



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biologia Cellulare e Scienze e Tecnologie del Farmaco
Indirizzo “Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Settore Scientifico Disciplinare CHIM/09

PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOSISTEMI LIPIDICI PER IL DIREZIONAMENTO E IL RILASCIO MODIFICATO DI FARMACI E ACIDI NUCLEICI IN TERAPIA ONCOLOGICA

IL DOTTORE
Dott.ssa Chiara Botto

IL COORDINATORE
Ch.ma Prof.ssa Patrizia Diana

IL TUTOR
Ch.ma Prof.ssa Gennara Cavallaro

IL REFERENTE DELL'INDIRIZZO
Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

CO-TUTOR
Preg.ma Dott.ssa Maria Luisa Bondi

CICLO XXVI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO: 2016

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni lo sviluppo di formulazioni in grado di rilasciare il farmaco nel sito target dell'organismo, in velocità e quantità controllate, ha riscosso sempre più interesse nel settore della tecnologia farmaceutica. Diverse sono infatti le problematiche che possono causare il fallimento delle terapie convenzionali, tra cui:

- scarsa solubilità del farmaco nei fluidi biologici;
- insufficiente concentrazione di farmaco dovuta a scarso assorbimento, rapido metabolismo ed eliminazione (es. peptidi, proteine);
- distribuzione del farmaco in tessuti diversi da quello bersaglio, con conseguenti effetti collaterali (es. farmaci chemioterapici).

Una strategia promettente per superare tali inconvenienti è quella di sviluppare degli adeguati sistemi carrier che permettano di modulare la cessione del principio attivo e direzionarlo verso uno specifico sito target. In questo modo il destino del farmaco *in vivo* non sarebbe più dipendente dalle sue proprietà ma da quelle del sistema carrier, che dovrebbe consentire un rilascio controllato e localizzato del principio attivo, in accordo alle specifiche esigenze terapeutiche [Mehnert e

Mäder, 2001] (Fig.1). Inoltre, modificando opportunamente la dimensione, la forma e le caratteristiche di superficie del carrier sarebbe possibile controllare il tempo di circolazione ed il destino finale del farmaco, incrementandone l'indice terapeutico e riducendo al tempo stesso gli effetti collaterali [Su et al., 2015].

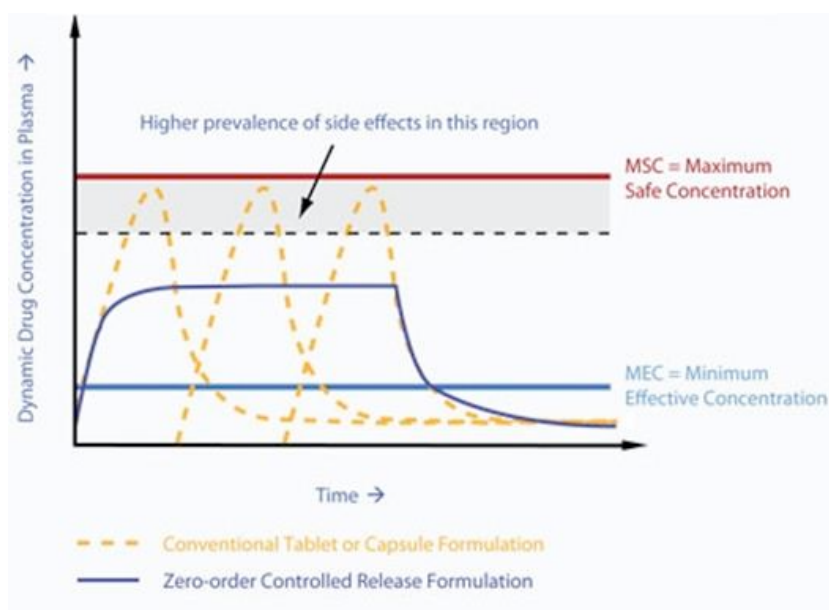


Figura 1. Variazione della concentrazione plasmatica di farmaco in funzione del tempo nelle formulazioni a rilascio convenzionale e modificato.

