodotti Sigma (Saint-Quentin Fallavier, Francia), mentre il fungizone è un prodotto Invitrogen (UK).

Per gli studi farmacocinetici sono state utilizzate femmine di topo Swiss (20–22 g) e maschi di ratti Wistar (150-200g) (Ets Janvier, Le Genest-St-ile, France).

Per gli studi di crescita tumorale sono state utilizzate femmine di ratto Fischer F344 dei laboratori Charles River France (L'Arbresle, Francia).

Le cellule 9L di gliosarcoma di ratto sono stati acquistati dalla European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK).

3.1.3 Strumentazione

L'analisi dimensionale delle nanoparticelle è stata effettuata mediante spettroscopia di fotocorrelazione (Dynamic light scattering).

Il diametro medio delle particelle e l'indice di polidispersione sono stati determinati con uno Zetamaster (Malvern Instruments, UK).

La mobilità elettroforetica e il potenziale zeta (PZ) sono stati determinati mediante la tecnica del laser doppler anemometro con uno Zetamaster (Malvern Instruments, UK).

Per la rimozione di solventi organici è stato utilizzato un rotavapor Heidolph, Bioblock scientific.

Per le prove di stabilità delle SLN è stato utilizzato un incubatore Memmert 100.

Per l'osservazione dei campioni biologici è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza Nikon (Optiphot-2) equipaggiato di obiettivi 20x e 40x e munito di una ruota Nipkow coassiale-confocale accoppiata a una macchina fotografica (RTEA1317 K1CCD, Princeton Instruments).

Per l'analisi HPLC è stato usato un apparecchio Waters Alliance 2690 (Waters S.A., Saint-Quentin in Yvelines, Francia) utilizzando una colonna XTerra RP18 (5 μ m, 4.6 mm x 150 mm -

Waters S.A.). I dati sono stati elaborati tramite il software Empower Pro, versione 5.00. Lo strumento è costituito da un Detector Waters 2487 Dual λ Absorbance.

La densità ottica negli esperimenti *in vitro* è stata misurata utilizzando un Fluoroskan Ascent, FL Thermo Fisher Scientific (Cergy-Pontoise, Francia) e i risultati sono stati analizzati tramite il software Ascent per il Fluoroskan (Thermo Fisher Scientific, Cergy-Pontoise, Francia).

Per l'analisi CH50 la densità ottica è stata registrata utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-Pontoise, Francia).

Per l'analisi citofluorimetrica è stato usato un citofluorimetro BD FACS Calibur dotato di un software BD CellQuest (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia).

3.2 Procedimenti generali di sintesi

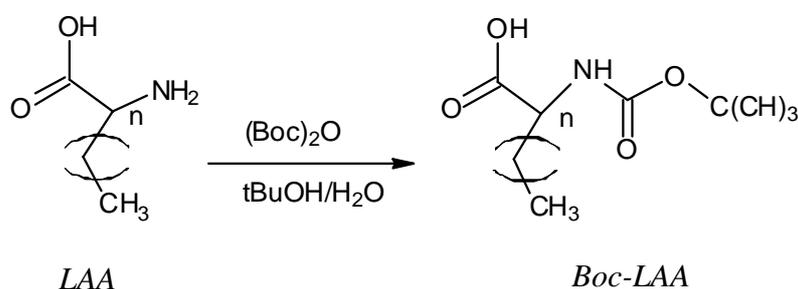
3.2.1 Sintesi dei coniugati polimerici PEG-LAA

I LAA sono stati preparati per reazione degli 1-bromoalcani con il dietilacetamidomalonato, seguita da idrolisi e parziale decarbossilazione degli alchil dietil acetamidomalonati intermedi (*Gibbons et al., 1990*).

Grazie alla presenza di una doppia funzionalità reattiva (COOH e NH₂ terminali), è stato possibile coniugare un residuo di LAA, opportunamente protetto (ad es., come N-Boc o come estere metilico) ad una catena di PEG₂₀₀₀ a sua volta contenente una corrispondente funzione amminica (es. amminoetil-metossi-PEG) o carbossilica (es. carbossietil-metossi-PEG). I derivati del PEG impiegati per la coniugazione con i LAA sono l' α -ammino- ω -metossi-PEG con peso molecolare 2000 e 5000 Da e il metossi-PEG-propionato con peso molecolare 2000 e 5000 Da.

3.2.2 Sintesi dei Boc-derivati dei LAA

Allo scopo di proteggere la funzione amminica dei LAA utilizzati sono stati sintetizzati i corrispondenti Boc-derivati (schema 4.1) come segue: una sospensione dell'amminoacido scelto (4 mmoli) in 30 ml di una soluzione t-BuOH/H₂O in rapporto 3:2 v/v è stata addizionata di NaOH (8 M), fino a un pH di 11-12, al quale l'amminoacido risulta completamente solubilizzato. Alla soluzione sono state addizionate 6 mmoli di di-*tert*-butildicarbonato in 5 ml di *terz*-butanolo, riportando il pH a 11-12 e lasciando agitare a temperatura ambiente per 2 ore. La soluzione è stata quindi diluita con acqua fino ad un volume di 60 ml e acidificata con acido citrico fino a pH 3. Al termine il prodotto è stato estratto con etile acetato; le fasi organiche sono state raccolte ed essiccate con solfato sodico anidro, filtrate e il solvente è stato rimosso per evaporazione sotto vuoto.

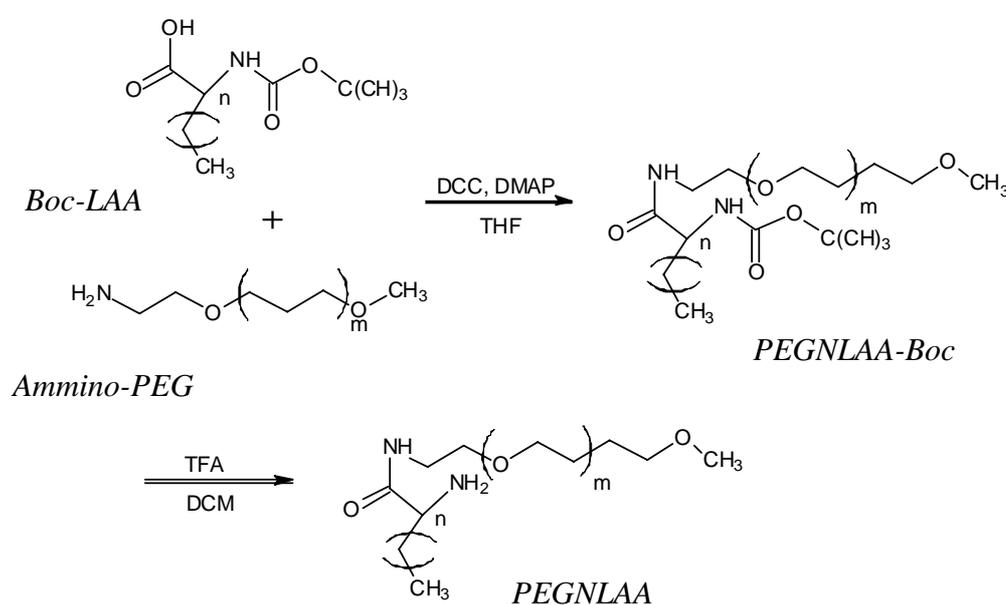


Schema 4.1: Sintesi dei Boc-LAA

3.2.3 Sintesi dei coniugati amidici dell'ammino-mPEG_{2000/5000} con i LAA

Per preparare il derivato PEGNLAA l' α -ammino- ω -metossi-PEG_{2000/5000} e il Boc-LAA scelto sono stati sciolti in DCM e addizionati di DMAP e di DCC (1 M in DCM) (schema 4.2). La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 48 ore a temperatura ambiente. Successivamente la miscela è stata filtrata per eliminare la dicicloesilurea (DCU) formata e il solvente è stato rimosso sotto vuoto. Il prodotto finale è stato purificato tramite dialisi. Per effettuare la dialisi il residuo

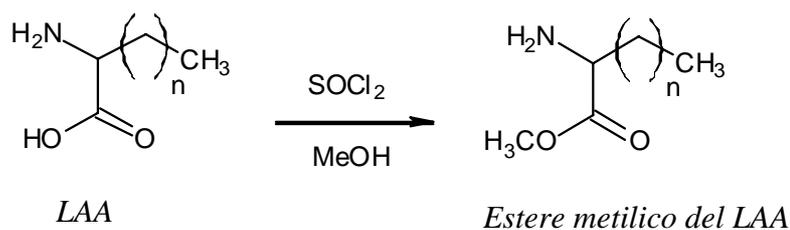
secco è stato sciolto in acqua distillata e posto in una membrana di cellulosa con cut-off 2000 e 5000 lasciata sotto agitazione in acqua distillata. La fase esterna è stata cambiata due volte al giorno per due giorni. Il gruppo protettore Boc è stato rimosso trattando i coniugati con una soluzione di TFA e DCM (1:1, v/v) per 2 ore a temperatura ambiente. Il solvente è stato rimosso sotto alto vuoto; il residuo è stato purificato mediante dialisi e liofilizzazione. I prodotti sono stati identificati mediante TLC, usando come sistema eluente DCM/MeOH nel rapporto 8,5:1,5 (v/v).



Schema 4.2: Sintesi dei coniugati ammidici dell'PEGN_{2000/5000} con i LAA

3.2.4 Sintesi degli esteri metilici dei LAA

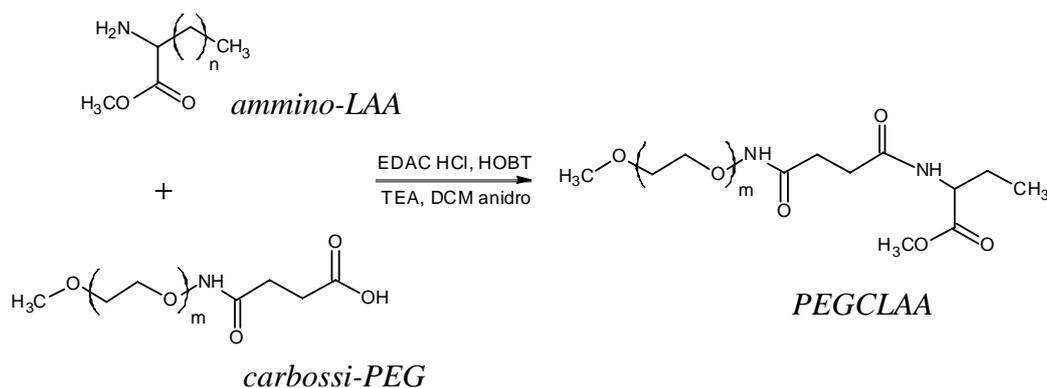
Questi coniugati sono stati sintetizzati come descritto (Pignatello *et al.*, 2010). Gli esteri metilici dei LAA sono stati preparati a partire da una soluzione del LAA (1 mmole) in MeOH addizionata di 100 μ l di SOCl₂ e posta ricadere per 24 ore. Al termine il solvente è stato rimosso per evaporazione sotto vuoto ed il residuo purificato per cromatografia su colonna utilizzando come fase eluente una miscela di DCM e MeOH (8:2, v/v) (schema 4.3).



Schema 4.3: Sintesi degli esteri metilici dei LAA

3.2.5 Sintesi dei coniugati ammidici del carbossi-mPEG_{2000/5000} con i LAA

Per la sintesi del coniugato PEGCLAA una soluzione del metossi-PEG_{2000/5000}-propionato in DCM anidro viene addizionata di HOBt, TEA, EDAC come agente copulante, lasciando per circa un'ora in ghiaccio ad agitare a temperatura ambiente, per favorire la fase di attivazione del gruppo carbossilico del PEG da parte dell'EDAC. In una seconda fase, avvenuta l'attivazione, alla miscela di reazione viene aggiunto il cloridrato dell'estere metilico del LAA (a 16, 18 o 20 atomi di carbonio) e la TEA come base per spostare il cloridrato (schema 4.4). La miscela viene lasciata reagire per circa cinque giorni a temperatura ambiente e monitorata attraverso TLC su lastre di alluminio, utilizzando come sistema eluente una soluzione di DCM e MeOH (8:2, v/v) ed esponendo la lastrina ai vapori di iodio o anche spruzzandola con una soluzione di ninidrina. Il solvente è stato successivamente rimosso sotto alto vuoto ed il residuo purificato mediante dialisi in acqua distillata e liofilizzato (come riportato per il coniugato PEGNLAA). I coniugati così isolati sono stati conservati in freezer in vials di vetro chiusi.



Schema 4.4: Sintesi dei coniugati ammidici del PEGC_{2000/5000} con i LAA

3.3 Preparazione dei nanocarrier, caratterizzazione chimico-fisica e valutazione *in vitro* e *in vivo*

3.3.1 Liposomi

3.3.1.1 Preparazione

Secondo la metodica TLE (Thin Layer Evaporation) sono stati preparati liposomi MLV di dimensioni comprese tra 200 nm e 1 μ m.

Per valutare la mobilità elettroforetica sono stati preparati MLV a base di DPPC, DPPS e del coniugato in esame.

Ogni campione è stato preparato miscelando 5 mg di DPPC con il 20% in moli di CHol, con i coniugati del PEG in esame: DSPE-PEG₂₀₀₀(3, e 10% in mol), PEGC₂₀₀₀LAA16 (1, 3, 5 e 10% in mol), PEGC₂₀₀₀LAA18, 20 (1, 3 e 5% in mol), PEC₅₀₀₀LAA16, 18 e 20 (3, 5 e 10% in mol), PEGN₂₀₀₀LAA16, 20 (3 e 5% in mol) e PEG40-stearato (3 e 10% in mol). Ogni miscela è stata posta in provette di vetro e solubilizzata con 1 ml di una miscela di cloroformio e metanolo (1:1, v/v). I solventi sono stati evaporati con un flusso di azoto, ottenendo un sottile ed omogeneo film lipidico lungo le pareti. Le provette sono state quindi poste in un fornello Buchi a 30°C sotto vuoto per 4-5 ore. Per stabilizzare il film fosfolipidico, i campioni sono stati conservati in freezer per 24

ore. Il processo di idratazione del film lipidico è stato effettuato aggiungendo 500 µl di acqua per HPLC a ciascuna provetta, che è stata poi scaldata a bagnomaria a 60°C per tre minuti e quindi agitata su vortex per altri tre minuti. L'intera procedura (riscaldamento-agitazione) è stata ripetuta tre volte per ciascun campione.

Per la misura di attivazione del complemento (CH50 assay) sono stati preparati MLV a base di DPPC (5 mg) e CHol (20% in mol) modificati con i derivati PEG_{2000/5000}LAA18 (10% in mol) e con il DSPE-PEG₂₀₀₀ sempre secondo la metodica TLE (Thin Layer Evaporation). L'idratazione del film lipidico è stata effettuata aggiungendo 1 ml di acqua distillata a ciascuna provetta ed eseguendo tre cicli di riscaldamento-agitazione come riportato sopra.

Per lo studio di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale (linee cellulari J-774) sono stati preparati liposomi MLV a base di DPPC e CHol modificati con PEG-LAA anche in questo caso secondo la metodica TLE (Thin Layer Evaporation). Ogni campione è stato preparato miscelando la DPPC (5 mg) con il 20% (in mol) di CHol, con i coniugati del PEG in esame e con lo 0,24% (p/p) di rodamina-DHPE. Per questa analisi è stato utilizzato il DSPE-PEG₂₀₀₀ (5% in mol), il PEGC₂₀₀₀LAA16 (5% in mol), il PEGC₂₀₀₀LAA18 (3,5 e 10% in mol), il PEGC₂₀₀₀LAA20 (5% in mol) e il PEGN₂₀₀₀LAA20 (5% in mol).

Il processo di idratazione del film lipidico è stato effettuato aggiungendo in questo caso 500 µl di tampone fosfato a pH 7,4 a ciascuna provetta, che è stata poi scaldata a bagnomaria a 60°C per tre minuti e quindi agitata su vortex per altri tre minuti. L'intera procedura (riscaldamento-agitazione) è stata ripetuta tre volte per ciascun campione.

Per le prove di uptake cellulare mediante citofluorimetria di flusso su linee cellulari THP-1 sono stati preparati MLV di DPPC (5 mg) e CHol (20% in mol) modificati con PEGC_{2000/5000}LAA18 e PEGN_{2000/5000}LAA20 (10% in mol) resi fluorescenti con DiI. Quest'ultimo, utilizzato come *probe* lipofilo è stato sciolto in cloroformio (0,4% in mol) e aggiunto

successivamente agli altri componenti lipidici. Gli MLV sono stati ottenuti come riportato in precedenza.

Per lo studio della farmacocinetica e della biodistribuzione sono stati preparati liposomi MLV fluorescenti con DiI in cloroformio (0,4% in mol). Seguendo la procedura TLE sono stati formulati MLV a base di DPPC (5 mg) e CHol (20% in mol) modificati con PEGC_{2000/5000}LAA18 e PEGN_{2000/5000}LAA20 (10% in mol).

Per studiare la capacità di inibizione della crescita tumorale gli MLV a base di DPPC (5 mg) e CHol (20% in mol) sono stati caricati con PTX. Il farmaco (1 mg/g) è stato sciolto nel solvente organico insieme ai componenti lipidici. La frazione di PTX non incapsulata è stata rimossa da quella incapsulata tramite centrifugazione a 20,000 rpm per 30 min. Il sopranatante è stato scartato e il precipitato è stato lavato due volte con tampone fosfato (PBS, pH7.4).

3.3.1.2 Caratterizzazione chimico-fisica

3.3.1.2.1 Analisi dimensionale e potenziale Zeta

Per la determinazione delle dimensioni e della distribuzione di carica (potenziale Z) la sospensione liposomiale è stata diluita in acqua deionizzata (1:100). Le misure sono state effettuate a 25°C in triplicato.

3.3.1.3 Studi *in vitro*

3.3.1.3.1 Misura di attivazione del complemento (CH50 assay)

Il consumo del complemento da parte delle particelle è stato testato su siero umano normale (NHS), misurando la capacità emolitica residua del complemento dopo contatto con le diverse particelle (*Passirani et al., 1998*).

La tecnica consiste nel determinare la quantità di siero in grado di provocare la lisi del 50% di un numero fisso di eritrociti sensibilizzati di pecora (CH50) (Mayer, 1961). Le soluzioni di VBS (soluzione tamponata salina di Veronal) e VBS²⁺ (VBS contenente Ca²⁺ 0,15 mM e Mg²⁺ 0,5 mM) sono stati preparati come descritto in letteratura (Kazatchkine et al., 1986). Il siero proveniente da un pool di campioni di sangue di 40 donatori è stato suddiviso in aliquote, e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Per attivare il complemento attraverso la via classica, gli eritrociti di pecora sono stati sensibilizzati da coniglio, anticorpi anti-eritrociti di pecora (siero emolitico), ad una diluizione finale di 1/800 (v/v) in VBS²⁺. Eritrociti di pecora attivati da anticorpi sono stati preparati a 1×10^8 cellule/ml in VBS²⁺.

Per valutare il consumo di unità CH50 in presenza delle particelle in un tempo di incubazione costante, la sospensione particellare è stata aggiunta al siero umano diluito in VBS²⁺ in modo che la diluizione finale del siero nella miscela di reazione fosse di 1/4 (v/v) in un volume finale di 1 ml. Le sospensioni sono state incubate a 37°C, con agitazione per permettere la reazione tra i componenti del siero e le particelle. Tali sospensioni sono state quindi diluite con VBS²⁺ prima dell'aggiunta della sospensione di eritrociti sensibilizzati di pecora. Dopo incubazione a 37°C sotto blanda agitazione, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di una soluzione acquosa di NaCl ghiacciata (0.15 M). La sospensione è stata centrifugata a 2000 rpm per 10 min, formando un sedimento di eritrociti non lisati. La densità ottica del sopranatante (200 µL), che è legata alla capacità litica del siero, è stata registrata a 415 nm utilizzando un lettore di micropiastre e confrontata con i risultati ottenuti con il siero di controllo.

Controlli positivi e negativi sono stati utilizzati in ogni serie di esperimenti per correggere eventuali differenze nella risposta dell'emoglobina da un particolare campione di eritrociti. Inoltre, la diffusione della luce da parte delle particelle e l'emolisi spontanea degli eritrociti sono state corrette utilizzando un controllo di soli eritrociti e sole nanoparticelle. Infine, è stato verificato che

né la presenza di una soluzione di PEG, né la presenza di particelle senza siero, causano l'emolisi degli eritrociti di pecora sensibilizzati all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato nel test.

I dati possono essere espressi in termini di unità CH50, che rappresentano le diluizioni di siero alla quale si verifica il 50% di emolisi, calcolati in forma lineare in una versione log-log dell'equazione di Von Krogh (*Kazatchkine et al., 1986*). Un'alternativa è quella di esprimere la percentuale di unità CH50 consumate rispetto al controllo negativo [Eq. (1)]:

$$\text{Consumo}(\%) = (\text{CH50}_{\text{campione}} - \text{CH50}_{\text{controllo}} / \text{CH50}_{\text{controllo}}) \times 100^{(1)}$$

Per confrontare particelle con diametro diverso, il consumo del complemento viene riportato in funzione della superficie. L'area superficiale delle nanoparticelle è stata calcolata, utilizzando l'equazione (2) (*Passirani et al., 1998; Kazatchkine et al., 1986*):

$$S = n4\pi r^2 \text{ e } V = n(4/3)(\pi r^3)$$

portando a:

$$S = 3V/r = 3m/r\rho^{(2)}$$

dove S è l'area della superficie (cm²) e V il volume (cm³) di n sfere di raggio medio r (cm), peso m (µg), e massa ρ (µg/cm³).