Tali sistemi colloidali possono essere di natura polimerica o di natura lipidica. L'impiego di sistemi polimerici può essere limitato a causa della potenziale tossicità dei polimeri, la necessità di utilizzare solventi organici e la mancanza di adeguati metodi di produzione su larga scala. Per questi motivi negli ultimi anni i nanocarrier basati su

lipidi (nanoemulsioni, liposomi, SLN, NLC) hanno suscitato grande interesse [Jawahar e Meyyanathan, 2012; Joshi e Muller, 2009; Jun e Shi-wen, 2007; Muller e Keck, 2004].

I primi sistemi lipidici messi a punto sono state le nanoemulsioni olio in acqua (O/W) [Tamjidi et al., 2013]. Il loro uso è tuttavia limitato a causa di problemi di instabilità dovuti soprattutto alla rapida fuoriuscita, tramite diffusione, del farmaco presente all'interno delle goccioline lipidiche. Questo inconveniente può essere superato incorporando le molecole di farmaco in una fase solida, riducendone la mobilità e la velocità di rilascio [Westesen et al., 1997].

Sono stati quindi sviluppati altri carrier colloidali lipidici come i liposomi, costituiti da vescicole sferiche formate da un doppio strato fosfolipidico che racchiude un core acquoso (Fig. 2).

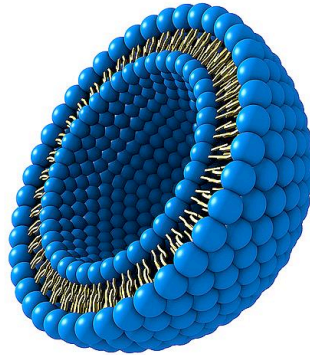


Figura 2. Struttura di un liposoma.

Nonostante tali sistemi offrano alcuni vantaggi come incapsulamento sia di farmaci idrofili (nel core acquoso) che lipofili (all'interno del doppio strato fosfolipidico), ridotta tossicità e possibilità di produzione su larga scala, allo stesso tempo presentano diversi svantaggi, tra cui:

- scarsa stabilità fisica;
- scarsa riproducibilità;
- bassa capacità di intrappolamento;
- rapida clearance ematica dovuta all'azione del sistema reticolo-endoteliale (RES);
- difficoltà di sterilizzazione, in quanto suscettibili al calore e ad alcuni tipi di radiazioni.

1.1 Nanoparticelle Lipidiche Solide (SLN)

Le nanoparticelle lipidiche solide (SLN), messe a punto nei primi anni '90 per combinare i vantaggi dei sistemi colloidali descritti in precedenza, evitandone gli svantaggi, sono sistemi nanoparticellari costituiti da una matrice lipidica solida, sia a temperatura ambiente che corporea, stabilizzati da tensioattivi. Le particelle, aventi diametro medio compreso tra 10 e 500 nm, possono essere costituite da lipidi di diversa natura (trigliceridi purificati, gliceridi parziali, acidi grassi, steroidi, cere ecc.). Il fatto che la matrice sia costituita da lipidi fisiologici rappresenta un grande vantaggio delle SLN, dal momento che si riduce il rischio di tossicità acuta e cronica.

Gli agenti emulsionanti impiegati sono molteplici e stabilizzano il sistema colloidale impedendo l'aggregazione delle nanoparticelle [Severino et al., 2014; Carrillo et al., 2013; Doktorovova et al., 2011]. La scelta dei tensioattivi da utilizzare dipende dalla via di somministrazione ed è più limitata nel caso di somministrazioni per via parenterale.

I vantaggi legati all'utilizzo di SLN come sistemi a rilascio modificato sono molteplici:

- possibilità di controllare il rilascio e il direccionamento del farmaco verso il sito target;
- aumento della stabilità del farmaco;
- diminuzione del volume di distribuzione del farmaco;
- assenza di tossicità del carrier;
- assenza di solventi organici nella fase di preparazione;
- possibilità di sterilizzazione e produzione su larga scala;
- ampio spettro di applicazione;
- possibilità di targeting attivo modificando la superficie con agenti direzionanti [Mehnert et Mäder, 2001].

Tuttavia, le SLN presentano anche diversi svantaggi tra cui una limitata drug loading e l'espulsione del farmaco (burst release) in seguito a transizioni polimorfiche durante la conservazione, in modo particolare se la matrice lipidica è costituita da molecole simili. Il passaggio spontaneo da una forma metastabile α ad una forma β più stabile porta alla formazione di una struttura cristallina altamente ordinata, riducendo lo spazio disponibile per l'intrappolamento delle molecole di farmaco che vengono quindi espulse dal sistema [Müller et al., 2002, Tamjidi et al., 2013].

1.2 Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC)

I carrier lipidici nanostrutturati, o NLC, sono SLN modificate in cui la matrice lipidica è costituita o da una miscela di lipidi solidi differenti, oppure da una miscela di lipidi solidi (grassi) e liquidi (oli) a temperatura ambiente. Le NLC presentano una struttura cristallina meno ordinata che consente di superare gli inconvenienti associati all'utilizzo delle SLN. E' possibile infatti ottenere valori di drug loading più elevati dal momento che il farmaco si solubilizza meglio nel lipide liquido, ed un rilascio più controllato poiché le transizioni polimorfe nella miscela lipidica avvengono più lentamente [Beloqui et al., 2015; Tamjidi et al., 2013; Müller et al., 2002].

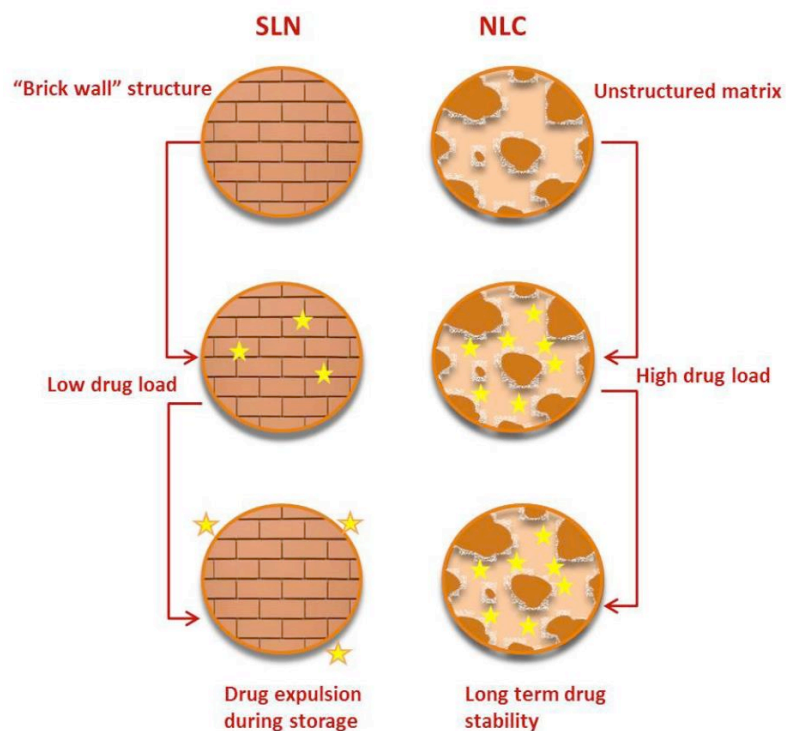


Figura 3. Illustrazione schematica delle strutture di SLN e NLC

Tre tipi di strutture sono stati proposti per le NLC (Fig. 4), ognuna delle quali può essere ottenuta in base alla composizione della formulazione e ai parametri di produzione:

- NLC di tipo imperfetto → Le distanze tra le catene di acidi grassi dei gliceridi e le imperfezioni nel cristallo, prerequisiti per un buon intrappolamento del farmaco, possono essere incrementate utilizzando gliceridi composti da acidi grassi molto diversi tra loro (in lunghezza di catene di C, miscele di acidi grassi saturi e insaturi ecc..). Questo tipo di NLC si ottiene

quindi miscelando lipidi solidi con lipidi liquidi chimicamente molto diversi.