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i risultati sono stati espressi mediante deviazione standard.

3.3.1.3.2 Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale su cellule J-774

Per verificare se i derivati del PEG utilizzati fossero realmente in grado di “mascherare” i carrier particellari, sono state eseguite prove di uptake, *in vitro*, da parte di cellule macrofagiche.

Le cellule J-774 sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenente siero di feto di vitello (10%), glucosio (4.5 g/l), piruvato di sodio (1 mM), penicillina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml) e fungizone (25 µg/ml) e incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Il terreno di coltura è stato rinnovato ogni tre giorni e le subculture sono state eseguite ogni 8-10 giorni.

Per la realizzazione degli esperimenti, 6×10^5 cellule sono state seminate su un coprioggetto posto in piastre a 6 pozzetti. Dopo 24 ore, in ciascun pozzetto il terreno è stato sostituito e le cellule sono state trattate con 100 µl di ciascuna sospensione liposomiale, tranne i pozzetti utilizzati come bianco (liposomi non *stealth*) e come controllo (solo cellule). Le piastre sono state quindi incubate per 4 ore a 37°C.

Le cellule trattate e i controlli sono stati fissati con paraformaldeide al 4% per 20 minuti. Il coprioggetto è stato lavato per tre volte con PBS per eliminare la paraformaldeide e successivamente adagiato su un vetrino.

I campioni biologici sono stati osservati al microscopio alla lunghezza d'onda di assorbimento della rodamina-DHPE (520 nm). Le immagini sono state assemblate e stampate direttamente su carta.

3.3.1.3.3 Studi di *uptake* cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1

Le cellule THP-1 sono state coltivate in RPMI 1640 contenente L-glutamina (2 mM) modificato con PBS (10 mM), piruvato di sodio (1 mM), glucosio (4.5 g/L) e bicarbonato (1.5 g/L) e addizionato di FBS (10%) e di 2-mercaptoetanololo (0.05 mM), e lasciate in incubatore a 37°C al 5% di CO₂. L'esperimento è stato condotto su cellule differenziate e la differenziazione è stata condotta nello stesso terreno di coltura aggiungendo 200 nM di PMA per 24 ore per permettere la loro adesione. Dopo aspirazione del terreno di coltura per eliminare le cellule in sospensione, le

cellule sono state incubate in un terreno fresco per altre 24 ore prima di aggiungere le particelle. Un volume di 0.6×10^6 cellule per ml sono state poste su una piastra a 24 pozzetti e lasciate crescere per 24 ore a 37°C. Dopo 24 ore, le sospensioni liposomiali modificate con il PEGC_{2000/5000}LAA18, PEGN_{2000/5000}LAA20 e il DSPE-PEG₂₀₀₀ sono state depositate (1,5 mg/ml) su un monostrato di cellule e lasciate in incubatore a 37°C e a 4°C per 90 min. La quantità di particelle fagocitata è stata determinata quantitativamente tramite citofluorimetria di flusso (FACS).

3.3.1.4 Studi *in vivo*

3.3.1.4.1 Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione

Gli studi sugli animali sono stati effettuati in conformità con la normativa francese su topi Swiss di sei-sette settimane. I liposomi fluorescenti sono stati iniettati (150 µl) per via endovenosa nella vena caudale del topo sotto anestesia con isoflurano gassoso. I campioni di sangue sono stati prelevati a livello oculare e cardiaco su tre animali a 1, 10 e 30 minuti ed a 1, 3 e 24 ore dopo l'iniezione. Il sangue è stato raccolto in provette e centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti. Il sopranatante (150 µl) è stato trasferito in una piastra a 96 pozzetti a fondo nero e la densità ottica è stata misurata utilizzando un Fluoroscan. La fluorescenza residua del plasma è stata calcolata somministrando agli animali una soluzione isotonica (NaCl 150 mM).

La concentrazione delle diverse particelle nel sangue a diversi tempi è stata calcolata considerando che il sangue rappresenta il 7,5% del peso del corpo (*Calvo et al., 2001*). La fluorescenza è stata espressa come unità di fluorescenza (FU) ed è stata calcolata in base alla formula (Eq. 3):

$$FU = (FU_{\text{campione}} - FU_{\text{vuoto}})^{(3)}$$

Il 100% della fluorescenza è stata considerata al tempo $t=1$ min.

I dati farmacocinetici sono stati calcolati tramite l'analisi non-compartmentale della percentuale della dose iniettata contro i profili temporali tramite il software Kinetica 4.1.1 (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, Francia). L'emivita di distribuzione ed eliminazione sono state calcolate come segue (Eq. 4):

$$t_{1/2} = \log(2)/Lz^{(4)}$$

Lz è stato determinato tramite analisi di regressione lineare utilizzando intervalli definiti: 3 ore per il $t_{1/2[0-3 \text{ h}]}$ di distribuzione e 24 ore per il $t_{1/2[0-24 \text{ h}]}$ di eliminazione. L'area sotto la curva (AUC) è stata calcolata rispetto a quella degli MLV di DPPC.

3.3.1.4.2 Determinazione della quantità di farmaco incapsulata

La concentrazione di PTX incapsulata in tutti i campioni di MLV è stata calcolata tramite analisi HPLC. Tre campioni di ciascun gruppo di MLV, centrifugati per eliminare i cristalli di PTX insolubile, sono stati disciolti in una soluzione 96/4 (v/v) di metanolo/tetraidrofuranolo.

Un'aliquota di ciascuna soluzione filtrata è stata iniettata in triplicato nella colonna per HPLC. L'analisi è stata condotta usando acqua e acetonitrile come fase mobile con un gradiente di eluizione di 50–80% di acetonitrile. La soluzione è stata iniettata con una velocità di flusso di 1 ml/min. La lunghezza d'onda del detector è stata fissata a 227 nm.

3.3.1.4.3 Esperimenti di crescita tumorale-Impianto delle cellule tumorali

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su femmine di ratto Fischer F344 di 10-11 settimane (150–180 g). Gli animali sono stati manipolati sotto anestesia di isoflurano/ossigeno secondo la normativa Ministeriale Francese.

Cellule di gliosarcoma 9L di ratto sono state lavate due volte con Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) senza FCS o antibiotici, contaminate e sospese alla concentrazione finale

desiderata. Per questa analisi una sospensione contenente 1.5×10^6 di cellule 9L sono state impiantate per via sottocutanea nella coscia destra dell'animale. Dieci giorni dopo l'impianto, i ratti sono stati divisi in modo random in tre gruppi trattati con una singola somministrazione endovenosa (400 μ l) delle diverse formulazioni di PTX.

Il primo gruppo è stato trattato con una sospensione di MLV di DPPC caricati con PTX (16.2 mg/kg; 10 animali); il secondo gruppo ha ricevuto la stessa quantità di MLV modificati con il PEGC₂₀₀₀LAA18 e caricati con PTX (10 animali), il terzo gruppo ha ricevuto MLV modificati con DSPE-PEG₂₀₀₀ e caricati con paclitaxel (2.5 mg/kg; 9 animali).

La lunghezza e l'ampiezza di ciascun tumore è stata regolarmente misurata usando una pinza digitale, e il volume tumorale è stato calcolato mediante la formula matematica data nell'equazione (5).

$$\text{Volume}(V) = (\pi/6) \times \text{ampiezza}^2(l) \times \text{lunghezza}(L) \quad (5)$$

3.3.2 SLN

3.3.2.1 Preparazione

Le SLN sono state preparate tramite un'opportuna modificazione della tecnica del *solvent injection* (Kawashima *et al.*, 1989), impiegando la formulazione che, in uno studio precedente, aveva mostrato le migliori caratteristiche dimensionali e di stabilità (Stancampiano *et al.*, 2006; 2008). Il metodo prevede la dissoluzione del lipide, in questo caso l'acido stearico (20 mg), e del tensioattivo (Lipoid S100, 300 mg, ovvero l'1% p/v) in 5 ml di etanolo a temperatura ambiente. La soluzione organica viene poi iniettata, tramite l'ausilio di una siringa con ago, in 30 ml di acqua per HPLC sotto costante agitazione tramite un Ultra-Turrax T25 alla velocità di 24000 rpm. A processo ultimato, l'etanolo residuo viene allontanato per evaporazione sotto lenta agitazione magnetica a temperatura ambiente per 24 ore. Le SLN *stealth* sono state preparate utilizzando due derivati

commerciali del PEG (PEG 40 monostearato e DSPE-PEG₂₀₀₀) e i due coniugati del PEG con LAA a 18 atomi di carbonio (PEGC₂₀₀₀LAA18 e del PEGC₅₀₀₀LAA18).

Tali polimeri sono stati aggiunti alla fase organica, precedentemente descritta, a tre diverse concentrazioni (0.5%, 1% e 3%, p/v).

3.3.2.2 Caratterizzazione chimico-fisica

3.3.2.2.1 Dimensione delle particelle e potenziale Zeta

Il diametro medio e il PDI e il potenziale Zeta delle SLN preparate sono stati determinati su campioni opportunamente diluiti con acqua bidistillata ed effettuando misure nel tempo sulle formulazioni allo scopo di valutarne la stabilità chimico-fisica. L'analisi è stata condotta a 25°C in triplicato.

3.3.2.3 Studi *in vitro*

3.3.2.3.1 Prove di stabilità

Per valutare la stabilità fisica delle SLN, i campioni sono stati conservati a temperatura ambiente, in vials di vetro con tappo a vite e ad intervalli di tempo prestabiliti ne sono state valutate le caratteristiche dimensionali.

La stabilità delle SLN nel siero di bovino è stata valutata preparando dei campioni con un rapporto di diluizione 1:5 SLN-siero bovino, modificando opportunamente un metodo descritto in letteratura (*Takeuchi et al., 2001*). Ciascun campione di SLN così ottenuto è stato posto in incubatore a 37°C in vials di vetro. I cambiamenti dimensionali e di PDI, durante l'incubazione in tali condizioni biologiche, sono stati valutati tramite spettroscopia di fotocorrelazione, seguendo l'esperimento ogni mezz'ora per 4 ore.

3.3.2.3.2 Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale su cellule J-774

Le cellule J-774 sono state coltivate come descritto prima. Per realizzare questo saggio sono state preparate le SLN utilizzando come marker per la fluorescenza la rodamina. La rodamina è stata aggiunta alla fase organica, precedentemente descritta, nella quantità di 0.005 mg.

Per la realizzazione del saggio 6×10^5 cellule sono state seminate su un coprioggetto posto in piastre a 6 pozzetti. Dopo 24 ore, in ciascun pozzetto il terreno è stato sostituito e le cellule, dopo essere state trattate con 100 μ l delle SLN in esame (tranne due pozzetti utilizzati uno per il controllo dell'autofluorescenza delle cellule e l'altro per il bianco, cioè SLN non *stealth*), sono state poste ad incubare per 2 e 4 ore a 37°C. I derivati del PEG utilizzati in questo saggio per “mascherare” la superficie delle SLN sono stati: DSPE-PEG₂₀₀₀, PEG 40 monostearato, PEGC₂₀₀₀LAA18, PEGC₅₀₀₀LAA18, tutti alle stesse concentrazioni di 0.5%, 1% e 3% p/v.

Alla fine del tempo di incubazione, le cellule trattate e quelle di controllo sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti. Il coprioggetto è stato lavato per tre volte con PBS (per eliminare la paraformaldeide) e successivamente adagiato su un vetrino.

Per l'osservazione dei campioni biologici è stato utilizzato un microscopio ad epifluorescenza Nikon alla lunghezza d'onda di assorbimento della rodamina (520 nm)

Le immagini sono state assemblate e stampate direttamente su carta.

3.3.3 LNC

3.3.3.1 Preparazione

Le LNC sono state preparate tramite il processo di inversione di fase descritta da Heurtault (*Heurtault et al., 2002*). In breve, tutti i componenti quali il labrafac WL 1349, il lipoid S75-3, il solutolo HS-15, il NaCl e l'acqua bidistillata, sono stati mescolati e la miscela è stata sottoposta a tre cicli di temperatura (60-90 °C) sotto agitazione magnetica, per raggiungere l'inversione di fase

da un'emulsione olio in acqua ad una acqua in olio. Successivamente, la miscela ha subito un rapido processo di raffreddamento-diluizione, per aggiunta di acqua a 4°C, che ha portato alla formazione delle LNC. A seconda della quantità dei componenti usati nella formulazione delle NLC si possono ottenere nanocapsule di 20, 50 e 100 nm. Nel nostro caso sono state preparate NLC classiche di 50 nm (1.5 mg/ml). Le LNC *stealth* sono state preparate per post-inserzione utilizzando PEGC₂₀₀₀LAA18 e PEGC₅₀₀₀LAA18 al fine di ottenere una concentrazione finale di 15 mM. co-incubando per 2 ore a 60°C le NLC preformate e il PEGC₂₀₀₀LAA18 o PEGC₅₀₀₀LAA18. La miscela è stata agitata con vortex ogni 15 min per 2 ore e alla fine dell'ultimo riscaldamento è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio per 1 min. LNC fluorescenti sono state ottenute sciogliendo il DiI in acetone (0,6% in mol). La soluzione risultante è stata incorporata nel labrafac (1:10 p/p).

Per lo studio della farmacocinetica e della biodistribuzione sono state preparate LNC fluorescenti con il DiI, che è stato precedentemente sciolto in acetone (0.6% p/p) e incorporato in Labrafac (1:10 p/p).

Per studiare la capacità di inibizione della crescita tumorale sono state preparate LNC caricate con PTX. Il farmaco (6,5 mg/g, 2% p/p) è stato prima solubilizzato in Labrafac, successivamente a questa soluzione sono stati aggiunti il Solutolo HS15, il Lipoid e il NaCl e l'acqua, e le LNC sono state preparate secondo la procedura riportata sopra. Nell'ultimo step per eliminare il farmaco non intrappolato, le LNC sono state filtrate tramite filtri con pori di 0.2 µm.

3.3.3.2 Caratterizzazione chimico-fisica

3.3.3.2.1 Dimensione delle LNC e potenziale Zeta

Per la determinazione delle dimensioni e della distribuzione di carica (potenziale Z) la sospensione delle NLC è stata diluita in acqua deionizzata (1:100). L'analisi è stata condotta a 25°C e in triplicato.

3.3.3.3 Studi *in vitro*

3.3.3.3.1 Misura di attivazione del complemento (CH50 assay)

Il consumo del complemento è stato testato sulle particelle in esame secondo il protocollo descritto prima.

Anche in questo caso, per valutare il consumo di unità CH50 in presenza di particelle in un tempo di incubazione costante, la sospensione delle NLC è stata aggiunta a siero umano diluito in VBS²⁺ in modo che la diluizione finale del siero nella miscela di reazione fosse di 1/4 (v/v) in un volume finale di 1 ml.

3.3.3.3.2 Studi di *uptake* cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1

Le cellule THP-1 sono state coltivate come riportato sopra.

L'esperimento è stato condotto su cellule differenziate. Dopo aspirazione del terreno di coltura per eliminare le cellule in sospensione, le cellule sono state incubate in un terreno fresco per altre 24 ore prima di aggiungere le nanoparticelle. Un volume di 0.6×10^6 cellule per ml sono state poste su una piastra a 24 pozzetti e lasciate crescere per 24 ore a 37°C. Dopo 24 ore, le sospensioni di LNC fluorescenti modificate e non con il PEGC_{2000/5000}LAA18 sono state depositate alla concentrazione di 1,5 mg/ml su un monostrato di cellule e lasciate in incubatore a 37°C o a freddo (4°C) per 90 min. La quantità di NLC fagocitata è stata determinata quantitativamente tramite citofluorimetria di flusso (FACS).

3.3.3.4 Studi *in vivo*

3.3.3.4.1 Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione

Gli studi sugli animali sono stati effettuati in conformità con la normativa francese, sia su topi Swiss che su ratti Wistar. Le LNC fluorescenti sono state iniettate per via endovenosa nella vena caudale del topo (150 μ l) e nella vena peniana del ratto (1 ml) sotto anestesia con isoflurano gassoso. I campioni di sangue sono stati prelevati su tre animali a 1, 10 e 30 minuti ed a 1, 3 e 24 ore dopo l'iniezione. Il sangue prelevato è stato raccolto in provette, centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti e la densità ottica è stata misurata utilizzando un Fluoroscanner. L'emivita plasmatica di distribuzione e di eliminazione sono state calcolate come riportato sopra.

In questo caso la regola trapezoidale è stata utilizzata per calcolare l'area sotto la curva durante tutto il periodo sperimentale ($AUC_{[0-24\text{ h}]}$) senza estrapolazione.

3.3.3.4.2 Determinazione della quantità di farmaco incapsulata

La concentrazione di PTX incapsulata in tutti i campioni di LNC è stata calcolata tramite analisi HPLC come riportato per i liposomi.

3.3.3.5 Studio di crescita tumorale-Impianto delle cellule tumorali

Gli esperimenti sono stati condotti su femmine di ratto Fischer F344 di 150–180 g di 10-11 settimane. Gli animali sono stati manipolati sotto anestesia di isoflurano/ossigeno secondo la normativa Ministeriale Francese.

Un monostrato di cellule 9L di gliosarcoma di ratto è stato lavato due volte con EMEM senza FCS o antibiotici, contaminate e sospese alla concentrazione finale desiderata. Per questa analisi una sospensione contenente 1.5×10^6 di cellule 9L sono state impiantate per via sottocutanea nella coscia destra dell'animale. Dieci giorni dopo l'impianto, i ratti sono stati divisi in modo random in

quattro gruppi trattati con una singola somministrazione endovenosa (400 μ l) delle diverse formulazioni di PTX. Il primo gruppo è stato trattato con la soluzione salina (controllo; 9 animali), il secondo gruppo è stato trattato con una dose di LNC classiche caricate con il farmaco (10 animali), il terzo gruppo ha ricevuto la stessa quantità di LNC modificate con PEGC₂₀₀₀LAA18 e caricate con PTX (2.5 mg/kg; n=10 animali), il quarto gruppo ha ricevuto una dose di NLC modificate con DSPE-PEG₂₀₀₀ a base di PTX (2.5 mg/kg; n=10 animali).

La lunghezza e l'ampiezza di ciascun tumore è stata regolarmente misurata usando una pinza digitale, e il volume tumorale è stato calcolato come riportato prima.

4 Risultati

4.1 Liposomi

4.1.1 Analisi del potenziale Zeta

Il potenziale Zeta è un parametro che rende conto della carica superficiale delle particelle. Esso può influenzare la stabilità del sistema in esame: infatti, se tale valore è troppo basso la forza repulsiva non sarà abbastanza forte da superare le forze di attrazione di Van der Waals esistenti tra le particelle, e queste inizieranno ad agglomerarsi con conseguente instabilità della sospensione. Invece, un alto potenziale Zeta impedisce l'aggregazione e mantiene la dispersione uniforme e libera di scorrere.

In molti lavori scientifici è stato constatato come la presenza del polimero nei sistemi *stealth* possa influenzarne le caratteristiche chimico-fisiche, quali dimensioni e carica superficiale. In particolare, spesso si osserva una riduzione del potenziale Zeta nei sistemi *stealth* rispetto a quelli non *stealth*, probabilmente per la presenza delle catene idrofiliche del polimero (generalmente PEG o DSPE-PEG) che tendono a posizionarsi sulla superficie della particella “mascherandone” la carica.

Comparate con i liposomi non peghilati, le vescicole peghilate hanno mostrato valori di potenziale Zeta più alti (meno negativi) (Figura. 4.1); ciò è presumibilmente dovuto alla più uniforme azione di schermaggio operata dai residui di PEG sulla superficie delle vescicole fosfolipidiche. Infatti, si osserva un aumento lineare del potenziale Zeta con il crescere della concentrazione molare dei derivati del PEG.

L'effetto sterico è più contenuto per il DSPE-PEG₂₀₀₀ e per i coniugati dell'ammino-PEG, mentre è più netto per il PEG40 monostearato e per i due coniugati del carbossi-PEG₂₀₀₀ con LAA18 e 20. Il corrispondente derivato PEGC₂₀₀₀LAA16 si è dimostrato più efficace nel coprire le superfici delle vescicole. Tuttavia, il dato più interessante proviene dal comportamento dei

coniugati del carbossi-PEG₅₀₀₀: i liposomi prodotti con tutti e tre i suoi coniugati con i LAA 16, 18, 20, infatti, hanno mostrato una carica negativa molto più bassa rispetto alle vescicole “nude”, con valori di potenziale Zeta fino a -21 mV alla frazione molare più elevata (10%). Anche le frazioni molari più basse di questi coniugati, comunque, hanno prodotto un effetto schermante più netto ed omogeneo di quello determinato dal 10% di DSPE-PEG₂₀₀₀.

Inoltre, un aumento del peso molecolare del PEG ha l'effetto di ridurre la carica negativa superficiale; i coniugati del PEG₅₀₀₀ hanno mostrato infatti valori meno negativi di potenziale Zeta rispetto agli analoghi coniugati PEG₂₀₀₀ (contenenti il medesimo residuo di LAA ed alla stessa concentrazione).

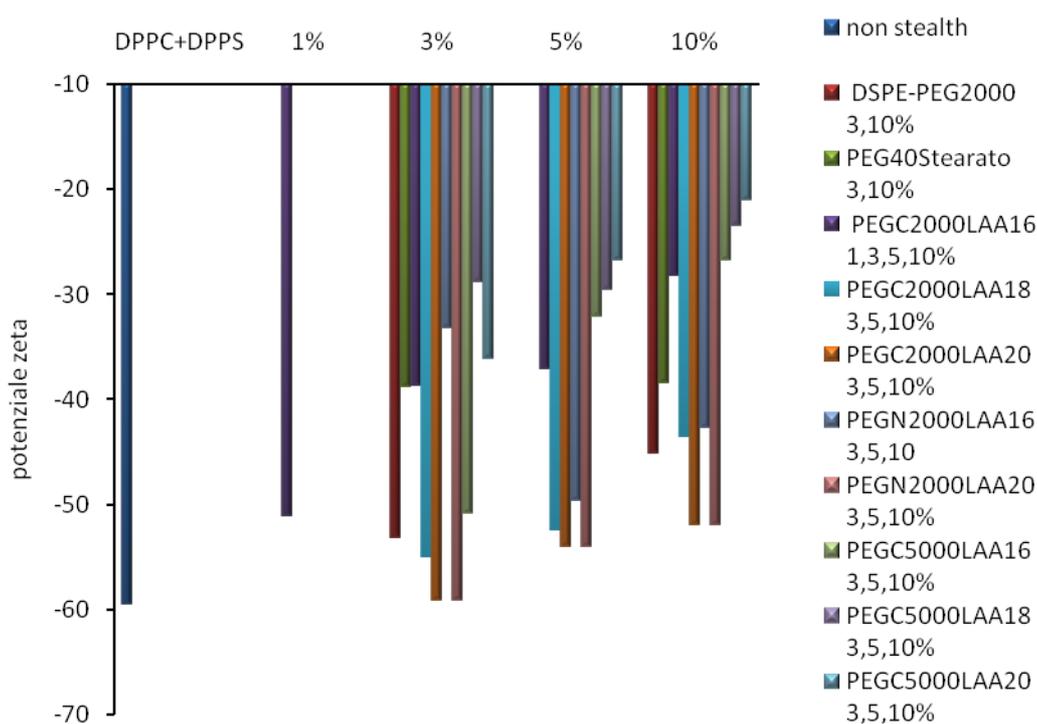


Figura 4.1: Andamento del potenziale Zeta di MLV stealth contenenti PEGCLAA, PEGNLAA, DSPE-PEG e PEG40stearato a diverse concentrazioni molari

4.1.2 Valutazione *in vitro*

4.1.2.1 Misure di attivazione del complemento (CH50 assay)

L'effetto protettivo dei coniugati PEGC₂₀₀₀LAA18 e PEGC₅₀₀₀LAA18, è stato esaminato *in vitro* attraverso il test emolitico CH50. In tale esperimento, se eritrociti sensibilizzati di pecora vengono a contatto con le proteine del complemento nel siero umano, sarà attivata la via classica del complemento, causando la lisi degli eritrociti ed il rilascio di emoglobina. Quando il siero umano è a contatto con nanoparticelle attivanti, si verifica l'opsonizzazione delle stesse e nel siero saranno disponibili un minor numero di proteine capaci di provocare la lisi degli eritrociti, determinando la diminuzione di unità CH50.

Il consumo di unità CH50 è stato misurato ad una quantità fissa di siero umano in presenza di una crescente area superficiale delle particelle. La Figura 4.2 mostra il comportamento degli MLV rivestiti con PEGC_{2000/5000}LAA18 e DSPE-PEG₂₀₀₀.

I dati ottenuti dal test emolitico CH50 hanno rivelato che a seguito del contatto delle particelle rivestite con i coniugati PEG-LAA con siero umano non si ha una risposta immunitaria significativa nell'intervallo delle superfici studiate (0-350 cm²). Nonostante questi vettori presentino dimensioni uguali o maggiori a 200 µm, essi possono essere considerati deboli attivatori del sistema del complemento. Infatti, il consumo non è mai stato superiore al 10% nell'intervallo di superficie studiato (0-350 cm²).

Questi risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti usando il DSPE-PEG₂₀₀₀ commerciale, anch'esso debole attivatore del sistema del complemento. Infatti, come noto dalla letteratura l'aggiunta di derivati anfifilici del PEG nella preparazione di vescicole liposomiali aumenta la ritenzione delle vescicole nel sangue (*Zhang et al., 2010*).

In tutti e tre i casi si può notare che la presenza di queste sostanze tensioattive ha fortemente ridotto la repulsione sterica delle forze di Van der Waals tra le particelle e le proteine, assicurando così una maggiore stabilità alle nanoparticelle. Infatti, come Bradley e coll. hanno dimostrato in uno

studio precedente, questa debole attivazione del sistema del complemento potrebbe essere dovuta alla presenza della nuvola idrofila del PEG sulla superficie delle particelle (Bradley *et al.*, 1998). Inoltre, la repulsione sterica esercitata dalle catene del PEG nei confronti delle opsonine ostacola il riconoscimento dei macrofagi del sistema immunitario (Moghimi *et al.*, 2003).

Come riportato prima, questo effetto *stealth* dipende sia dalla lunghezza della catena polimerica che dalla densità superficiale del polimero. In questa analisi le vescicole liposomiali sono state modificate con derivati del PEG con peso molecolare 2000 e 5000 Da. Nonostante il derivato PEGC₅₀₀₀LAA18 presenti una catena di PEG più lunga, in grado perciò di garantire un migliore rivestimento delle vescicole, i due coniugati hanno mostrato la stessa efficienza di mascheramento della superficie liposomiale.

Questo risultato è in accordo con lo studio condotto da Jeon e coll., i quali hanno dimostrato che la densità di superficie del PEG ha un maggiore effetto sulla repulsione sterica rispetto alla lunghezza della catena (Jeon *et al.*, 1991).

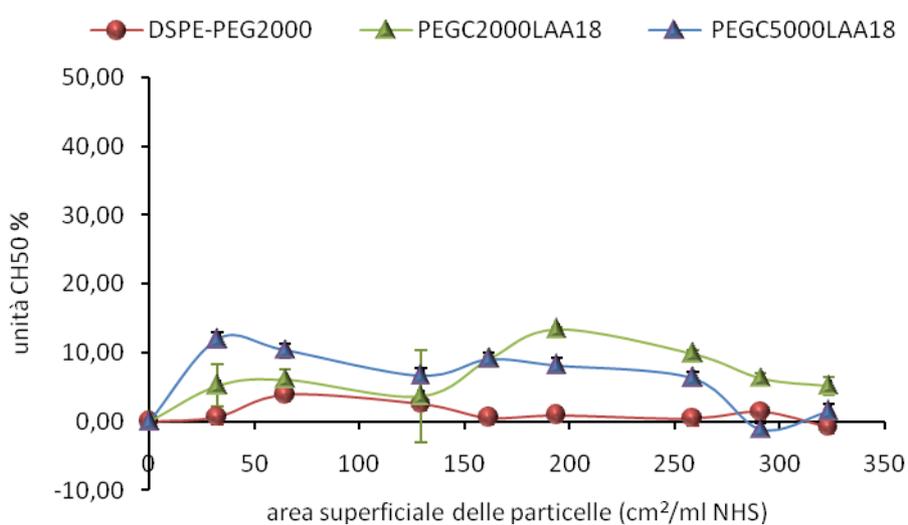


Figura 4.2: Influenza del PEGC_{2000/5000}LAA18 e del DSPE-PEG₂₀₀₀ sull'attivazione del sistema del complemento (CH50)

4.1.2.2 Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale su cellule J-774

I risultati ottenuti dalle prove di incubazione con le cellule J-774 delle vescicole liposomiali, marcate con rodamina-DHPE, hanno permesso di valutare la capacità di questi liposomi di sfuggire all'*uptake* macrofagico.

Un'analisi qualitativa delle immagini ottenute con il microscopio a fluorescenza ha evidenziato come l'*uptake* cellulare sia marcatamente influenzato dalle caratteristiche di superficie dei liposomi. Infatti, dopo incubazione con i liposomi costituiti solo da DPPC (*non-stealth*), le cellule hanno mostrato una significativa fluorescenza citoplasmatica (Figura 4.3A-C).

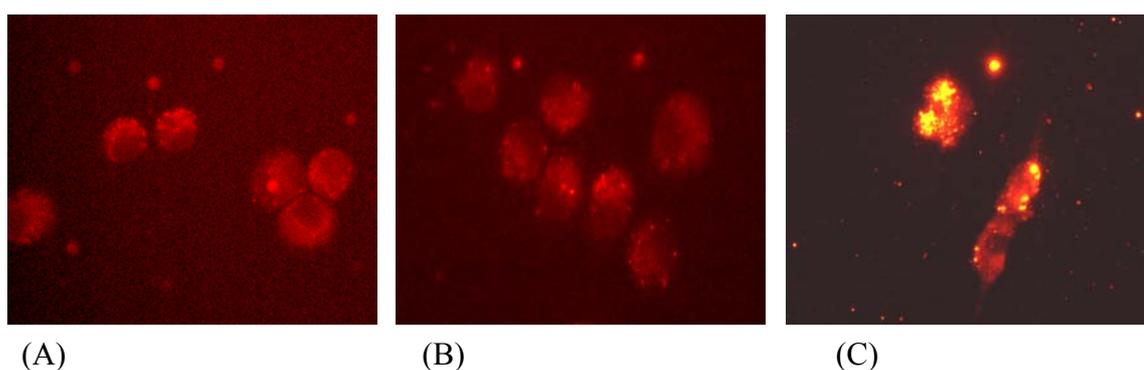


Figura 4.3: Immagine microscopica di cellule J774 (A) non trattate (controllo negativo) (40 x), (B) incubate con liposomi a base di DPPC (formulazione base) (40 x), (C) incubate con liposomi a base di DPPC caricati con rodamina-DHPE (20 x).

L'aggiunta dei derivati del PEG durante la formazione dei liposomi, invece, ha contribuito a ridurre l'internalizzazione cellulare. Da un esame qualitativo delle immagini si evince che l'aggiunta di DSPE-PEG₂₀₀₀ ha confermato la capacità dei liposomi di evitare l'*uptake* macrofagico; infatti, in queste colture la fluorescenza dovuta al marcante è visibile esclusivamente nel medium extracellulare (Figura 4.4B). Al contrario, nelle immagini relative ai liposomi prodotti con i coniugati PEG-LAA è possibile notare la presenza di qualche spot fluorescente anche all'interno delle cellule. Lo studio ha comunque mostrato che l'internalizzazione di questi liposomi è considerevolmente ridotta rispetto a quella delle vescicole "nude" (Figura 4.4C-F e 4.5 A-B).

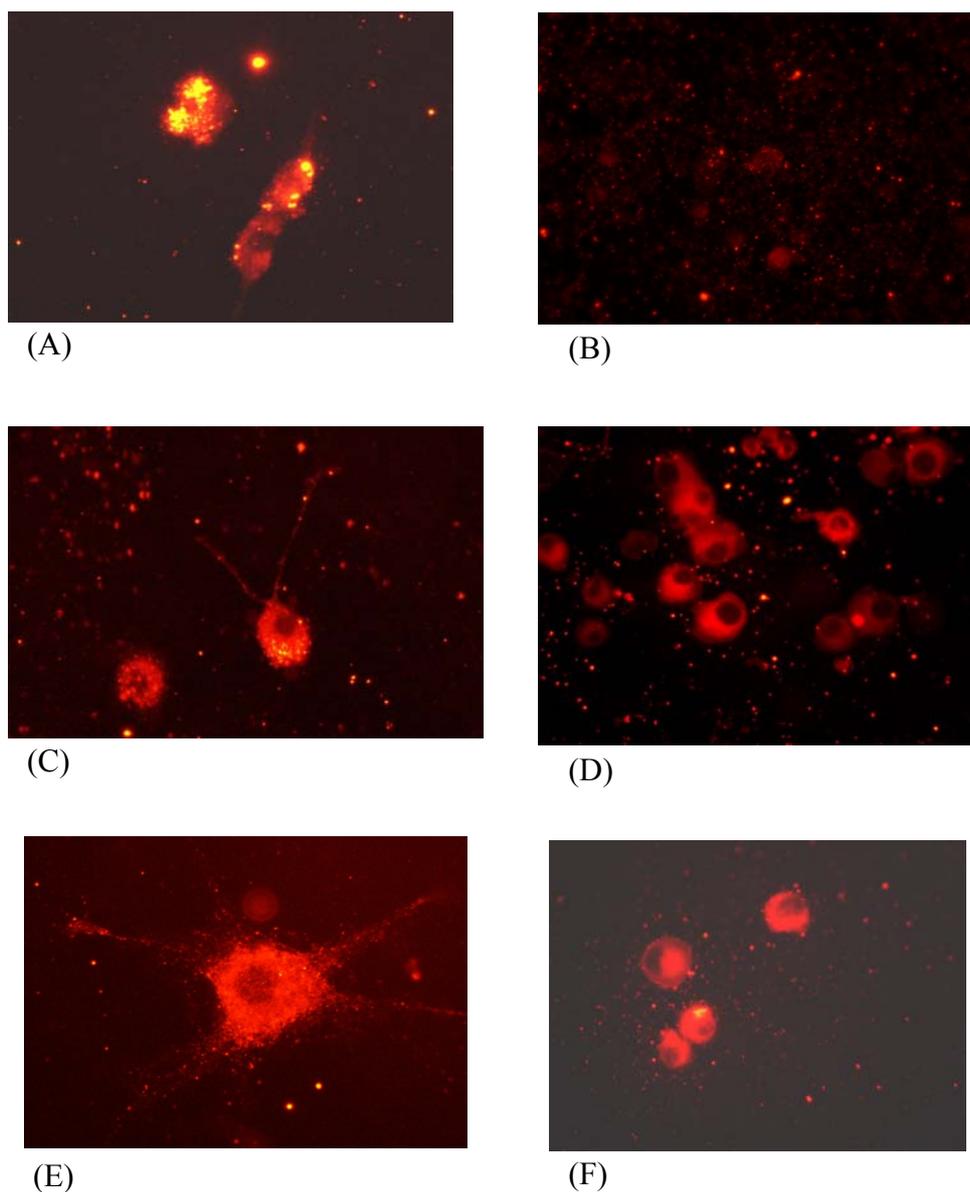


Figura 4.4: Immagine microscopica di cellule J774 incubate con: (A) liposomi a base di DPPC caricati con rodamina-DHPE (20 x), (B) liposomi a base di DPPC con il 5% di DSPE-PEG₂₀₀₀ e caricati con rodamina-DHPE (40 x), (C) liposomi a base di DPPC con il 5% di PEGC₂₀₀₀LAA16 e caricati con rodamina-DHPE (20 x), (D) liposomi a base di DPPC con il 3% di PEGC₂₀₀₀LAA18 e caricati con rodamina-DHPE (20 x), (E) liposomi a base di DPPC con il 5% di PEGC₂₀₀₀LAA20 e caricati con rodamina-DHPE (40 x), (F) liposomi a base di DPPC con 10% mPEG₂₀₀₀C-LAA18 e caricati con rodamina-DHPE (40x)

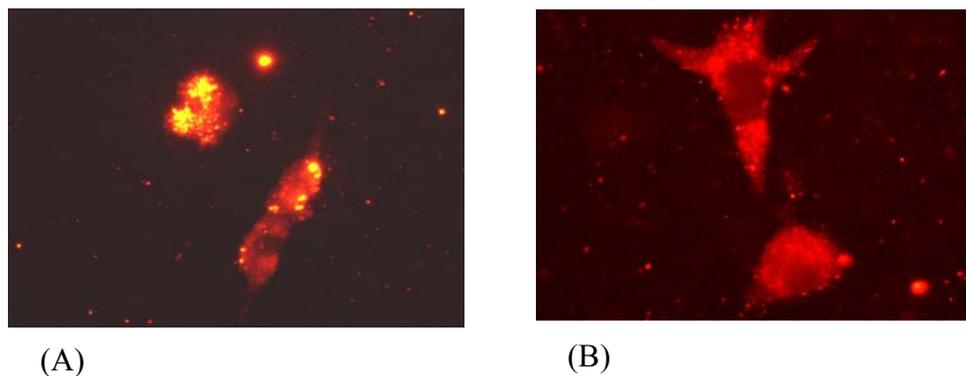


Figura 4.5 Immagine microscopica di cellule J774 incubate con: (A) liposomi a base di DPPC caricati con rodamina-DHPE (20 x), (B) liposomi a base di DPPC e caricati con il 5% di PEGN₂₀₀₀LAA16 rodamina-DHPE (0,24%) (20 x)

Le immagini “manipolate” graficamente, e mostrate in Figura 4.6A-D, permettono di evidenziare con maggiore chiarezza la presenza dei nuclei di rodamina-DHPE (in blu) o dei liposomi intatti che la contengono, fagocitati dalle cellule.

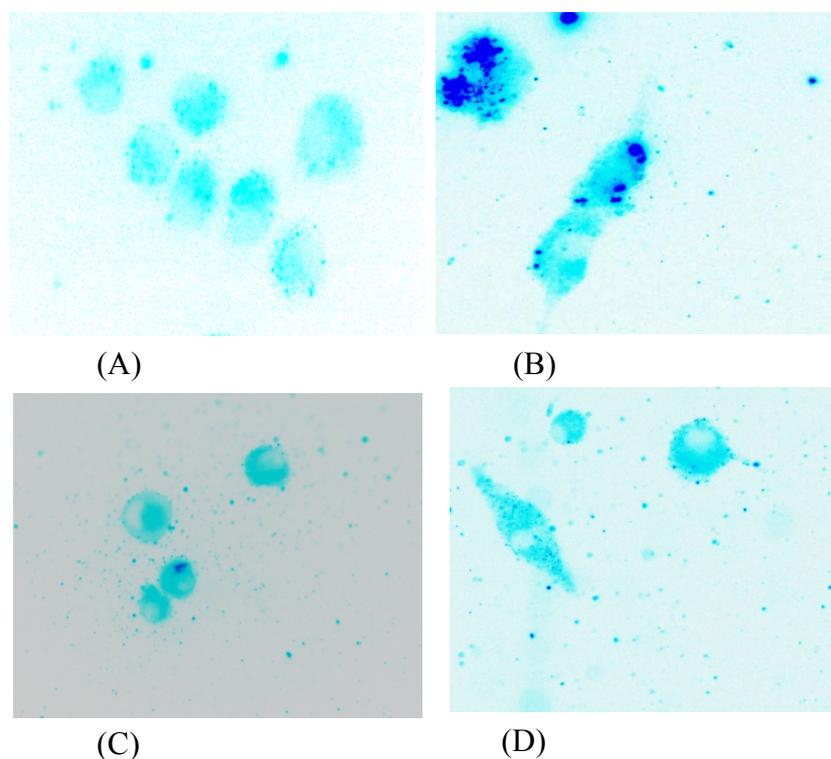


Figura 4.6: Elaborazione grafica (inversione) di microfotografie di cellule J774 incubate con liposomi non stealth (A), non stealth contenenti rodamina-DHPE (B) e stericamente stabilizzati con il 5% di PEGN₂₀₀₀LAA16 (C) o con il 10% di PEGC₂₀₀₀LAA18 e caricati con rodamina-DHPE (D)

4.1.2.3 Studi di *uptake* cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1

Il grado di internalizzazione cellulare dei diversi coniugati è stato anche valutato su cellule THP-1 mediante citofluorimetria di flusso (FACS), che ha dato una stima quantitativa della capacità delle vescicole liposomiali di sfuggire all'*uptake* macrofagico. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C per studiare l'*uptake* cellulare e a 4 °C per valutare la presenza di processi non ATP-dipendenti o eventuali interazioni tra i coniugati e la membrana plasmatica. Nelle Figure 4.7 e 4.8 sono riportati rispettivamente i grafici relativi all'*uptake* cellulare a 37 e a 4°C su cellule THP-1 espressi in funzione della quantità di fluorescenza della molecola DiI misurata.

Gli esperimenti di citofluorimetria condotti a 37°C dimostrano che esiste una relazione fra il grado di internalizzazione dei liposomi e la presenza di molecole di PEG in superficie. Infatti, dal grafico si vede chiaramente che il valore di fluorescenza relativo agli MLV ricoperti dal DSPE-PEG₂₀₀₀ commerciale è più alto, anche se di poco, di quello relativo agli MLV modificati con il coniugato PEGC₂₀₀₀LAA18, che quindi vengono internalizzati meno velocemente. Si nota, inoltre, che le vescicole ricoperte dal coniugato PEGC₅₀₀₀LAA18 presentano un *uptake* maggiore rispetto a quelle modificate con il coniugato PEGC₂₀₀₀LAA18 e il DSPE-PEG₂₀₀₀ commerciale.