- NLC di tipo amorfo → Sono caratterizzate da una struttura amorfa derivata da miscele lipidiche contenenti particolari lipidi quali isopropilmiristato o trigliceridi a media catena. Le particelle, dopo raffreddamento, solidificano senza cristallizzare: viene così evitata l'espulsione del farmaco causata dalla transizione polimorfa del lipide solido.
- NLC di tipo multiplo → Sono costituite da una matrice lipidica solida contenente nanocompartimenti di lipide liquido. Questi particolari sistemi, che ricordano le emulsioni O/A/O, vengono preparati miscelando lipidi solidi e liquidi: i due grassi sono miscibili alla temperatura di fusione del lipide solido ma, al di sotto di essa, i due lipidi si separano, portando alla formazione di goccioline di dimensioni nanometriche di olio disperse nella matrice lipidica solida.

L'aumentata solubilità delle sostanze lipofile nel lipide liquido permette di incrementare la drug loading del sistema. In tali sistemi la velocità di rilascio del farmaco risulta essere controllata

dalla componente lipidica solida che circonda i nanocompartimenti di olio [Tamjidi et al., 2013].

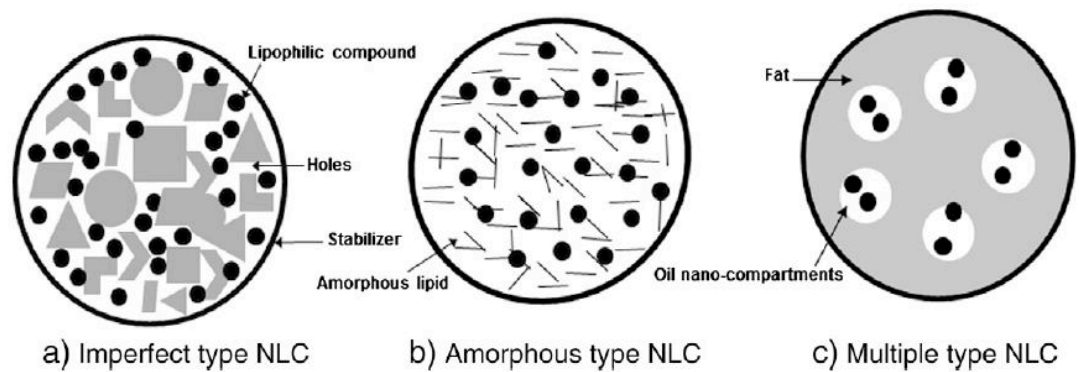


Figura 4. Illustrazione dei diversi tipi di strutture delle NLC

1.3 Tecniche di preparazione

Le nanoparticelle lipidiche possono essere prodotte tramite diverse tecniche:

- Omogeneizzazione ad alta pressione (a caldo o a freddo);
- Microemulsione;
- Emulsificazione-evaporazione del solvente;
- Precipitazione-diffusione del solvente.

1.3.1 Omogeneizzazione ad alta pressione (a caldo e a freddo)

Una delle tecniche più utilizzate per la produzione di nanoparticelle lipidiche è quella dell'omogeneizzazione ad alta pressione, che può essere effettuata a caldo o a freddo. In entrambi i casi il farmaco viene dissolto o solubilizzato nella matrice lipidica fusa (5-10°C sopra la temperatura di fusione). Nella tecnica di omogeneizzazione a caldo la miscela ottenuta viene dispersa sotto agitazione in una soluzione acquosa di tensioattivo, precedentemente portata alla stessa temperatura dei lipidi. Si ottiene così una pre-emulsione che viene omogeneizzata tramite omogeneizzatori ad alta pressione e successivamente raffreddata per fare cristallizzare i lipidi ed ottenere nanoparticelle lipidiche solide.

La tecnica a caldo non può essere però utilizzata per incorporare nelle nanoparticelle farmaci termolabili (che verrebbero degradati per effetto delle alte temperature) o idrofili (che potrebbero ripartirsi nella fase acquosa durante l'omogeneizzazione) [Mehnert et Mäder, 2001; Wissing et al., 2004]. In questi casi si può utilizzare la tecnica dell'omogeneizzazione a freddo, che prevede il raffreddamento della miscela contenente lipidi fusi e farmaco con conseguente formazione di microparticelle lipidiche (50-100 µm). Tali microparticelle vengono

successivamente disperse in una soluzione fredda di tensioattivo, fino ad ottenere una pre-sospensione che viene omogeneizzata a temperatura ambiente o inferiore. Le elevate forze cavitazionali applicate alla sospensione permettono la disgregazione delle microparticelle con conseguente formazione delle nanoparticelle. Tuttavia anche questa tecnica presenta dei limiti in quanto le particelle lipidiche ottenute possiedono un elevato indice di polidispersità e dimensioni maggiori rispetto all'omonima tecnica eseguita a caldo [De Jesus et Zuhorn, 2015; Mehnert et Mäder, 2001; Wissing et al., 2004; Muller et al., 2000].