Diversa è la situazione che si osserva per gli MLV modificati con il 10% dei derivati amminici PEGN₂₀₀₀LAA20 e PEGN₅₀₀₀LAA20 che hanno riportato valori di fluorescenza rispettivamente pari a 50 e 140%, dimostrando una scarsa efficienza di mascheramento degli MLV in presenza dei macrofagi THP-1, che quindi fagocitano queste particelle più velocemente. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato dalla differente struttura chimica del PEGNLAA rispetto a quella del PEGCLAA, che presenta alla sua estremità un metossile, mentre il derivato PEGNLAA un gruppo NH₂ libero.

Gli esperimenti sono stati condotti anche a 4°C e i risultati sono riportati nella Figura 4.8. In questo caso l'internalizzazione di tutte le vescicole MLV è ridotta al minimo, con soltanto piccole differenze fra l'una e l'altra. Anche fra i diversi coniugati le differenze di fluorescenza associata alle

cellule registrate sono minime. Si può affermare dunque, che l'*uptake* dei coniugati avviene con un meccanismo ATP-dipendente, perché quando tutti i processi ATP-dipendenti sono bloccati, come nel caso delle prove a basse temperature, i liposomi non entrano nelle cellule. Il lieve aumento di fluorescenza registrato è dovuto solo a interazioni dei coniugati con la membrana plasmatica delle cellule.

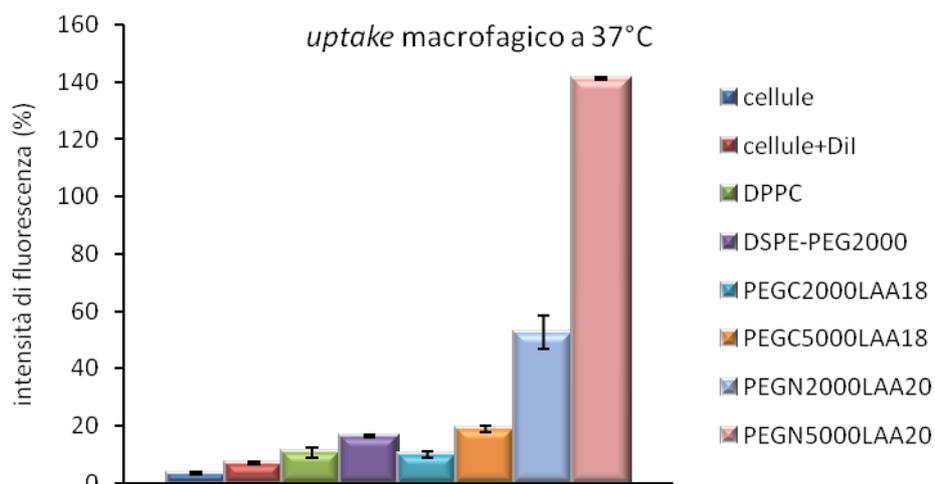


Figura 4.7: Valutazione dell'*uptake* macrofagico di MLV "nudi" e modificati con PEG-LAA, DSPE-PEG₂₀₀₀ dopo 90 min di incubazione con cellule THP-1 a 37°C

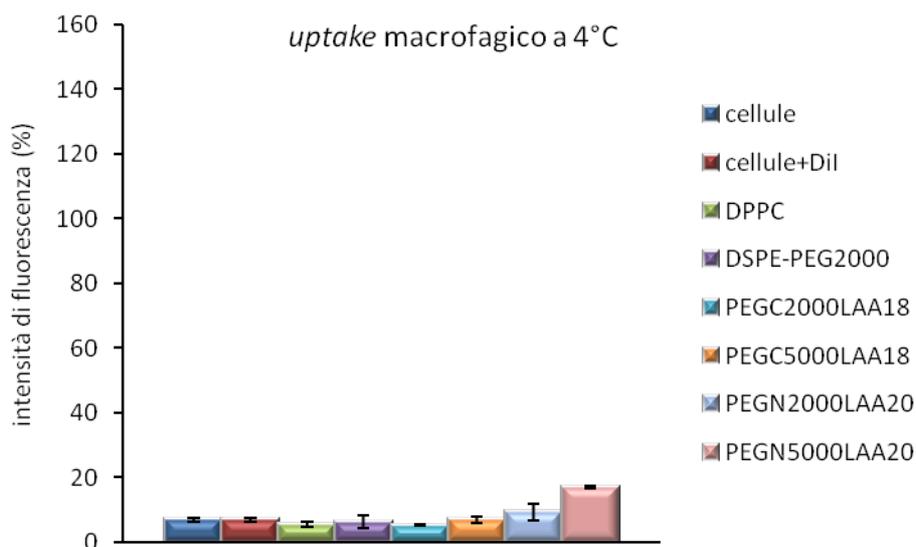


Figura 4.8 : Valutazione dell'*uptake* macrofagico di MLV "nudi" e modificati con PEG-LAA, DSPE-PEG₂₀₀₀ dopo 90 min di incubazione con cellule THP-1 a 4°C

4.1.3 Valutazione *in vivo*

4.1.3.1 Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione

Per spiegare la correlazione tra la debole risposta immunitaria misurata tramite il test CH50 e il tempo di circolazione delle vescicole liposomiali nel sangue sono stati condotti studi farmacocinetici delle stesse. Gli esperimenti sono stati effettuati su topi Swiss, iniettando nella vena caudale le sospensioni degli MLV peghilati e non, ed eseguendo i prelievi a livello oculare e cardiaco. La Figura 4.9 riporta la permanenza nel sangue degli MLV di DPPC e degli MLV peghilati con il DSPE-PEG₂₀₀₀ e il PEGC₂₀₀₀LAA18 che hanno dato i migliori risultati. I principali parametri farmacocinetici studiati sono riportati in tabella 4.1. In particolare sono stati calcolati: il $t_{50\%}$, che rappresenta il tempo necessario affinché la concentrazione plasmatica si riduca del 50%; il $t_{1/2 \alpha}$ e il $t_{1/2 \beta}$, che rappresentano l'emivita plasmatica dei processi di distribuzione e di eliminazione; l'AUC relativa (area sottesa alla curva di concentrazione *versus* il tempo) rispetto a quella degli MLV di DPPC.

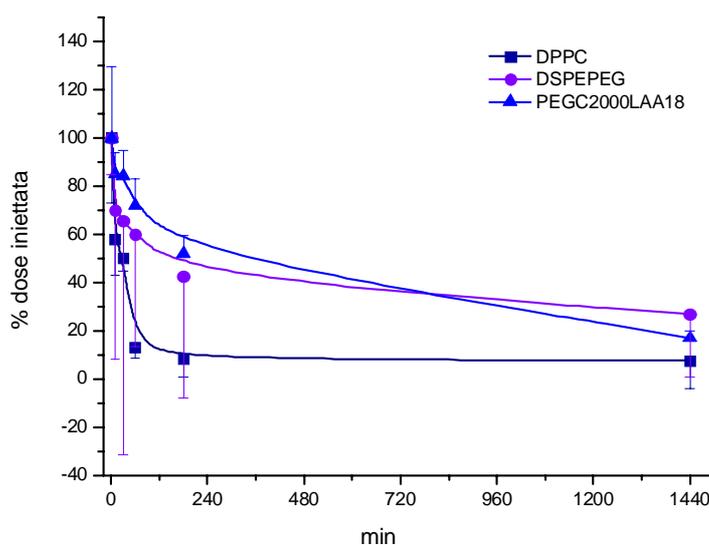


Figura 4.9: Permanenza nel sangue di MLV di DPPC e MLV rivestiti con PEG-LAA, DSPE-PEG₂₀₀₀ in topi Swiss

I campioni di sangue sono stati prelevati a 1, 10, 30 min, 1, 3 e 24 ore dopo la loro somministrazione endovenosa. La concentrazione dei liposomi nel sangue è proporzionale all'intensità di fluorescenza del DiI utilizzato come probe lipofilo.

Tabella 4.1: Profilo farmacocinetico di MLV di DPPC e di MLV ricoperti con il DSPE-PEG₂₀₀₀, il PEGCLAA e il PEGNLAA, seguendo la somministrazione sistemica in topi Swiss

Composizione	$t_{50\%}$ (h)	$t_{1/2 \alpha}$ [0-3h](h)	$t_{1/2 \beta}$ [0-24h](h)	AUC _[0-3h]	AUC _[0-24h]
DPPC	0.6	1.2	14.55	1	1
DSPE-PEG ₂₀₀₀	2.5	9.88	9.65	1.58	1.85
PEGC ₂₀₀₀ LAA18	3.5	3.71	10.23	1.97	1.94
PEGC ₅₀₀₀ LAA18	1.6	3.08	5.68	1.4	1.38
PEGN ₂₀₀₀ LAA20	1.5	1.91	8.6	1.38	1.51
PEGN ₅₀₀₀ LAA20	1.6	1.85	11.41	1.24	1.29

I risultati ottenuti dopo somministrazione a topi Swiss dimostrano che tutti i liposomi peghilati, presentano un'emivita plasmatica ($t_{50\%}$) maggiore rispetto a quella degli MLV non peghilati, con valori che passano da 3.5 h per le vescicole con il PEGC₂₀₀₀LAA18 a 2.5 h per quelli con il DSPE-PEG₂₀₀₀ fino a 1.5 h per gli MLV con il PEGN₂₀₀₀LAA20.

Tuttavia non si osserva una correlazione con i valori di $t_{1/2 \beta}$, perchè si passa da 14.55 h per gli MLV di DPPC a 9.65 h per i liposomi peghilati con il DSPE-PEG fino a 5.68 h per quelli con il PEGC₅₀₀₀LAA18.

Diversamente da quanto ci aspettavamo, gli MLV peghilati con PEGC₅₀₀₀LAA18 sono eliminati dal sangue più velocemente. Questo comportamento può essere giustificato dal fatto che la densità delle catene di PEG o la loro conformazione giocano un ruolo più importante che la lunghezza della catena. Così, probabilmente, catene più lunghe non garantiscono necessariamente un migliore mascheramento della superficie delle particelle.

Diversi dati sono stati ottenuti per i coniugati PEGNLAA che hanno un'emivita plasmatica ($t_{50\%}$) più breve rispetto agli altri derivati PEGCLAA, ma in ogni caso più lunga degli MLV di DPPC. Tale effetto è probabilmente da ascrivere alla diversa struttura chimica dei due coniugati PEGNLAA_{2000/5000}, che sono derivati amminici del PEG, rispetto a quella dei derivati carbossilici PEGCLAA_{2000/5000}.

4.1.3.2 Efficienza di intrappolamento del paclitaxel

I risultati dell'analisi HPLC hanno mostrato che la quantità di PTX incapsulata negli MLV peghilati con il 10% di PEGC₂₀₀₀LAA18 e di DSPE-PEG₂₀₀₀ è stata dell'ordine del 73,56% e del 72,54% rispettivamente, contro il 58,93% degli MLV non modificati. Pertanto si può desumere che la peghilazione in qualche modo ha influenzato la capacità di *loading* delle particelle.

4.1.3.3 Esperimenti di crescita tumorale

La capacità di questi liposomi di raggiungere uno specifico sito tumorale per effetto EPR, è stata valutata su un modello di gliosarcoma di cellule 9L di ratto. I liposomi MLV caricati con il PTX sono stati somministrati per via endovenosa dopo che il tumore ha raggiunto un volume di 100 mm³.

Lo studio è stato condotto su tre gruppi di animali, che sono stati separati in maniera random per ridurre le differenze di peso e di dimensione del tumore all'interno di ciascun gruppo. La Figura 4.10 riporta gli effetti del PTX incapsulato nei liposomi sulla crescita del gliosarcoma sottocutaneo.

Una volta che la massa tumorale ha raggiunto un volume di 100 mm³, gli animali sono stati trattati con le diverse formulazioni liposomiali di PTX.

I dati ottenuti dal gruppo trattato con gli MLV di DPPC mostrano che la massa tumorale cresce in modo significativo fino a un volume di 5000 mm³ (25 giorni dopo l'iniezione). Un

comportamento diverso si verifica per gli MLV modificati con il PEGC₂₀₀₀LAA18, che causano una più lenta progressione della massa tumorale (1500 mm³). Questi risultati sono interessanti se paragonati a quelli ottenuti dopo somministrazione degli MLV modificati con il DSPE-PEG₂₀₀₀, perché presentano gli stessi profili di efficacia terapeutica degli MLV con il PEGC₂₀₀₀LAA18, in grado quindi di mantenere l'attività citostatica del PTX a livello del sito *target* e rallentare in tal modo la crescita tumorale fino a un volume di 1600 mm³ dopo 25 giorni.

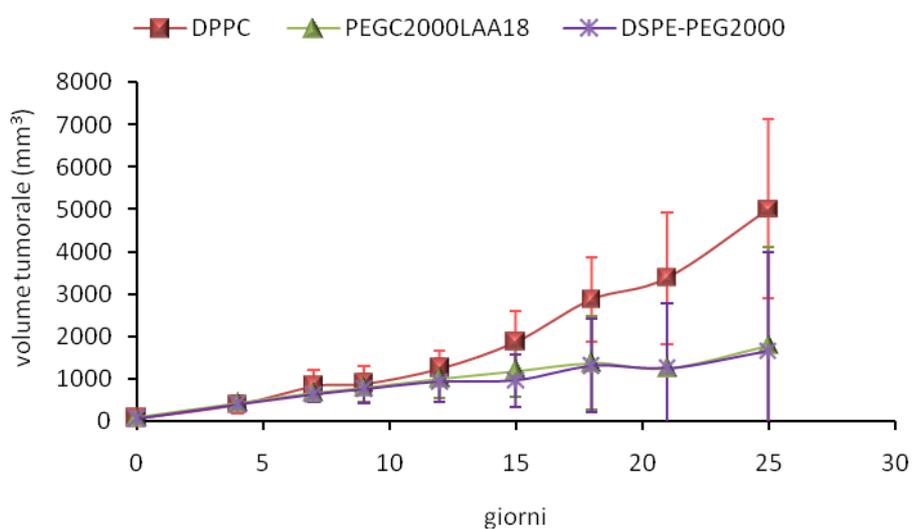


Figura 4.10: Effetti in vivo del trattamento di MLV di DPPC e MLV modificati con il PEGC₂₀₀₀LAA18 e il DSPE-PEG₂₀₀₀ caricati con PTX sulla crescita di cellule 9L di glioma impiantate sottocutaneamente in ratti Fisher

4.2 SLN

4.2.1 Caratterizzazione chimico-fisica

4.2.1.1 Analisi dimensionale

Le SLN preparate sono state sottoposte a prove di stabilità nel tempo utilizzando, come parametri di riferimento, il diametro medio delle particelle e l'indice di polidispersione misurati tramite l'ausilio della spettroscopia di fotocorrelazione.

In precedenti lavori, effettuati dal nostro gruppo di ricerca (*Stancampiano et al., 2006; 2008*) era già stata valutata l'applicabilità della metodica di preparazione utilizzata e la stabilità delle SLN non *stealth*, pertanto, per questo studio è stata scelta una delle formulazioni che ha evidenziato le migliori caratteristiche.

L'indice di polidispersione in tutti i sistemi analizzati è risultato abbastanza basso a conferma della loro omogeneità dimensionale.

Nelle Figure 4.11 e 4.12 vengono riportate le dimensioni medie e l'indice di polidispersione delle SLN non *stealth* che, dopo 6 mesi di conservazione a temperatura ambiente, si mantengono stabili senza subire significative variazioni.

Come detto prima, una problematica di questi sistemi è il loro rapido riconoscimento da parte del sistema immunitario, per cui, allo scopo di eludere tali difese ed incrementare il loro tempo di emivita plasmatica, sono stati sviluppati dei nanovettori *stealth*.

Come agenti *stealth*, per questo studio, sono stati utilizzati, oltre ai polimeri commerciali quali DSPE-PEG₂₀₀₀, PEG 40 monostearato e due coniugati del PEG con i LAA (PEGC₂₀₀₀LAA18 e PEGC₅₀₀₀LAA18).

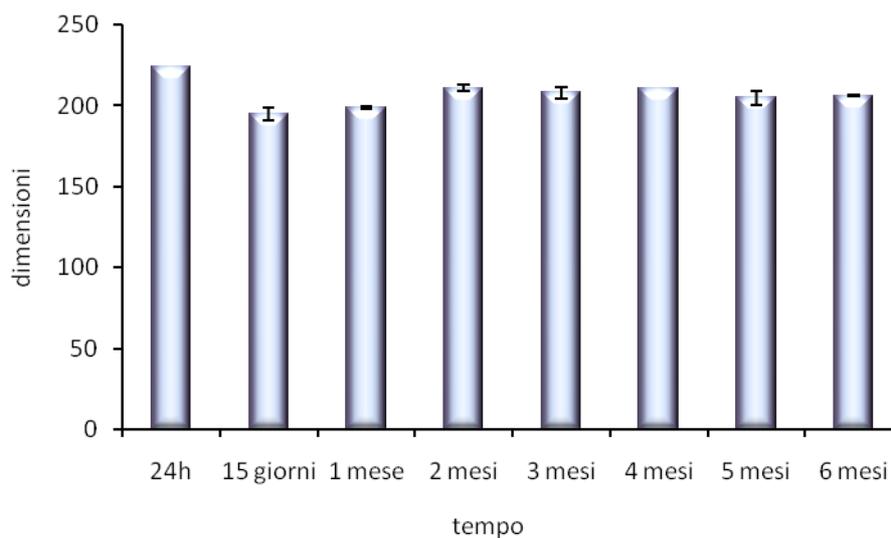


Figura 4.11: Stabilità nel tempo delle SLN non stealth

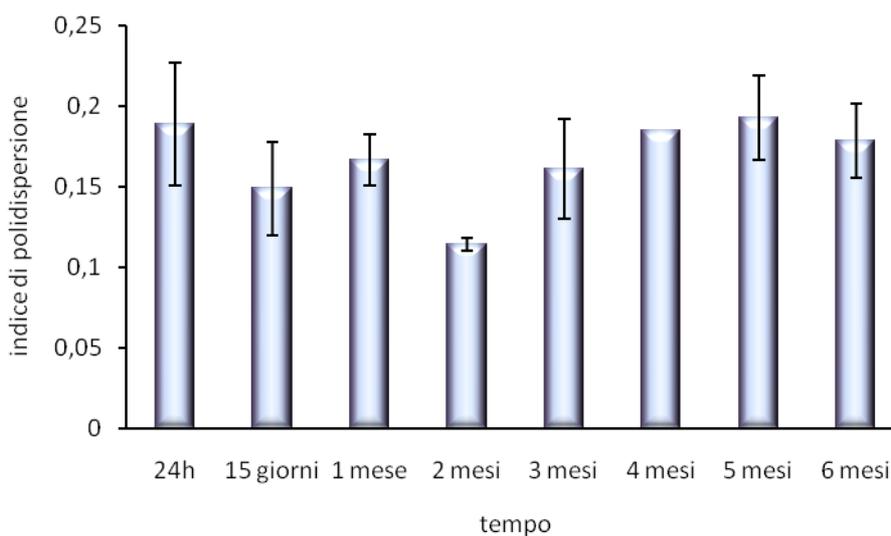


Figura 4.12: Indice di polidispersione delle SLN non stealth

I risultati evidenziano che le SLN preparate utilizzando DSPE-PEG₂₀₀₀, hanno dimensioni medie che diminuiscono man mano che aumenta la percentuale di agente *stealth* introdotta (Figura 4.13 e 4.14).

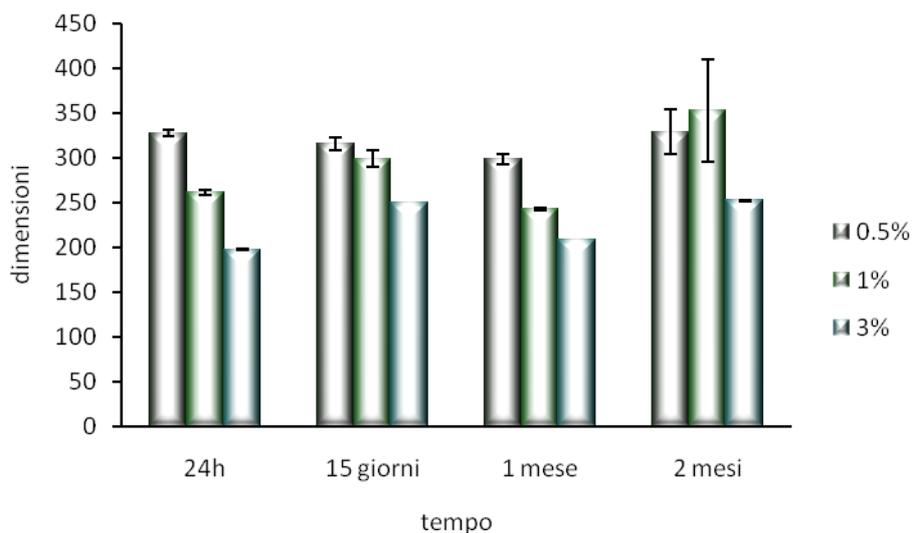


Figura 4.13: Stabilità nel tempo delle SLN preparate con DSPE-PEG₂₀₀₀

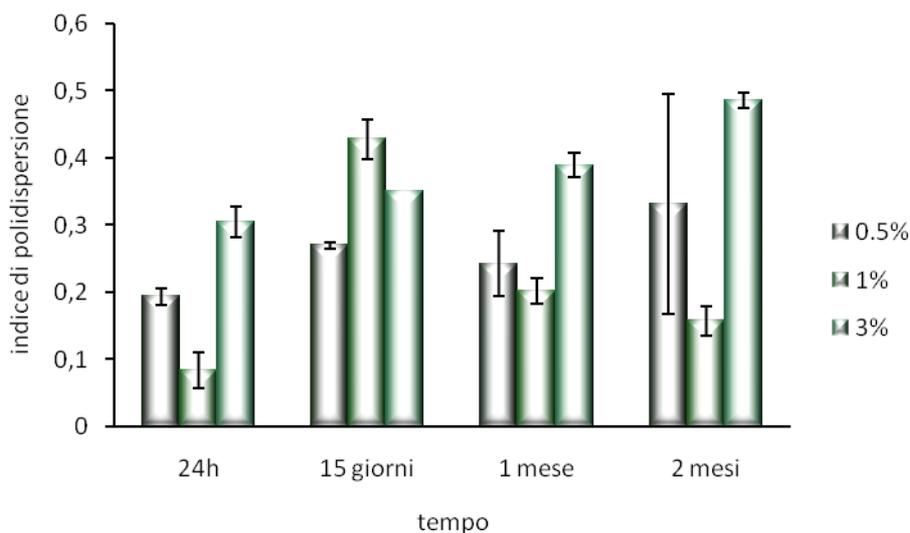


Figura 4.14: Indice di polidispersione delle SLN preparate con DSPE-PEG₂₀₀₀

Per quanto riguarda il PEG 40 monostearato, si osserva che, se esso è presente a concentrazioni dello 0.5% e 3%, le dimensioni medie sono leggermente superiori a quelle che si ottengono quando il polimero è presente all'1% (Figure 4.15 e 4.16).

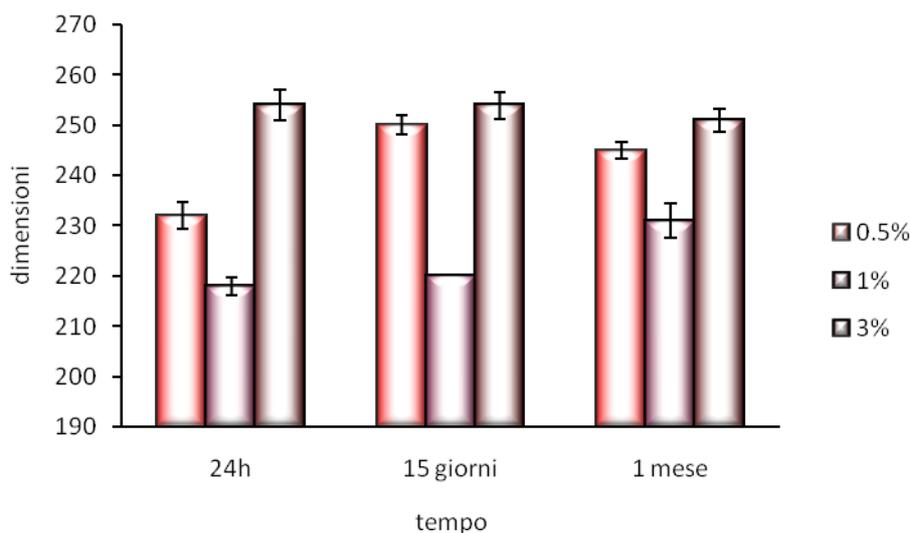


Figura 4.15: Stabilità nel tempo delle SLN preparate con PEG 40 monostearato

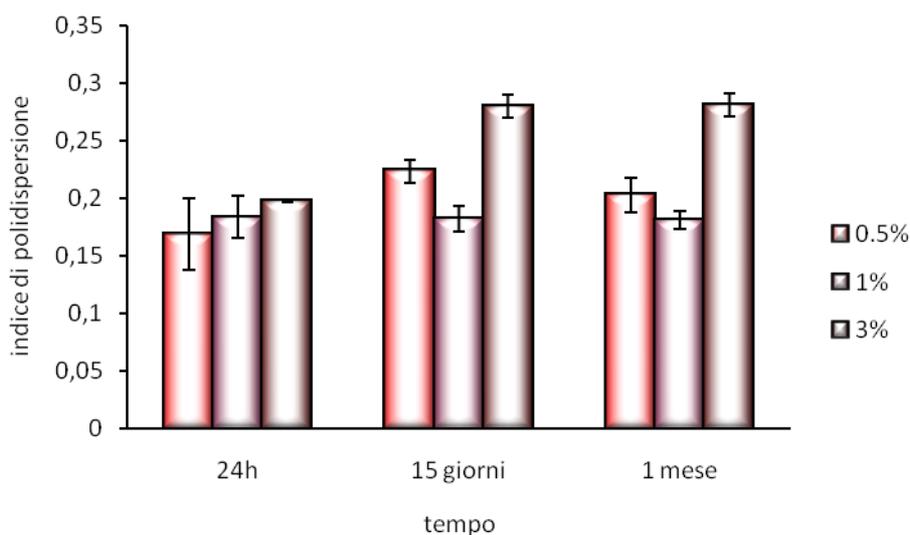


Figura 4.16: Indice di polidispersione delle SLN preparate con PEG 40 monostearato

L'incorporazione dei derivati anfifilici, a diversa concentrazione (0.5%, 1% e 3%), utilizzati per la preparazione dei *carrier stealth* comporta sia per il PEGC₂₀₀₀LAA18 che per il PEGC₅₀₀₀LAA18 una evidente riduzione del diametro medio delle particelle nei sistemi a più alta concentrazione (3%), ciò potrebbe essere attribuito al fatto che tali polimeri si dispongono nel sistema come un agente tensioattivo (Figure 4.17-4.20).

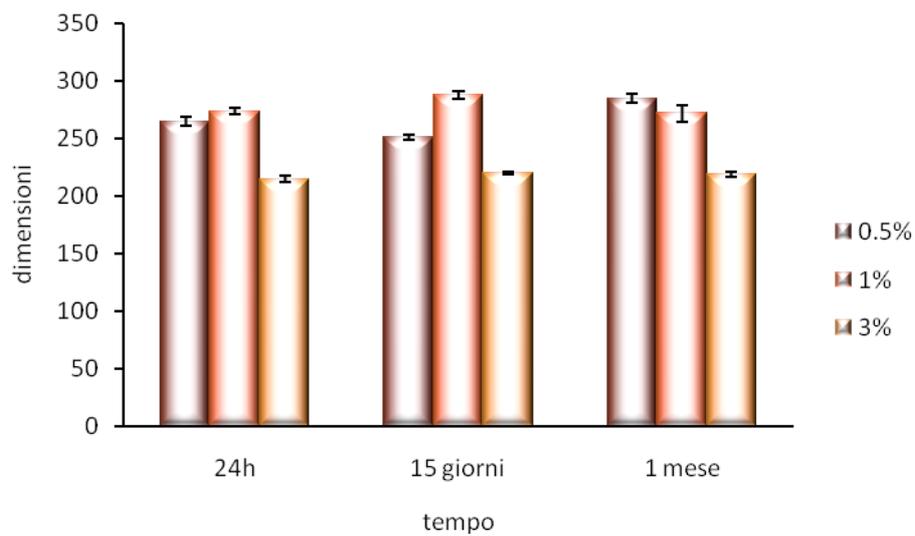


Figura 4.17: Stabilità nel tempo delle SLN preparate con PEGC₂₀₀₀LAA18

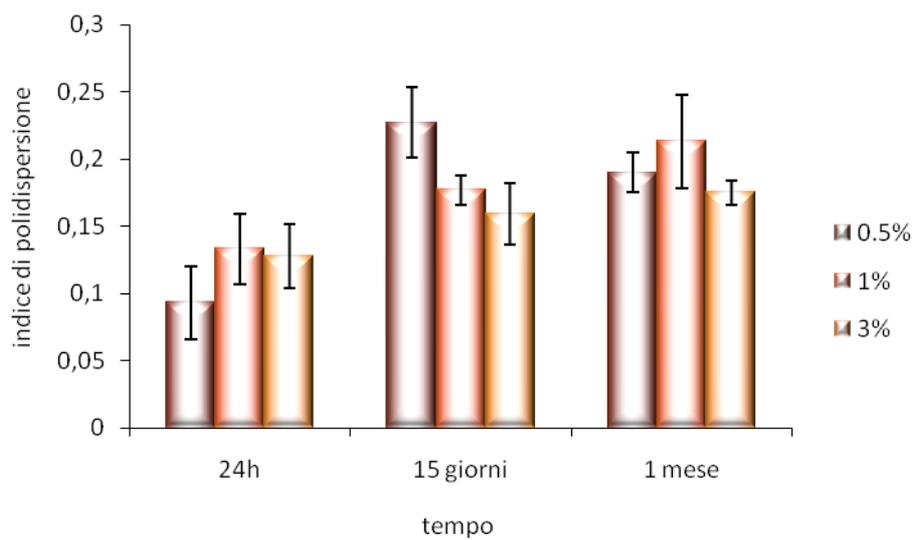


Figura 4.18: Indice di polidispersione delle SLN preparate con PEGC₂₀₀₀LAA18

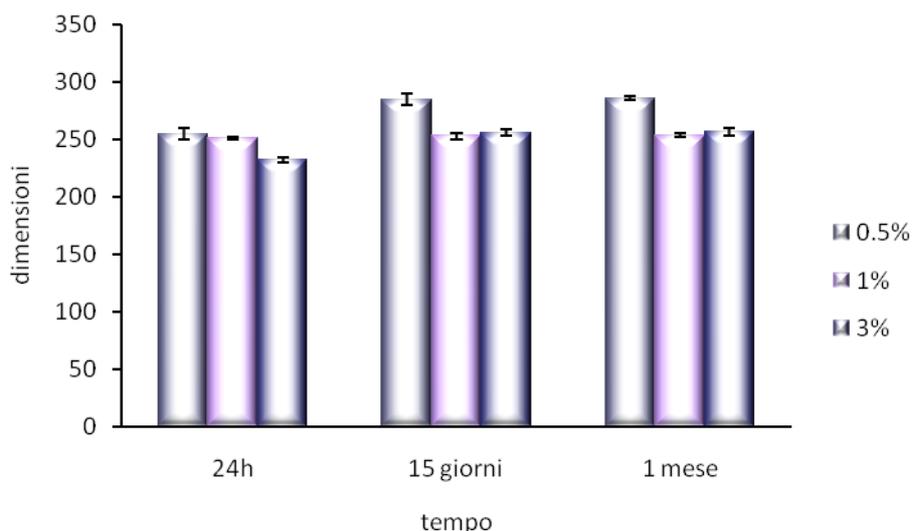


Figura 4.19: Stabilità nel tempo delle SLN preparate con PEGC₅₀₀LAA18

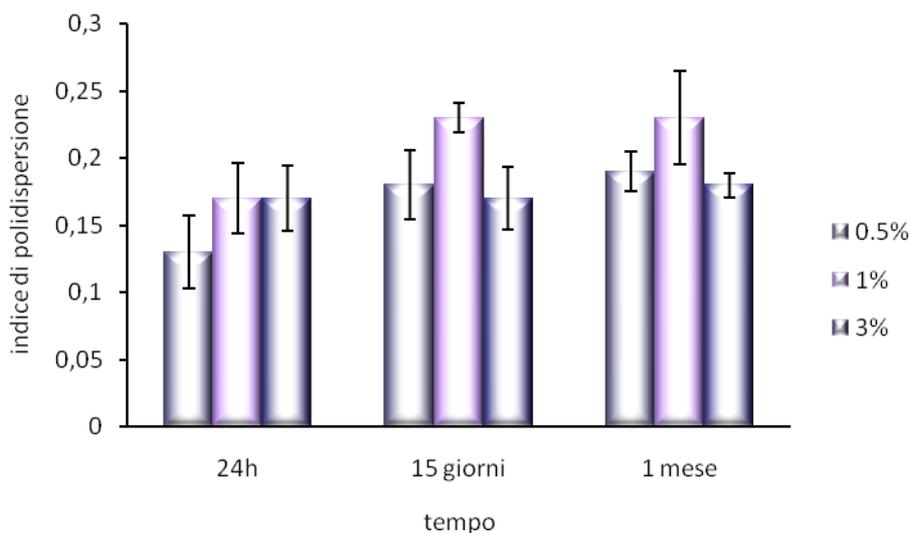


Figura 4.20: Indice di polidispersione delle SLN preparate con PEGC₅₀₀LAA18

4.2.2 Determinazione del potenziale Zeta

I risultati ottenuti con i nostri sistemi richiedono ulteriori studi per una valutazione più completa. Comunque, dalle misure preliminari eseguite emerge che, in accordo ai dati riportati in letteratura, i valori delle SLN *stealth* contenenti DSPE-PEG₂₀₀₀ diminuiscono leggermente rispetto alle SLN non peghilate. Tale effetto stabilizzante risulta ancora più evidente con il coniugato

PEGC₂₀₀₀LAA18 alla concentrazione dello 0.5% e del 3%. In tutti gli altri casi, si osserva invece un incremento nella carica superficiale; una probabile spiegazione potrebbe essere legata al fatto che il sistema subisca un riarrangiamento, in cui le catene idrofile del polimero si posizionano al contrario, portando verso l'esterno le molecole di acido stearico con conseguente aumento della carica superficiale negativa netta (Figura 4.21).

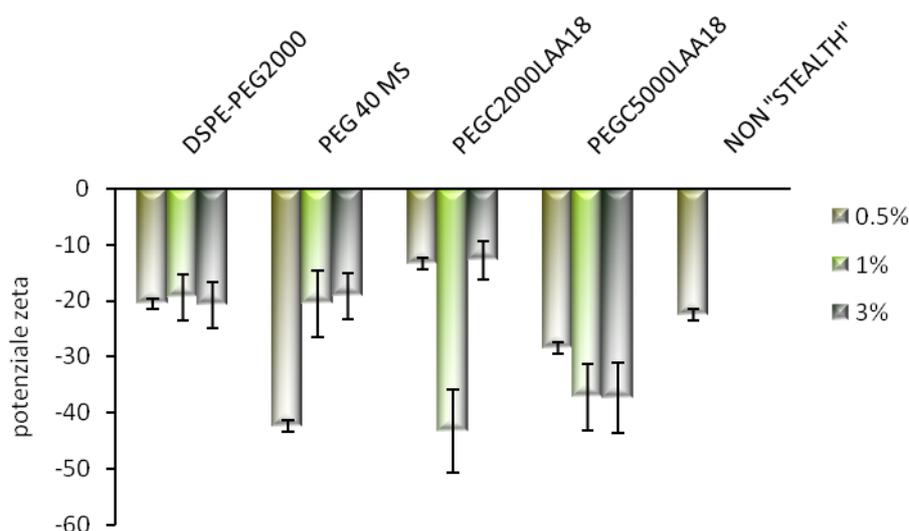


Figura 4.21: Potenziale zeta delle SLN stealth e non stealth

Queste analisi andranno comunque confermate, soprattutto utilizzando SLN preparate in presenza di altri tipi di coniugati PEG-LAA, per esempio ottenuti con LAA a differente lunghezza della catena alifatica laterale (LAA-16 o LAA-20) e con PEG a diverso peso molecolare. E' infatti possibile che una, seppure lieve, differenza di struttura nel polimero utilizzato possa modificare la sua strutturazione nella matrice delle nanoparticelle, e dunque il suo effetto di "mascheramento" della superficie delle SLN.

4.2.2.1 Studi di stabilità nel siero bovino

La stabilità delle SLN *stealth* e *non-stealth* è stata valutata in presenza di siero bovino e la variazione dimensionale delle particelle misurata prima e dopo la loro incubazione, seguendo l'esperimento per quattro ore (Tacheuchi et al., 2001). In generale, subito dopo incubazione con il siero in tutti i sistemi presi in esame si è osservato un decremento iniziale delle dimensioni; tale effetto potrebbe probabilmente essere attribuito al fatto che, mentre nel mezzo acquoso le catene di PEG, essendo fortemente idratate, si dispongono in modo più voluminoso all'esterno del *carrier*, in presenza di siero il volume di idratazione del polimero si attenua, con conseguente riduzione nel diametro delle SLN. Dai risultati ottenuti si osserva che le dimensioni delle particelle non *stealth* non subiscono significative variazioni dopo incubazione nel siero (Figura 4.22). In presenza dei polimeri, alle diverse concentrazioni (0.5%, 1% e 3%) si osserva invece una riduzione del diametro medio delle particelle dopo la terza-quarta ora di incubazione, probabilmente in seguito al fatto che il polimero inizia a staccarsi dal sistema. In particolare, questo effetto risulta più evidente nei sistemi contenenti il DSPE-PEG₂₀₀₀ e il PEG C₂₀₀₀LAA18 allo 0.5 e 1 % (Figure 4.23-4.26).

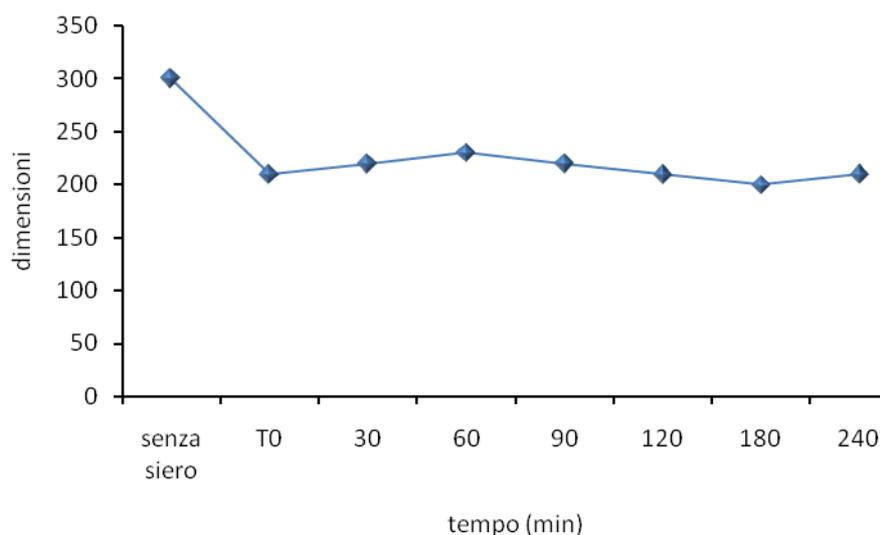


Figura 4.22: Variazione delle dimensioni medie di SLN non *stealth* dopo incubazione con siero bovino a 37°C

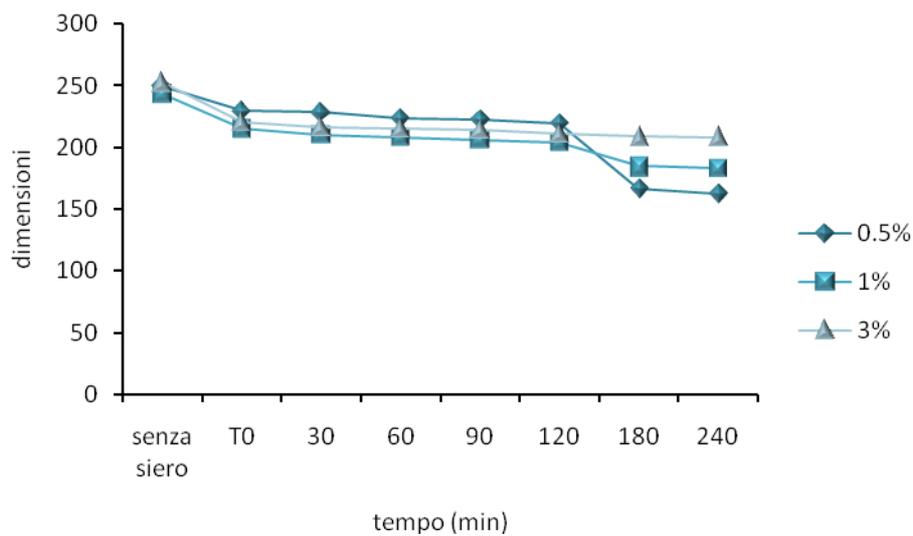


Figura 4.23: Variazione delle dimensioni medie di SLN con DSPE-PEG₂₀₀₀ dopo incubazione con siero bovino a 37°C

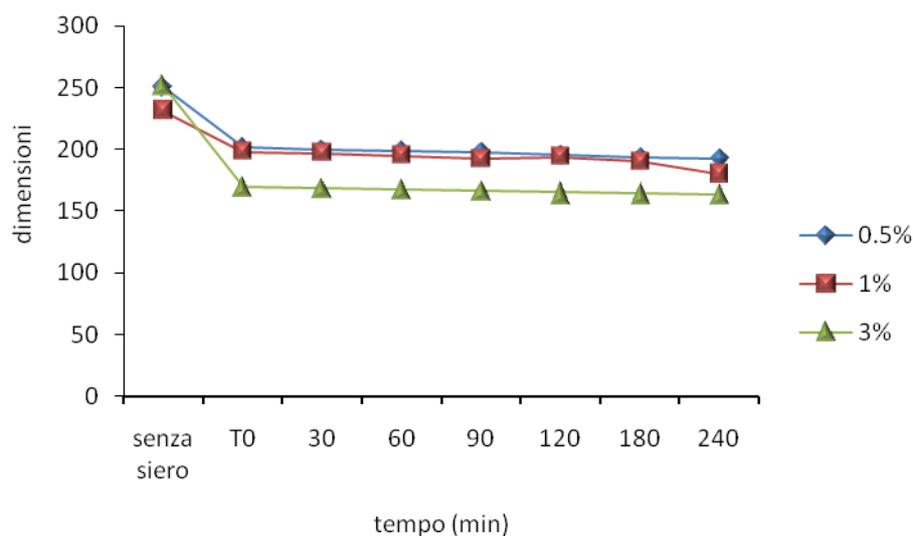


Figura 4.24: Variazione delle dimensioni medie di SLN con PEG 40 monostearato dopo incubazione con siero bovino a 37°C