1.3.2 Microemulsione

Tale tecnica prevede la fusione dei lipidi e l'aggiunta, sotto agitazione, prima del farmaco e successivamente di soluzioni acquose contenenti tensioattivo e cotensioattivo (lecitine e sali biliari), preventivamente riscaldate alla stessa temperatura della fase lipofila. Si ottiene una microemulsione calda che, dispersa in una soluzione acquosa fredda a 2-3 °C, sotto agitazione meccanica, porta alla formazione di una sospensione nanoparticellare. L'elevato gradiente di temperatura è necessario per favorire la rapida cristallizzazione del

lipide, evitando l'aggregazione delle particelle. Parametri importanti che consentono di rendere riproducibile la preparazione sono la temperatura della microemulsione, la temperatura del mezzo acquoso disperdente, la velocità di agitazione, la concentrazione e il tipo di tensioattivi utilizzati [De Jesus et Zuhorn, 2015; Mehnert et Mäder, 2001; Wissing et al 2004; Muller et al., 2000].

1.3.3 Emulsificazione-evaporazione del solvente

Tale tecnica prevede che i materiali lipidici e il farmaco vengano dissolti in un solvente organico immiscibile con l'acqua (ad esempio cicloesano, cloroformio o diclorometano), che viene poi emulsificato in una fase acquosa. In seguito all'evaporazione del solvente, la dispersione di nanoparticelle si ottiene per precipitazione dei lipidi nel mezzo acquoso.

1.3.4 Precipitazione-diffusione del solvente

Il farmaco viene addizionato alla miscela di lipidi solidi fusi alla quale viene successivamente aggiunta una soluzione etanolica contenente il tensioattivo. La soluzione etanolica calda risultante viene quindi precipitata, sotto agitazione meccanica, in una soluzione acquosa

a 2-3°C contenente il cotensioattivo: la diffusione dell'etanolo nell'acqua determina la precipitazione del lipide e la formazione delle nanoparticelle. L'eventuale residuo di solvente organico viene completamente allontanato tramite il processo di purificazione [De Jesus et Zuhorn., 2015; Muller et al., 2000].

1.4 Caratterizzazione chimico-fisica

Una caratterizzazione adeguata dei sistemi nanoparticellari è fondamentale per valutare la qualità del prodotto finale. Dal punto di vista chimico-fisico, le particelle possono essere caratterizzate in termini di:

- dimensione e indice di polidispersità (PDI);
- potenziale zeta;
- morfologia;
- grado di cristallinità e modifiche nella struttura cristallina del lipide.

1.4.1 Dimensione e indice di polidispersità (PDI)

Le tecniche di Spettroscopia di Correlazione Fotonica (PCS) e Diffrazione Laser (LD) sono quelle più utilizzate per misurare la dimensione delle particelle. Nella tecnica PCS la particella, dispersa in una sospensione stabile, viene colpita da un raggio laser e vengono misurate le variazioni d'intensità della luce diffusa in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dai movimenti browniani delle particelle all'origine dello scattering [Mehnert et Mäder, 2001]. A parità di temperatura e di viscosità, le particelle con diametro più piccolo si muoveranno più velocemente creando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering; al contrario le particelle di dimensioni maggiori si muoveranno meno velocemente, producendo variazioni d'intensità lente. La PCS è utilizzabile per misurare particelle con dimensione non superiore a 3 micron.