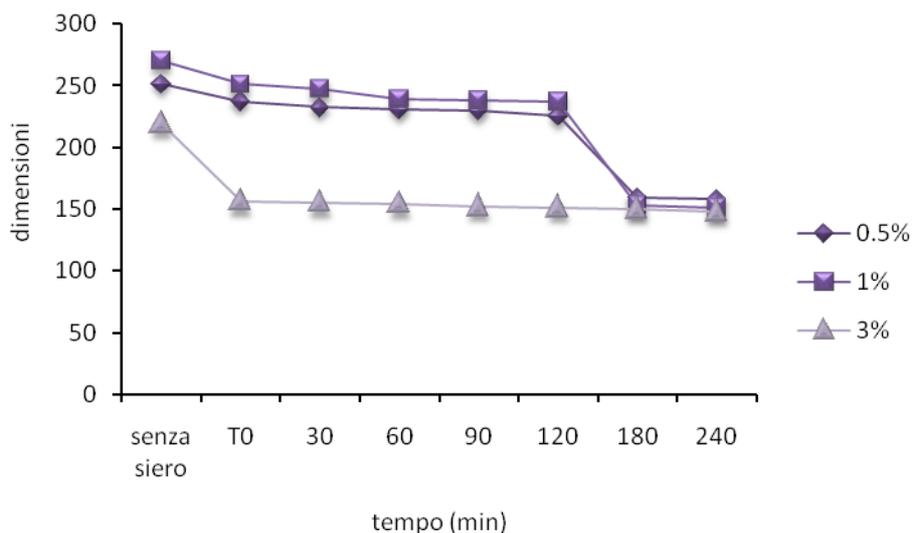


Figura 4.25: Variazione delle dimensioni medie di SLN con PEGC₂₀₀₀LAA18 dopo incubazione con siero bovino a 37°C

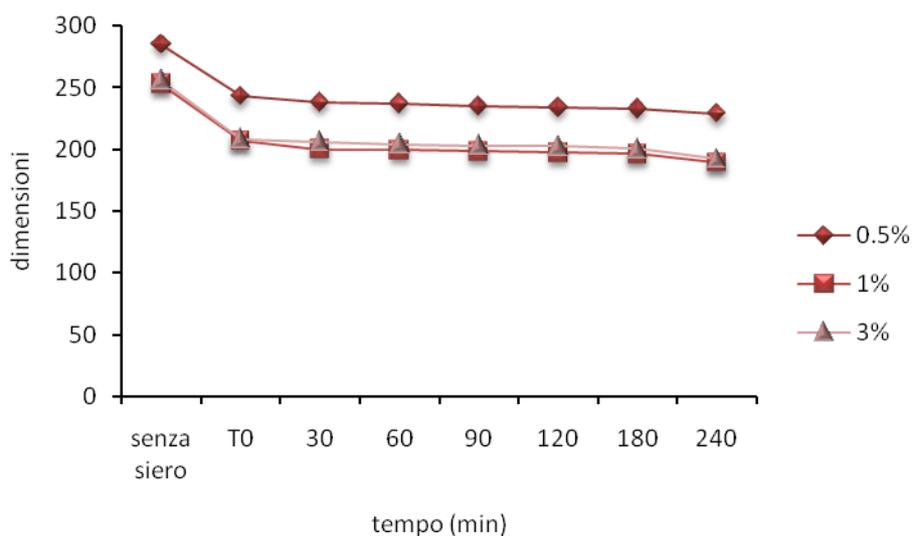


Figura 4.26: Variazione delle dimensioni medie di SLN con PEGC₅₀₀₀LAA18 dopo incubazione con siero bovino a 37°C

4.2.2.2 Incubazione con macrofagi

Per valutare la stabilizzazione sterica indotta sulle SLN dai polimeri in esame, i sistemi sono stati incubati con cellule di macrofagi murini J-774. I risultati sono stati visualizzati tramite microscopio ad epifluorescenza. Le cellule non trattate con le SLN presentano una fluorescenza

diffusa (Figura 4.27A). I macrofagi incubati con le SLN *non-stealth* e caricate con rodamina-DHPE si presentano invece come mostrato in Figura 4.27B.

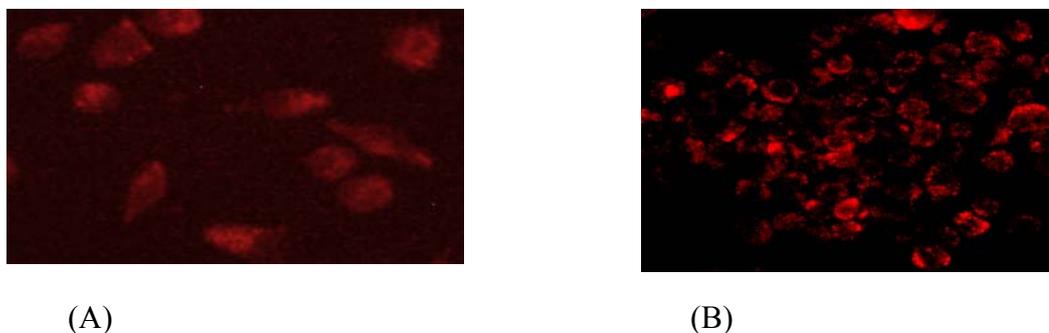


Figura 4.27: Visualizzazione microscopica di: (A) colture di cellule macrofagiche J-774, (B) colture di cellule macrofagiche J-774 incubate con SLN *non stealth*

L'incubazione dei macrofagi con le diverse SLN stericamente stabilizzate hanno mostrato un trend comune: infatti, un aumento della concentrazione del PEG nella formulazione è associato ad una maggiore capacità di “mascheramento”. Tale comportamento è stato osservato per tutti i sistemi, sia quelli preparati con i PEG commerciali, sia quelli che contenevano i coniugati del PEG (a diverso peso molecolare, 2000 e 5000) con LAA a 18 atomi di carbonio. Un'altra importante osservazione è che, fino alla seconda ora di incubazione, tutte le SLN che contenevano la più alta concentrazione di PEG (3%), riuscivano ad eludere i sistemi di *uptake* cellulare in modo più evidente, mentre dopo quattro ore di incubazione tutti i sistemi iniziavano ad essere riconosciuti e fagocitati. A concentrazioni inferiori (0.5% e 1 %) l'effetto *stealth* non è risultato altrettanto efficace: infatti, all'interno delle cellule erano chiaramente visibili degli spot fluorescenti, a conferma che i macrofagi avevano internalizzato le SLN marcate con la rodamina. Tuttavia, occorreranno ulteriori studi per determinare in maniera quantitativa le eventuali differenze di comportamento tra i vari sistemi. E' stato comunque osservato che i PEG commerciali (DSPE-PEG₂₀₀₀ e PEG 40 monostearato) riescono a mascherare solo in parte la superficie delle SLN; infatti, in entrambi i casi alle concentrazioni più basse l'effetto *stealth* è solo parziale: fino alla seconda ora venivano

fagocitati piccoli quantitativi di SLN, mentre dopo 4 ore l'*uptake* delle nanoparticelle era più evidente (Figure 4.28 A-B).

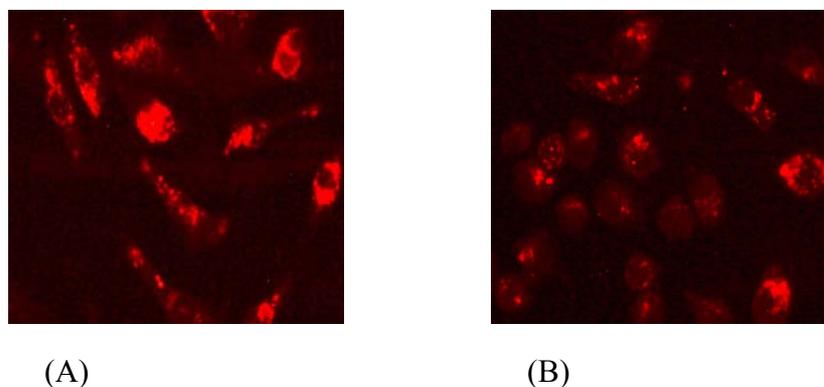


Figura 4.28: Visualizzazione microscopica di colture di cellule macrofagiche J-774 incubate per 2 ore con (A) SLN con lo 0.5% di DSPE-PEG₂₀₀₀ e (B) SLN con lo 0.5% di PEG 40 monostearato

Quando il PEG è presente alla concentrazione più alta (3%) fino alla seconda ora si ha l'elusione dei sistemi di *uptake* cellulare, ma a 4 ore si osserva una parziale internalizzazione. Nel caso dei coniugati del PEG con LAA a 18 atomi di carbonio si notano delle ulteriori differenze. Il PEGC₂₀₀₀LAA18 allo 0.5% non riesce a mascherare la superficie delle SLN, che già dalla seconda ora vengono fagocitate; alla concentrazione dell'1% a 2 ore viene inglobato un discreto quantitativo di particelle, e il medesimo comportamento è stato osservato anche dopo 4 ore (Figura 4.29).

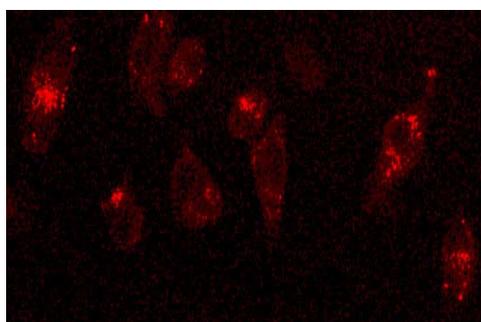


Figura 4.29: Visualizzazione microscopica di colture di cellule macrofagiche J-774 incubate per 4 ore con SLN preparata con lo 0.5% di PEGC₂₀₀₀LAA18

Infine, al 3% l'effetto *stealth* è osservabile fino a 2 ore, mentre a 4 ore i sistemi iniziano ad essere riconosciuti, ma non sono stati ancora completamente fagocitati, infatti molte nanoparticelle sono visibili ai margini delle cellule (Figura 4.30A-B). Con il PEGC₅₀₀₀LAA18 alle due concentrazioni più basse non si notano particolari differenze, perché in entrambi i casi fino a 2 ore si ha un parziale *uptake*, che aumenta progressivamente fino alle 4 ore.

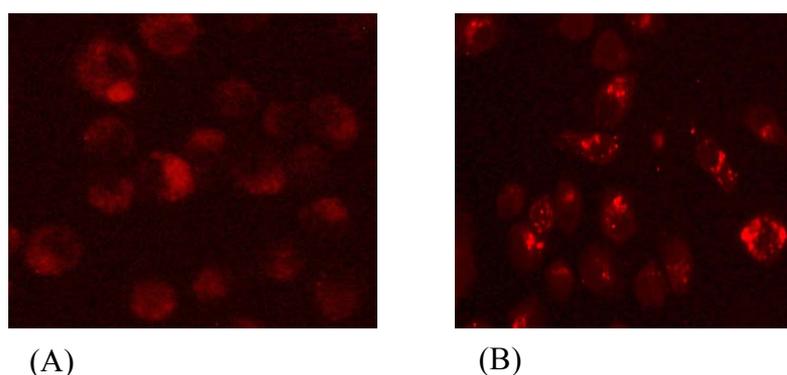


Figura 4.30: Visualizzazione microscopica di colture di cellule macrofagiche J-774 incubate con il 3% di SLN con PEGC₂₀₀₀LAA18 per 2 ore (A) o 4 ore (B)

Se il PEGC₅₀₀₀LAA18 è presente all'3% il comportamento è simile a quello offerto dai PEG commerciali: fino alla seconda ora si ha l'elusione dei sistemi di fagocitosi, ma a 4 ore i sistemi vengono riconosciuti e compaiono all'interno dei macrofagi (Figura 4.31A-B).

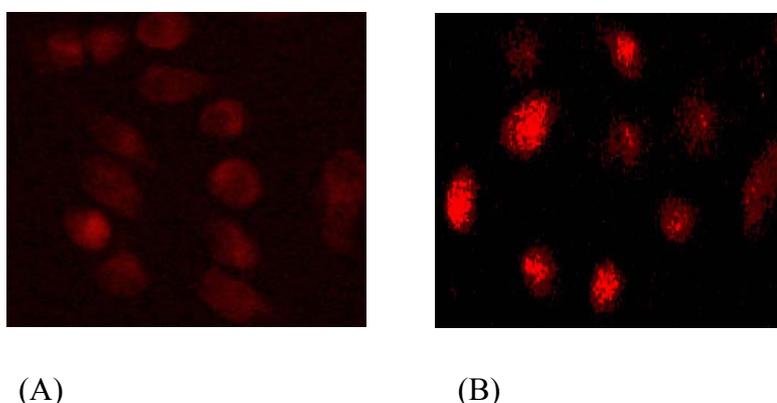


Figura 4.31: Visualizzazione microscopica di colture di cellule macrofagiche J-774 incubate con il 3% di SLN con PEGC₅₀₀₀LAA18 per 2 ore (A) o 4 ore (B)

4.3 NLC

4.3.1 Caratterizzazione chimico-fisica

4.3.1.1 Analisi dimensionale e del potenziale Zeta

Tramite un processo di inversione di fase di un'emulsione sono state preparate NLC di 50 nm (*Hertault et al., 2002*).

Le dimensioni, l'indice di polidispersità e il potenziale Zeta sono stati determinati tramite spettroscopia di fotocorrelazione. I dati, riportati nella Tabella 4.2, confermano che tutte le NLC hanno una dimensione di circa 50 nm e le sospensioni per il basso indice di polidispersione sono abbastanza omogenee. La post-inserzione del PEGC₂₀₀₀LAA18 e del PEGC₅₀₀₀LAA18 ha causato solo un aumento rispettivamente di circa 10 e 30 nm nel diametro delle nanoparticelle. Inoltre, le NLC ottenute sono stabili, poiché non subiscono variazioni dimensionali un mese dopo la preparazione.

Tabella 4.2: Dimensioni, PDI e potenziale Zeta delle NLC stealth e non stealth

Formulazione	Diametro (nm) (media±DS)	PDI	Potenziale Zeta (mV) (media±DS)
NLC	54.07±1.22	0.04±0.004	-5.60±0.61
NLC PEGC ₂₀₀₀ LAA18	64.37±4.98	0.09±0.044	-3.71±2.70
NLC PEGC ₅₀₀₀ LAA18	84.22±22.45	0.13±0.09	0.33±3.35
NLC PTX	55.07±1.33	0.05±0.003	-5.80±0.70
NLC PTX PEGC ₂₀₀₀ LAA18	61.35±2.22	0.05±0.08	-1.36±1.45

4.3.2 Valutazione *in vitro*

4.3.2.1 Misure di attivazione del complemento

L'effetto di mascheramento dei coniugati PEGC_{2000/5000}LAA sulle NLC è stato esaminato *in vitro* attraverso il test emolitico CH50.

La figura 4.32 mostra il comportamento di NLC rivestite con PEGC_{2000/5000}LAA18 a seguito del contatto con siero umano, rivelando l'assenza di una risposta immunitaria nell'intervallo delle superfici studiate (0-1.800 cm²). Una probabile spiegazione potrebbe essere legata alle piccole dimensioni delle NLC e alla nuvola idrofila del PEG sulla loro superficie (*Harashima et al., 1994*). Infatti, la repulsione sterica esercitata dalle catene del PEG riduce l'assorbimento delle opsonine sulla superficie (*Moghimi et al., 2003*). In questo caso la presenza dei due coniugati PEGC₂₀₀₀LAA18 e PEGC₅₀₀₀LAA18 ha determinato un'attivazione che non supera il 10% di unità CH50, rivelando lo stesso effetto stabilizzante.

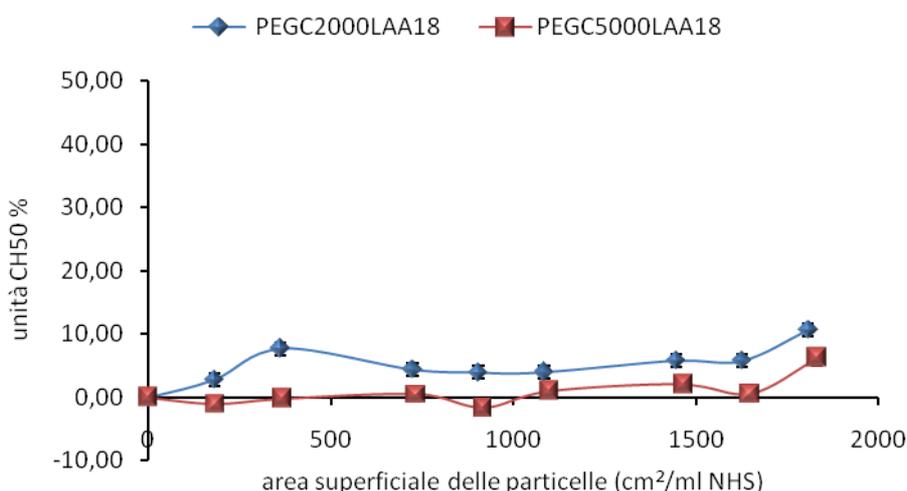


Figura 4.32: Influenza del PEGC_{2000/5000}LAA18 sull'attivazione del complemento sulla superficie delle NLC

4.3.2.2 Studi di *uptake* cellulare mediante citofluorimetria di flusso (FACS) su cellule THP-1

Tramite analisi di citofluorimetria di flusso è stato possibile valutare il grado di *uptake* delle cellule THP-1, sfruttando le caratteristiche di fluorescenza della molecola di DiI. Anche in questo caso gli esperimenti sono stati condotti a 37°C per studiare l'*uptake* cellulare e a 4°C per valutare la presenza di processi non ATP-dipendenti o probabili interazioni tra i coniugati e la membrana plasmatica. Nelle Figure 4.33 e 4.34 sono riportati rispettivamente i grafici relativi all'*uptake* cellulare a 37 e a 4°C su cellule THP-1 espressi in funzione della quantità di fluorescenza del DiI misurata. Le NLC classiche e modificate non presentano nessuna differenza in termini di *uptake* macrofagico rispetto al controllo rappresentato dalle cellule sole e incubate con DiI. Infatti, la fluorescenza misurata è pari al 5%; ciò significa che le NLC classiche e modificate con PEG-LAA non vengono internalizzate durante il periodo di incubazione a seguito del contatto con le cellule THP-1. Questo è molto presumibilmente dovuto al fatto che le particelle in esame presentano in superficie un rivestimento di molecole di PEG seppure di diversa lunghezza.

Gli esperimenti sono stati condotti anche a 4°C e i risultati sono riportati nella Figura 4.33. I risultati dimostrano che a 4°C l'internalizzazione di tutte le NLC è molto bassa, con solo piccole differenze fra l'una e l'altra. Anche fra i diversi coniugati le differenze di fluorescenza associata alle cellule registrate sono minime. Da questi risultati appare dunque evidente che l'*uptake* dei coniugati avviene con un meccanismo ATP-dipendente, perché quando tutti i processi ATP-dipendenti sono bloccati, come nel caso degli esperimenti a basse temperature, le NLC non entrano nelle cellule. Il lieve aumento di fluorescenza registrato è dovuto solo a interazioni dei coniugati con la membrana plasmatica delle cellule.