Per determinare la dimensione di particelle con diametro maggiore è più opportuno utilizzare la tecnica della LD, fondata sul principio che le particelle illuminate da un fascio laser diffondono la luce ad un angolo correlato alla loro dimensione. Al diminuire della dimensione delle particelle, l'angolo osservato di scattering (diffusione) aumenta in maniera logaritmica. L'intensità di scattering dipende

anch'essa dalle dimensioni delle particelle e diminuisce, con una buona approssimazione, in relazione alla superficie della sezione trasversale della particella. Semplificando, particelle grandi diffondono la luce con angoli stretti ed alta intensità, mentre le particelle piccole con angoli più ampi e bassa intensità [Mehnert et Mäder, 2001].

L'indice di polidispersità delle particelle o PDI, determinato tramite tecnica PCS, indica il grado di omogeneità del sistema. Valori di PDI inferiori a 0.3 indicano che il sistema nanoparticellare è omogeneo (bassa polidispersità) [Muller et al., 2000; Das et Chaudhury, 2011].

1.4.2 Potenziale zeta

Il potenziale zeta (ζ -potential) indica la carica superficiale che una particella colloidale acquisisce in un determinato mezzo disperdente. Particelle con elevata carica superficiale (positiva o negativa) si respingono, mentre se le cariche superficiali diminuiscono in valore assoluto, anche le forze repulsive diminuiranno e non saranno più sufficienti a contrastare le forze di attrazione portando, quindi, alla formazione di aggregati.

Valori di ζ -potential (positivo o negativo) intorno a 25-30 mV sono di solito associati ad un'elevata stabilità della dispersione nanoparticellare [Das e Chaudhury, 2011; Muller e coll., 2000; Tamjidi et al., 2013; Mitri et al, 2011; Lakshmi et Kumar, 2010]. La carica superficiale delle nanoparticelle lipidiche può inoltre facilitare le interazioni con il sito target se quest'ultimo presenta carica netta di segno opposto [De Jesus et Zuhorn, 2015].

1.4.3 Morfologia

Per determinare la morfologia delle particelle e la presenza di aggregati vengono utilizzate due tecniche di Microscopia Elettronica, la SEM (Microscopia Elettronica a Scansione) e la TEM (Microscopia Elettronica a Trasmissione).

La SEM, essendo relativamente rapida e non distruttiva, è considerata l'approccio più immediato per lo studio delle superfici dei materiali.

Il Microscopio a Scansione Elettronica sfrutta come sorgente di radiazioni un fascio di elettroni generato da un cannone elettrodico (catodo). Tale fascio, condensato da lenti collimatrici e focalizzato sul campione, è attratto verso l'anodo. Il campione viene preventivamente

trattato sottovuoto con polvere di oro per essere reso conducibile. Il fascio elettronico colpisce il campione producendo elettroni secondari e retrodiffusi. I segnali elettrici ottenuti vengono amplificati, convertiti in pixel ed elaborati da un computer.

La Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) permette di ottenere da un campione sufficientemente assottigliato ($< 0.1\mu\text{m}$), immagini ad alta risoluzione prodotte da elettroni ad alta energia (100 KeV) trasmessi su uno schermo fluorescente o su una pellicola fotografica. Le immagini vengono generate usando elettroni al posto della luce visibile che viene usata nel microscopio ottico. Ciò permette un ingrandimento con elevata risoluzione fino a 800 volte maggiore rispetto al microscopio ottico [Reimer et Kohl, 2008].

Un'altra tecnica molto utilizzata nella caratterizzazione delle nanoparticelle lipidiche è la AFM (Microscopia a Forza Atomica). Con questa tecnica è possibile ottenere immagini tridimensionali diversamente dalle immagini bidimensionali ottenibili con le tecniche SEM e TEM. L'AFM fornisce informazioni strutturali, meccaniche, funzionali e topografiche di particelle aventi un range dimensionale compreso tra Angstrom e nanometri. Viene sfruttata la forza di attrazione che agisce tra la superficie del campione e la punta di una

sonda avente un raggio di pochi nanometri. E' inoltre possibile analizzare direttamente campioni idratati dal momento che non è richiesto il vuoto durante le operazioni e il campione non deve essere reso conduttivo [Das et Chaudhury, 2011].