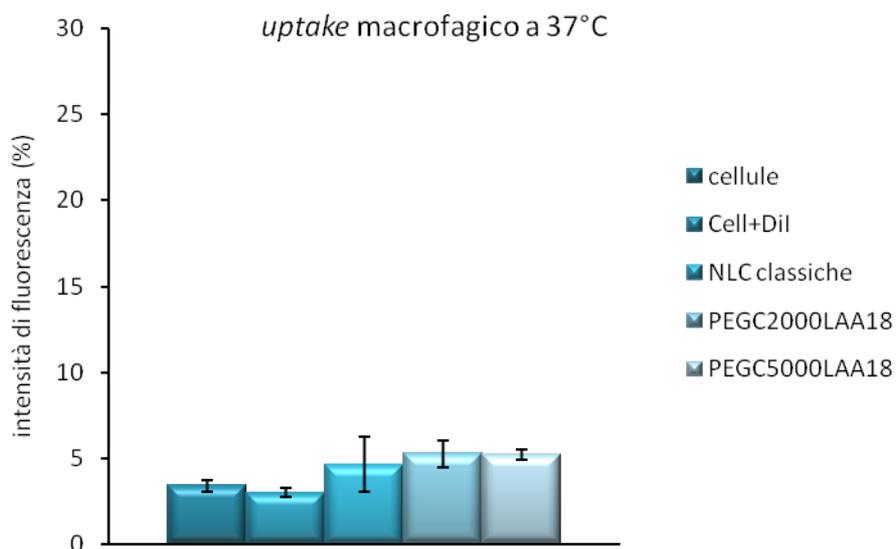


Figura 4.33: Valutazione dell'uptake macrofagico di NLC classiche e modificate con PEG-LAA dopo 90 min di incubazione con cellule THP-1 a 37°C

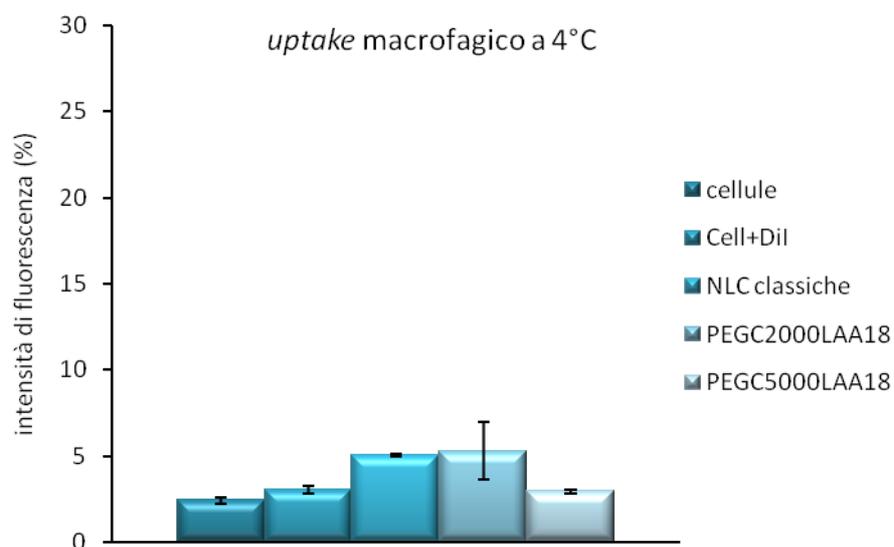


Figura 4.34: Valutazione dell'uptake macrofagico di NLC classiche e modificate con PEG-LAA dopo 90 min di incubazione con cellule THP-1 a 4°C

4.3.3 Valutazione *in vivo*

4.3.3.1 Studio della farmacocinetica e della biodistribuzione

Dopo lo studio preliminare del comportamento *in vitro* delle NLC sono stati condotti studi farmacocinetici su topi Swiss e ratti Wistar, iniettando rispettivamente nella vena caudale e nella vena peniana le preparazioni delle NLC classiche e modificate con i coniugati PEG-LAA ed eseguendo i prelievi a livello oculare e cardiaco. Le figure 4.35 e 4.36 mostrano i profili farmacocinetici delle LNC somministrate a topi Swiss e ratti Wistar rispettivamente. I campioni di sangue sono stati prelevati a 1, 10, 30 min, 1, 3 e 24 ore dopo la loro somministrazione endovenosa. La concentrazione delle NLC nel sangue è proporzionale all'intensità di fluorescenza del DiI utilizzato come probe lipofilo. I principali parametri farmacocinetici, quali $t_{50\%}$, $t_{1/2 \alpha}$, $t_{1/2 \beta}$ e l'AUC, sono riportati in tabella 4.3 e 4.4. I valori di AUC in questo caso si riferiscono alla percentuale della dose iniettata.

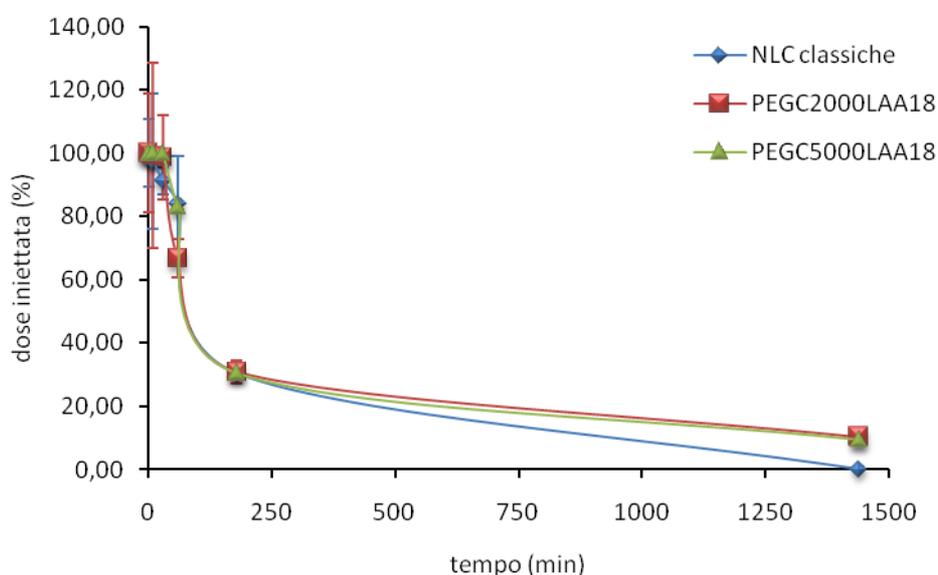


Figura 4.35: Permanenza nel sangue di NLC classiche e rivestite con PEGC_{2000/5000}LAA18 in topi Swiss

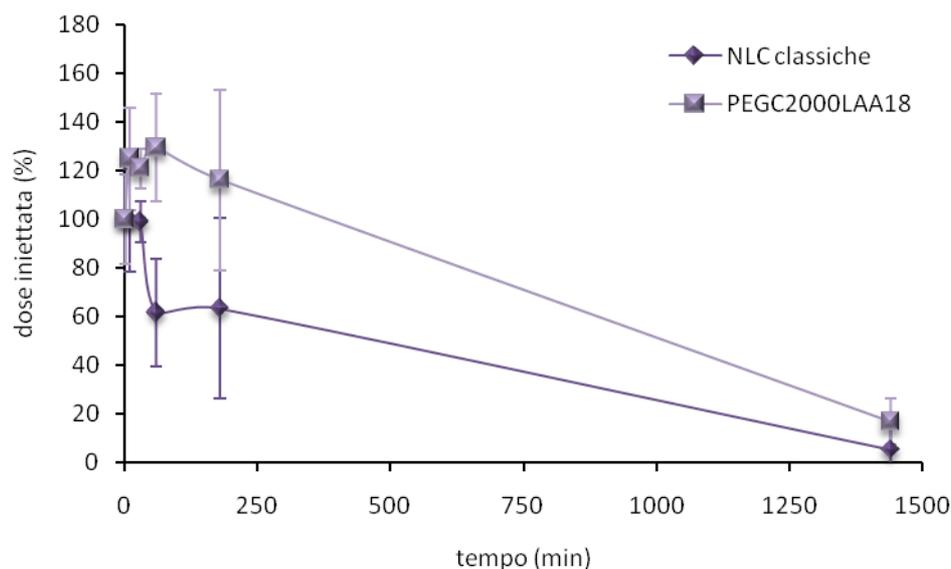


Figura 4.36: Permanenza nel sangue di NLC classiche e rivestite con PEGC₂₀₀₀LAA18 in ratti Wistar

Tabella 4.1: Profilo farmacocinetico di NLC classiche e ricoperte con il PEGC_{2000/5000}LAA18 seguendo la somministrazione sistemica in topi Swiss

Formulazione	t _{50%} (h)	t _{1/2 α} [0-3](h)	t _{1/2 β} [0-24](h)	AUC _[0-3h] (%dose iniettata/h)	AUC _[0-24h] (%dose iniettata/h)
NLC classiche	1.6	11.31	6.28	516.23	569.53
NLC PEGC ₂₀₀₀ LAA18	1.5	6.35	7.8	564	480.43
NLC PEGC ₅₀₀₀ LAA18	1.7	10.7	7.08	565.41	652.85

Tabella 4.2: Profilo farmacocinetico di NLC classiche e ricoperte con il PEGC₂₀₀₀LAA18 seguendo la somministrazione sistemica in ratti Wistar

Formulazione	t _{50%} (h)	t _{1/2 α} [0-3](h)	t _{1/2 β} [0-24](h)	AUC _[0-3h] (%dose iniettata/h)	AUC _[0-24h] (%dose iniettata/h)
NLC classiche	11.16	3.9	7.4	489.5	604.6
NLC PEGC ₂₀₀₀ LAA18	19.3	10.8	10.35	1091	2110

I risultati ottenuti mostrano che le LNC modificate con i coniugati PEG-LAA dopo somministrazione a topi Swiss non presentano tempi di emivita plasmatica diversi dalle NLC classiche, con valori di $t_{50\%}$ che passano da 1.6 h per le LNC classiche a 1.5 h per le NLC con il PEGC₂₀₀₀LAA18 fino a 1.7 h per le NLC con il PEGC₅₀₀₀LAA18.

Tuttavia, risultati incoraggianti sono stati ottenuti a seguito della somministrazione delle NLC a ratti Wistar. In questo caso infatti, i valori di $t_{50\%}$ sono di 11.16 h per le NLC classiche e di 19.3 h per le NLC modificate con il derivato PEGC₂₀₀₀LAA18, dimostrando che questo tipo di coniugato rappresenta una valida alternativa ai derivati lipidici del PEG comunemente utilizzati.

4.3.3.2 Efficienza di intrappolamento del paclitaxel

I risultati dell'analisi HPLC hanno mostrato che le NLC classiche e peghilate con il PEGC₂₀₀₀LAA18 presentano un'efficienza di incapsulazione del 31.52% e del 30.29% rispettivamente.

4.3.3.3 Esperimenti di crescita tumorale

Per studiare la capacità delle NLC modificate con PEGC₂₀₀₀LAA18 di raggiungere uno specifico tessuto tumorale dopo somministrazione endovenosa anche in questo caso è stato utilizzato un modello di gliosarcoma di cellule 9L di ratto.

Le LNC caricate con PTX sono state somministrate dopo che il tumore ha raggiunto un volume di 100 mm³. Lo studio è stato condotto su quattro gruppi di animali, che sono stati raggruppati in maniera random per ridurre le differenze di peso e di dimensione del tumore all'interno dei gruppi.

Come previsto, dopo somministrazione della soluzione salina (Figura 4.37) gli animali hanno mostrato una rapida espansione della massa tumorale che ha raggiunto un volume di 2000

mm³. Viceversa, gli animali trattati con le NLC classiche e modificate con PEGC₂₀₀₀LAA18 sono state caratterizzate da una più lenta progressione del volume tumorale, che dimostra la capacità di queste NLC di mantenere *in vivo* l'attività citotossica del paclitaxel.

Questi risultati sono incoraggianti se paragonati a quelli ottenuti dopo la somministrazione di NLC modificate con il DSPE-PEG₂₀₀₀, perché presentano gli stessi profili di efficacia terapeutica, rallentando la crescita tumorale fino a un volume di 1000 mm³ 25 giorni dopo la loro somministrazione.

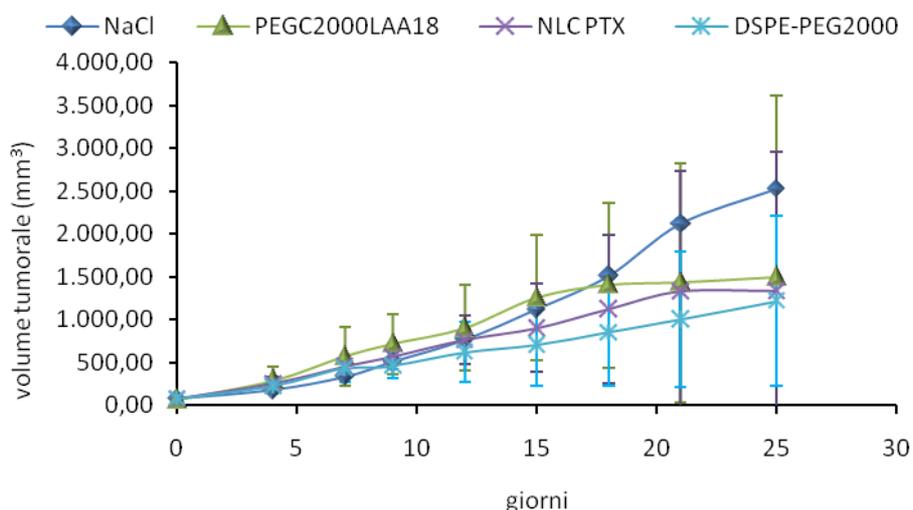


Figura 4.37: Effetti *in vivo* del trattamento di LNC classiche e modificate con PEGC₂₀₀₀LAA18 e DSPE-PEG₂₀₀₀ e caricate con PTX sulla crescita di cellule 9L di glioma impiantate sottocutaneamente su ratti Fisher

5 Discussione

Drug delivery systems, quali le nanoparticelle polimeriche, i sistemi nanostrutturati a base lipidica e le micelle a base di polimeri anfifilici, rappresentano ormai un diffuso campo di ricerca e sperimentazione terapeutica nel settore della moderna tecnologia farmaceutica. Inoltre, la versatilità chimica e formulativa che la scienza dei polimeri e dei biomateriali offre, garantisce la possibilità di esplorarne applicazioni nuove e proprietà sempre più ‘modellate’ su specifiche esigenze terapeutiche. In particolare, settori clinici come quello antitumorale, nei quali la massima discriminazione da parte dei farmaci citostatici tra cellule e tessuti malati e sani rappresenta un imperativo nel trattamento terapeutico, possono ottenere un grande vantaggio e impulso dalla diffusione di *delivery systems* direzionati e selettivi.

Come noto, il targeting di un farmaco o di un *delivery device* ad un particolare tipo di cellula o ad un tessuto bersaglio può sfruttare specifiche differenze tra stati fisiologici e patologici (*targeting passivo*) od essere realizzato mediante opportune modifiche chimiche e fisiche della formulazione (*targeting attivo*).

Un passo ulteriore nel *drug delivery* è pertanto quello di sviluppare *carrier* colloidali di farmaci *stealth*, cioè sistemi in grado di rimanere a lungo in circolo perché in grado di “sfuggire” all’attacco di macrofagi.

Tra i diversi tentativi provati allo scopo di conferire caratteristiche *stealth* vi è quello di modificare la superficie esterna del *carrier* mediante macromolecole o polimeri idrofili, che “nascondono” fisicamente la particella ai meccanismi del complemento. Il polimero più comunemente utilizzato per questo scopo è il poli(etilenglicole) o PEG.

Il PEG è uno dei polimeri più versatili e da tempo oggetto di numerosi studi. Infatti, questo polimero è disponibile in un vasto range di pesi molecolari, permettendo quindi la scelta della specie migliore per sfruttare l’effetto EPR e inoltre presenta una struttura chimica tale da poter

legare specificatamente e con precisa stechiometria sia un farmaco che un agente direzionante verso specifici *marker* tumorali.

Inoltre, negli ultimi anni le diverse ricerche hanno portato alla quasi unanime scelta di derivati fosfolipidici del PEG come modificatori di superficie, soprattutto nel caso di liposomi.

Sulla base di questi presupposti la ricerca proposta ha avuto come oggetto la realizzazione, e la caratterizzazione di diversi *drug delivery systems stealth* a partire da derivati anfifilici del PEG. In questo lavoro è stata utilizzata una molecola di LAA come modificatore lipofilo in grado di garantire uno stabile legame fisico con la superficie di liposomi o di altri vettori nanoparticelari.

I derivati polimerici PEG-LAA sono stati ottenuti con un elevato grado di resa e di purezza, che sono state confermate da analisi IR, ¹H-NMR e MALDI-TOF condotte in precedenza all'interno del nostro gruppo di ricerca.

In questo lavoro sperimentale sono stati presi in considerazione diversi tipi di *carrier* colloidali, quali: liposomi, NLC e SLN.

Le diverse formulazioni sono state preparate secondo i metodi riportati in letteratura.

Le dimensioni e il potenziale Zeta delle particelle sono stati determinati tramite analisi di spettroscopia di fotocorrelazione, attraverso cui è stato possibile valutare sia l'omogeneità che la stabilità dei sistemi ottenuti.

In particolare l'analisi del Potenziale Zeta degli MLV ha dimostrato come la presenza dei derivati del PEGC₂₀₀₀LAA e soprattutto del PEGC₅₀₀₀LAA ha l'effetto di ridurre la carica negativa superficiale.

Tra le SLN *stealth* risultati incoraggianti sono stati ottenuti dopo rivestimento con il coniugato PEGC₂₀₀₀LAA, che si è dimostrato più efficace del DSPE-PEG₂₀₀₀ commerciale, mentre in tutti gli altri casi si osserva un incremento nella carica superficiale, probabilmente dovuto ad un riarrangiamento del sistema.

A seguito di valutazione della stabilità delle SLN *stealth* nel siero è stata osservata una riduzione del diametro medio delle particelle, probabilmente causata da una perdita del polimero dal sistema.

Per la caratterizzazione *in vitro* di MLV e NLC *stealth* è stato effettuato il test emolitico CH50. In entrambi i casi la presenza dei derivati PEG-LAA non ha attivato una risposta immunitaria significativa.

Lo studio dell'internalizzazione su cellule J-774 e THP-1 ha permesso di valutare la capacità di queste particelle peghilate di sfuggire all'*uptake* macrofagico.

I risultati ottenuti su cellule J-774 per i liposomi hanno mostrato che l'internalizzazione delle vescicole peghilate con i derivati PEG-LAA è considerevolmente ridotta rispetto a quella delle vescicole "nude".

Diversa è la situazione a seguito di incubazione dei liposomi con cellule THP-1 a 37 e a 4°C. In questo caso solo i derivati PEGC₂₀₀₀LAA18 e PEGC₅₀₀₀LAA18 hanno dimostrato una maggiore efficacia nel mascherare le particelle rispetto ai derivati amminici con i LAA, che invece vengono internalizzati più velocemente.

I risultati ottenuti dalle SLN contenenti la più alta concentrazione di PEG e incubate con le cellule J-774, hanno dimostrato che le particelle riuscivano ad eludere i sistemi di *uptake* cellulare in modo più evidente le prime ore di incubazione, mentre dopo iniziavano ad essere riconosciute e fagocitate.

Analogamente, le prove *in vitro* delle NLC su cellule THP-1 hanno rivelato che le NLC classiche e modificate non presentano nessuna differenza in termini di *uptake* macrofagico rispetto al controllo.

Per una maggiore comprensione delle capacità dei coniugati PEG-LAA di conferire *long-circulating properties* ai diversi vettori colloidali è stata valutata la permanenza in circolo dopo somministrazione a topi e ratti.

Se si considerano i liposomi peghilati, tutti gli MLV *stealth* presentavano delle emivite plasmatiche maggiori rispetto alle vescicole di DPPC

Nel caso delle LNC modificate con i coniugati PEG-LAA sono stati ottenuti buoni risultati a seguito di somministrazione a ratti Wistar

Alla luce dei risultati ottenuti il derivato PEGC₂₀₀₀LAA18 è stato scelto per gli esperimenti di crescita tumorale.

Pertanto, l'ultima parte di questo lavoro di ricerca ha riguardato lo studio della capacità di questi vettori di raggiungere uno specifico sito tumorale per effetto EPR su un modello di gliosarcoma di cellule 9L di ratto.

Interessanti risultati sono stati ottenuti dagli MLV modificati con il PEGC₂₀₀₀LAA18, che hanno mantenuto l'attività citostatica del farmaco a livello del tessuto tumorale presentando gli stessi profili di efficacia terapeutica delle vescicole modificate con il DSPE-PEG₂₀₀₀ commerciale.

Analogamente gli animali trattati con le LNC modificate con PEGC₂₀₀₀LAA18 hanno presentato una più lenta progressione del volume tumorale paragonabile a quella mostrata dopo trattamento con le NLC modificate con il DSPE-PEG₂₀₀₀ presente in commercio.

Queste osservazioni, prese nel loro insieme, dimostrano che il derivato PEGC₂₀₀₀LAA18 si è rivelato il più efficace nell'aumentare l'emivita plasmatica di particelle a seguito della loro somministrazione endovenosa e nel migliorare la selettività di un farmaco al sito bersaglio.

6 Conclusioni

In questo lavoro di ricerca è stato possibile valutare *in vitro* e *in vivo* la capacità di nuovi coniugati anfifilici del PEG di stabilizzare *carrier* colloidali di farmaci.

Attraverso studi di microscopia confocale e misure di citofluorimetria di flusso è stato possibile far luce sulla capacità di queste particelle di sfuggire all'*uptake* cellulare. Utilizzando i diversi coniugati PEG-LAA, è stato possibile preparare vettori stericamente stabili potenzialmente direzionabili per effetto EPR ed è stato confermato come i coniugati oggetto di questa ricerca si comportino efficacemente allo scopo, in maniera comparabile o in alcuni casi migliore rispetto ai derivati lipidici del PEG commercialmente disponibili.

I dati di queste analisi si sono rivelate utili nel focalizzare il design di ulteriori coniugati—anche utilizzando polimeri diversi dal PEG—in modo da aumentarne l'efficacia come modificatori di superficie dei *carrier* di dimensioni colloidali.

Esperimenti futuri riguarderanno il caricamento di altri farmaci modello per valutare la capacità di *targeting attivo* dei nanovettori a specifici bersagli, ad esempio, tessuti tumorali, aree infiammate, SNC, etc.

7 Bibliografia

- Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1066: 29–36.
- Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(6): 478-490.
- Athanasίου KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996; 17(2): 93-102.
- Bartlett DW, Su H, Hildebrandt IJ, Weber WA, Davis ME. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 15549-15554.
- Bazile D, Prudhomme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me-PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84: 493-498.
- Bellocq NC, Pun SH, Jensen GS, Davis ME. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 2003; 14: 1122–1132.
- Blow AM, Botham GM, Fisher D, Goodall AH, Tilcock CP, Lucy JA. Water and calcium ions in cell fusion induced by poly(ethylene glycol). *FEBS Lett.* 1978; 94: 305-310.
- Bradley AJ, Devine DV, Ansell SM, Janzen J, Brooks DE. Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)–lipids. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 357: 185–194.
- Brigger I, Morizet J, Laudani L, Aubert G, Appel M, Velasco V, Terrier-Lacombe M-J, Desmaele D, d’Angelo J, Couvreur P, Vassal G. Negative preclinical results with stealth nanospheres-encapsulated Doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control. Release* 2004; 100: 29–40.
- Bunjes H, Siekmann B. Manufacture, characterization and application of solid lipid nanoparticles as drug delivery system. In: Deleers M, Pathak Y, Thassu D, Editors, *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, Informa Healthcare 2007: 213–268.
- Cabanes A, Briggs KE, Gokhale PC, Treat JA, Rahman A. Comparative in vivo studies with paclitaxel and liposome-encapsulated paclitaxel. *Int J Oncol.* 1998; 12(5): 1035-1040.
- Calvo P, Gouritin B, Chacun H, Desmaele D, D’Angelo J, Noel JP, Georjgin D, Fattal E, Andreux JP, Couvreur P. Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm Res* 2001; 18 (8): 1157–1166.

- Carstensen H, Muller RH, Muller BW. Particle-size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model-drug carriers as parameters related to RES uptake. *Clin. Nutr.* 1992; 11: 289-297.
- Castelli F, Librando V, Sarpietro MG. Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes. *Environ Sci Technol.* 2002; 36: 2717-2723.
- Castelli F, Puglisi G, Giammona G, Ventura C. Effect of the complexation of some non-steroidal anti-inflammatory drugs with β -cyclodextrins on the interaction with phosphatidylcholine liposomes. *Int J Pharm.* 1992; 88: 1-8.
- Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Burgalassi S, Saettone MF. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.* 2002; 238: 241–245.
- Delgado C, Francis GE, Fisher D. The use and properties of PEG-linked proteins. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1992; 9: 249-304.
- Du H, Chandaroy P, Hui SW. Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1326: 236-248.
- Eaton M. Nanomedicine: industry-wise research. *Nat Mater* 2007; 6(4): 251-253.
- Elbayoumi TA, Torchilin VP. Enhanced accumulation of long-circulating liposomes modified with the nucleosome-specific monoclonal antibody 2C5 in various tumours in mice: gamma-imaging studies. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2006; 33: 1196–1205.
- Eugene M. Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation. *Cell Mol Biol.* 2004; 50(3): 209-215.
- Fang C, Shi B, Pei YY, Hong MH, Wu J, Chen HZ. In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor-alpha-loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 27:27–36.
- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *PNAS* 2006; 103: 6315–6320.
- Feng SS, Ruan G, Li QT. Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM). *Biomaterials* 2004; 25(21): 5181-5189.
- Frank M, Fries L. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 1991; 12: 322-326.
- Fresta M, Ricci M, Rossi C, Furneri PM, Puglisi G. Antimicrobial Nonapeptide Leucinostatin A-Dependent Effects on the Physical Properties of Phospholipid Model Membranes. *J Colloid Interface Sci.* 2000; 226(2): 222-230.

- Fundarò A, Cavalli R, Bargoni A, Vighetto D, Zara GP, Gasco MR. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacol Res.* 2000; 42(4): 337-343.
- Gao X, Tao W, Lu W, Zhang Q, Zhang Y, Jiang X, Fu S. Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials* 2006; 27: 3482–3490.
- Garcia-Fuentes M, Torres D, Martin-Pastor M, Alonso MJ. Application of NMR spectroscopy to the characterization of PEG-stabilized lipid nanoparticles. *Langmuir* 2004; 20(20): 8839-8845.
- Gill PS, Espina BM, Muggia F, Cabriaes S, Tulpule A, Esplin JA, Liebman HA, Forssen E, Ross ME, Levine AM. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13: 996–1003.
- Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Muller RH, Verbavatz JM, Langer R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995; 16: 215-233.
- Gref R, Lück M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T, Müller RH. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000 ; 18(3-4): 301-313.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994; 263: 1600–1603.
- Gregoriadis G, Wills EJ, Swain CP, Tavill AS. Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet* 1974; 1(7870): 1313-1316.
- Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 2586-2591.
- Hansen PL, Cohen JA, Podgomik R, Parsegian VA. Osmotic properties of poly(ethylene glycols): quantitative features of brush and bulk scaling laws. *Biophys J.* 2003; 84: 350-355.
- Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes, *Pharm. Res.* 1994; 11: 402-406.
- Harper GR, Davies MC, Davis SS, Tadros TF, Taylor DC, Irving MP, Waters JA. Steric stabilization of microspheres with grafted polyethylene oxide reduces phagocytosis by rat Kupffer cells-in vitro. *Biomaterials* 1991; 12: 695-704.
- Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(5): 39-51.
- Hattori Y, Maitani Y. Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer. *J. Control. Release* 2004; 97: 173–183.

- Hermans J. Excluded-volume theory of polymer-protein interactions based on polymer chain statistics. *J Chem Phys.* 1982; 77: 2193-2204.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 2002a; 19(6): 875-880.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface. *Int. J. Pharm.* 2002; 242: 167–170.
- Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux JC. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharmaceutical Research* 2004; 21(10): 1783-1789.
- Hong Y, Hu FQ, Yuan H. Effect of PEG2000 on drug delivery characterization from solid lipid nanoparticles. *Pharmazie* 2006; 61: 312-315.
- Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye YQ, Zeng S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm.* 2006; 314(1): 83-89.
- Hui SW, Kuhl TL, Guo YQ, Israclachvili J. Use of poly(ethylene glycol) to control cell aggregation and fusion. *Coll. Surf B Biointerfaces* 1999; 14: 213-222.
- Huynh NT, Roger E, Lautram N, Benoît JP, Passirani C. The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting. *Nanomedicine* 2010;5(9): 1415-1433.
- Illum L, Davis SS. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer-338). *FEBS Lett.* 1984; 167: 79-82.
- Illum L, Hunneyball IM, Davis SS. The effect of hydrophilic coating on the uptake of the colloidal particles by the liver and by peritoneal-macrophages. *Int. J. Pharm.* 1986; 29: 53-65.
- Iver L, Ratain MJ. Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 1998; 34(10): 1493-1499.
- Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000; 21(23): 2475-2490.
- Jenning V, Gohla SH. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN[®]). *J. Microenviron.* 2001; 18: 149–158.
- Jenning V, Thünemann AF, Gohla SH. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm.* 2000; 199(2): 167-177.
- Jeon SI, Andrade JD. Protein-Surface interactions in the presence of polyethylene oxide; 2. Effect of protein size. *J Colloid Interf Sci* 1991; 142: 159–166.
- Jeon SI, Lee HJ, Andrade JD, De Gennes PG. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide, I, Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci.* 1991; 142 : 149-158.

- Jeong YI, Seo SJ, Park IK, Lee HC, Kang IC, Akaike T, Cho CS. Cellular recognition of paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles composed of poly(γ -benzyl L-glutamate) and poly(ethylene glycol) diblock copolymer endcapped with galactose moiety. *Int. J. Pharm.* 2005; 296: 151–161.
- Johnson RJ. ‘The complement system’, Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E., (Ed.) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier Academic Press, Amsterdam 2004: 318-328.
- Johnstone SA, Masin D, Mayer L, Bally MB. Surface-associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly(ethylene glycol) liposomes by mouse macrophages, *Biochim Biophys Acta* 2001; 1513: 25-37.
- Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 71(2): 161-72.
- Kang KW, Chun MK, Kim O, Subedi RK, Ahn SG, Yoon JH, Choi HK. Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. *Nanomedicine* 2010; 6(2): 210-213.
- Kaul G, Amiji M. Cellular interactions and in vitro DNA transfection studies with poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94:184–198.
- Kaul G, Amiji M. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm. Res.* 2002; 19: 1061-1067.
- Kaul G, Amiji M. Tumor-targeted gene delivery using poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles: in vitro and in vivo studies. *Pharm. Res.* 2005; 22: 951–961.
- Kazatchkine MD, Hauptmann G, Nydegger UE. *Techniques du Complément*. Paris: Inserm 1986: 22-23.
- Kim SH, Jeong JH, Chun KW, Park TG. Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir* 2005; 21: 8852–8857.
- Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, Marks JD, Benz CC, Park JW. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.* 2006; 66: 6732-6740.
- Kommareddy S, Amiji M. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of long-circulating thiolated gelatin nanoparticles following systemic administration in breast cancer-bearing mice. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96: 397–407.
- Kuhl T, Guo Y, Aldefer JL, Berman AD, Leckband D, Israclachvili J, Hui SW. Direct measurement of polyethylene glycol induced depletion attraction between lipid bilayers. *Langmuir* 1996; 12: 3003-3014.
- Labarre D, Vittaz M, Spenlehauer G, Bazile D, Veillard M. Complement activation by nanoparticulate carriers. In: *Proc. Int. Symp. Controll. Release Bioact. Mater., Controll. Release Soc.* 1994; 21: 91–92.

- Lasic DD. Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature* 1996; 380: 561–562.
- Lec DY, Yang K, Lec S, Chac SY, Kim KW, Lee MK, Han DJ, Buyn Y. Optimization of monomethoxy-polyethylene glycol grafting on the pancreatic islet capsules. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62(3): 372-377.
- Lewis RE, Albert ND, Liao G, Hou J, Prince RA, Kontoyiannis DP. Comparative pharmacodynamics of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B in a murine model of pulmonary mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 1298-1304.
- Li W, Huang Z, MacKay JA, Grube S, Szoka FC Jr. Low-pH-sensitive poly(ethylene glycol) (PEG)-stabilized plasmid nanolipoparticles: effects of PEG chain length, lipid composition and assembly conditions on gene delivery. *J. Gene Med.* 2005; 7:67–79.
- Li WM, Mayer LD, Bally MB. Prevention of antibody-mediated elimination of ligand-targeted liposomes by using poly(ethylene glycol)-modified lipids, *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300(3): 976-983.
- Liu J, Gong T, Fu H, Wang C, Wang X, Chen Q, Zhang Q, He Q, Zhang Z. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* 2008; 356: 333–334.
- Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(15): 1650-1662.
- Maeda H, Matsumura Y. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 6(3) 1989: 193-210.
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000; 65: 271-284.
- Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2007; 2(4): 595-607.
- Mayer MM. On the destruction of erythrocytes and other cells by antibody and complement. *Cancer Res.* 1961; 21: 1262-1269.
- Metselaar JM, Bruin P, De Boer LW, De Vringer T, Snel C, Oussoren C, Wauben MH, Crommelin DJ, Storm G, Hennink WE. A Novel Family of L-Amino Acid-Based Biodegradable Polymer-Lipid Conjugates for the Development of Long-Circulating Liposomes with Effective Drug-Targeting Capacity. *Bioconjug Chem.* 2003; 14(6): 1156-1164.
- Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* 1998; 37: 12875-12883.
- Mishra S, Webster P, Davis ME. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur. J. Cell Biol.* 2004; 83:97–111.

- Mitchell RN, Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Innate and adaptive immunity: the immune response to foreign materials. (Ed.) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier Academic Press, Amsterdam 2004: 304-318.
- Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issue in pharmacokinetics, opsonization and protein binding properties. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 463-468.
- Morgan BP. Physiology and pathophysiology of complement-progress and trends. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1995; 32: 265-298.
- Muller RH, Wallis KH, Troster SD, Kreuter J. In vitro characterization of poly(methyl-methacrylate) nanoparticles and correlation to their in vivo fate. *J. Control. Release* 1992; 20: 237-246.
- Neal JC, Stolnik S, Schacht E, Kenaway ER, Garnett MC, Davis SS, Illum L. In vitro displacement by rat serum of adsorbed radiolabeled poloxamer and poloxamine copolymers from model and biodegradable nanospheres. *J. Pharm. Sci.* 1998; 87: 1242-1248.
- Nori A, Kopecek J. Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57:609–36.
- Norman ME, Williams P, Illum L. Human serum-albumin as a probe for surface conditioning (opsonization) of block copolymer-coated microspheres. *Biomaterials* 1992; 13: 841-849.
- Opanasopit P, Nishikawa M, Managit C, Yamashita F, Hashida M. Control of hepatic disposition of mannosylated liposomes by PEGylation: effect of the molecular weight of PEG and the density of PEG and mannose. *S.T.P. Pharma Sciences.* 2003; 13(1): 57-62.
- Owens III Donald E, Peppas Nicholas A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric Nanoparticles. *Int. J. of Pharm.* 2006; 307: 93-102.
- Oyewumi MO, Liu S, Moscow JA, Mumper RJ. Specific association of thiamine-coated gadolinium nanoparticles with human breast cancer cells expressing thiamine transporters. *Bioconjug. Chem.* 2003; 14: 404–411.
- Panagi Z, Beletsi A, Evangelatos G, Livaniou E, Ithakissios DS, Avgoustakis K. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2001; 221: 143-152.
- Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55(3): 329-347.
- Parmentier J, Becker MM, Heintz U, Fricker G. Stability of liposomes containing bio-enhancers and tetraether lipids in simulated gastro-intestinal fluids. *Int J Pharm.* 2011; 405(1-2): 210-217.
- Parr MJ, Ansell SM, Choi LS, Cullis PR. Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)–lipid conjugates incorporated into large unilamellars vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1195: 21–30.

- Passirani C, Barratt G, Devissaguet JP, Labarre D. Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system. *Life Sci* 1998; 62: 775-85.
- Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, Langer R, Alonso MJ. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Control Release* 2001; 75(1-2): 211-224.
- Pignatello R, Guccione S, Castelli F, Sarpietro MG, Giurato L, Lombardo M, Puglisi G, Toth I. Enhancement of drug affinity for cell membranes by conjugation with lipoamino acids II. Experimental and computational evidence using biomembrane models. *Int J Pharm.* 2006; 310(1-2): 53-63.
- Pignatello R, Pantò V, Basile L, Impallomeni G, Ballistreri A, Pistarà V, Craparo EF, Puglisi G. New amphiphilic conjugates of mono- and bis(carboxy)-PEG2000 polymers with lipoamino acids as surface modifiers of colloidal drug carriers. *Macromol Chem Phys.* Published Online: 24 Mar. 2010, DOI:10.1002/macp.200900632.
- Pun SH, Tack F, Bellocq NC, Cheng J, Grubbs BH, Jensen GS, Davis ME, Brewster M, Janicot M, Janssens B, Floren W, Bakker A. Targeted delivery of RNA-cleaving DNA enzyme (DNAzyme) to tumor tissue by transferrin-modified, cyclodextrin-based particles. *Cancer Biol. Ther.* 2004; 3:641–645.
- Riche EL, Erickson BW, Cho MJ. Novel Long-circulating Liposomes containing Peptide library-lipid conjugates: synthesis and in vivo behaviour. *J. Drug Target* 2004; 12(6): 355-361.
- Roser M, Fischer D, Kissel T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II. Effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998; 46: 255-263.
- Russell-Jones G, McTavish K, McEwan J, Rice J, Nowotnik D. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J. Inorg. Biochem.* 2004; 98:1625–1633.
- Sadzuka Y, Kishi K, Hirota S, Sonobe T. Effect of polyethylenglycol (PEG) chain on cell uptake of PEG-modified Liposomes. *J Liposome Res.* 2003; 13(2): 157-172.
- Saxena V, Sadoqi M, Shao J. Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: biodistribution in healthy mice. *Int J Pharm.* 2006; 308(1-2): 200-204.
- Serpe L, Catalano MG, Cavalli R, Ugazio E, Bosco O, Canaparo R, Muntoni E, Frairia R, Gasco MR, Eandi M, Zara GP. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58(3): 673-680.
- Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.* 2005; 293: 261–270.
- Shimada K, Kamps JAAM, Regts J, Ikeda K, Shiozawa T, Hirota S, Scherphof G. Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglyceryl-poly(ethyleneglycol)s. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1326: 329–341.

- Siekmann B, Westesen K. Sub-micron sized parenteral carrier systems based on solid lipidis. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1992; 1: 123-126
- Singer L, Colten HR, Wetsel RA. Complement C3 deficiency-human, animal, and experimental-models. *Pathobiology* 1994; 62: 14-28.
- Stancampiano AHS, Acquaviva R, Campisi A, Vanella L, Ventura CA, Puglisi G, Pignatello R. Technological and biological characterization of idebenone-loaded Solid Lipid Nanoparticles prepared by a modified solvent injection technique. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2006; 2: 253-260.
- Stancampiano AHS, Pignatello R, Puglisi G. Effect of lipophilicity of dispersed drugs on the physicochemical and technological properties of solid lipid nanoparticles. *The Open Drug Delivery Journal* 2008; 2: 26-32.
- Storm G, Belliot SO, Daemen T, Lasic DD. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995; 17: 31-48.
- Sun C, Sze R, Zhang M. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006; 78: 550-557.
- Sznitowska M, Gajewska M, Janicki S, Radwanska A, Lukowski G. Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001; 52: 159-163.
- Takeuchi H, Kojima H, Yamamoto H, Kawashima Y. Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats. *Journal of Controlled Release* 2001; 75: 83-91.
- Teshima M, Kswakami S, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Nakashima M, Nakagawa H, Tchikawa N, Sasaki H. PEGylated liposomes loading palmitoyl prednisolone for prolonged blood concentration of prednisolone. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29(7): 1436-1440.
- Tobío M, Gref R, Sánchez A, Langer R, Alonso MJ. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm Res.* 1998; 15(2): 270-275.
- Torchilin V P. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8: 343-375.
- Toth I. A novel chemical approach to drug delivery: lipidic amino acid conjugates. *J Drug Targeting* 1994; 2: 217-239.
- van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharm Res.* 2007; 24(8): 1405-1414.
- Vittaz M, Bazile D, Spenlehauer G, Verrecchia T, Veillard M, Puisieux F, Labarre D. Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials* 1996; 17(16): 1575-1581.

- Webb MS, Saxon D, Wong FMP, Lim HJ, Wang Z, Bally MB, Choi LSL, Cullis PR, Mayer LD. Comparison of different hydrophobic anchors conjugated to poly(ethylene glycol)-effects on the pharmacokinetics of liposomal vincristine. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1372: 272-282.
- Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1257–1272.
- Wong A, Toth I. Lipid, sugar and liposaccharide based delivery systems. *Curr Med Chem.* 2001; 8(9): 1123-1136.
- Wong HL, Rauth AM, Bendayan R, Wu XY. In vivo evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 65(3): 300-308.
- Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1113: 171-199.
- Woodle MC, Newman MS, Cohen JA. Sterically stabilized liposomes: physical and biological and biological properties. *J. Drug Target* 1994; 2: 397-403.
- Xu Z, Gu W, Huang J, Sui H, Zhou Z, Yang Y, Yan Z, Li Y. In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int. J. Pharm.* 2005; 288: 361-368.
- Yuan H, Wang LL, Du YZ, You J, Hu FQ, Zeng S. Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 60(2): 174-179.
- Zalipsky S. Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconj Chem.* 1995; 6(2): 150-165.
- Zeisig R, Shimada K, Hirota S, Arndt D. Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines, *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1285 (2): 237-245.
- Zhang XG, Miao J, Dai YQ, Du YZ, Yuan H, Hu FQ. Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. *Int J Pharm.* 2008; 361(1-2): 239-244.
- Zhang Y, Chen Y, Jin G. PEGylated phospholipid membrane on polymer cushion and its interaction with cholesterol. *Langmuir* 2010; 26(13): 11140-11144.

Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento va al Prof. Giovanni Puglisi per la sua disponibilità, professionalità e competenza.

Sono estremamente grata al Prof. Rosario Pignatello per avermi dato la possibilità di vivere questa esperienza formativa di cui farò tesoro nel mio, spero splendido, futuro.

Un sincero ringraziamento va alla Prof.ssa Catherine Passirani e al Prof Jean-Pierre Benoit dell'INSERM U646 dell'Università d'Angers che mi hanno accolto nel loro gruppo di ricerca durante il periodo di stage in Francia, seguendomi con grande professionalità e interesse. Grazie poi a tutto il gruppo dell'INSERM U646 che mi ha accolto con disponibilità, simpatia e pazienza. In particolar modo vorrei ringraziare Jérôme Béjaud, Marie Morille, Trinh Huynh Ngoc e Pierre per i loro preziosi consigli senza i quali sarebbe stato difficile svolgere parte di questo lavoro di ricerca.

Ringrazio la Dott.ssa Valentina Pantò che fin dall'inizio si è dimostrata essere una vera amica sempre disponibile e paziente.

Infine grazie a tutti coloro che mi sono stati vicini e mi hanno sostenuto in questa esperienza.