1.4.4 Grado di cristallinità e modifiche nella struttura cristallina del lipide

Determinare il grado di cristallinità ed eventuali modifiche nella struttura cristallina dei lipidi che costituiscono la matrice delle nanoparticelle è fondamentale per prevedere l'insorgenza di eventuali transizioni polimorfe che condizionerebbero la quantità di farmaco totale presente nel sistema e la sua velocità di rilascio.

In particolare, per valutare la cristallinità dei lipidi vengono utilizzate principalmente due tecniche: la Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) e la Diffrazione a Raggi X (XRD).

La DSC fornisce informazioni sul comportamento relativo alla cristallizzazione dei componenti sia solidi che liquidi presenti nel sistema, mentre tramite la XRD è possibile identificare specifiche strutture cristalline.

La DSC misura la temperatura e il flusso di calore associato alle transizioni che avvengono in un campione. Il principio di base di questa tecnica consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata. In particolare viene misurata la differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento mentre i due vengono sottoposti ad un programma controllato di temperatura.

I processi esotermici, come la cristallizzazione, vengono rilevati da una deflessione che è indice di un decremento del flusso di calore; al contrario, per i fenomeni endotermici come la fusione, sul termogramma si osserverà un picco rivolto verso l'alto che corrisponde all'aumento del flusso di calore (Fig. 5).

L'area sottesa al picco (ΔH) corrisponde alla quantità di calore assorbita o ceduta dal campione nell'intervallo considerato.

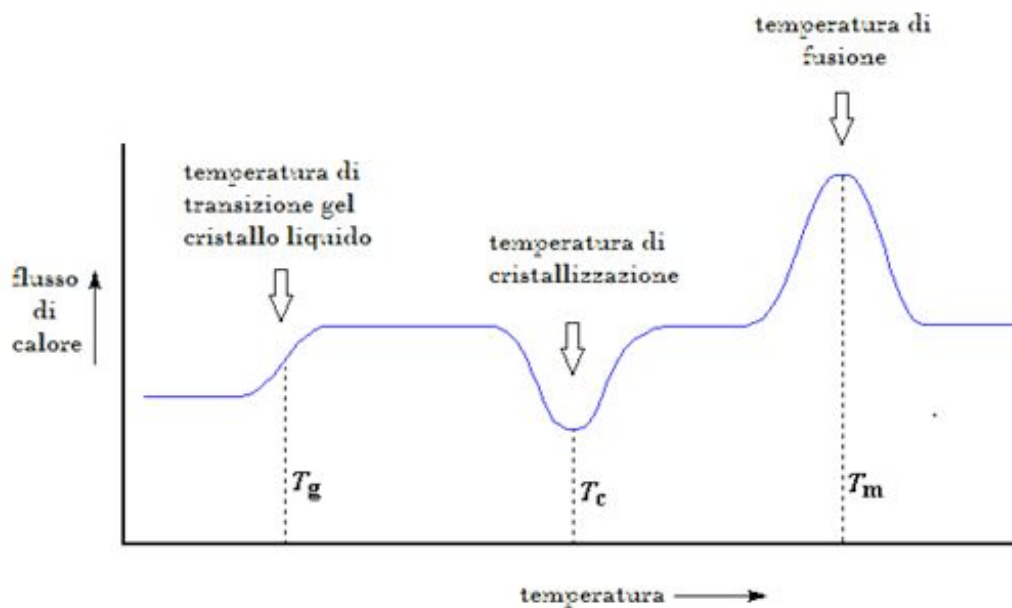


Figura 5. Variazioni del flusso di calore tra le termocoppie in base al tipo di modificazione chimico-fisica subita dal campione sottoposto a riscaldamento costante.

Nella tecnica dell'XRD, i diversi angoli di diffrazione di un fascio monocromatico di raggi X che colpisce il campione permettono di evidenziare la struttura cristallina dello stesso ed eventuali modifiche strutturali avvenute a carico dei lipidi. L'intensità e la posizione delle diffrazioni sono caratteristiche di una specifica struttura cristallina; in questo modo è possibile prevedere gli arrangiamenti delle molecole lipidiche e identificare le molecole di farmaco presenti nel sistema [Mehnert et Mader, 2001].

1.5 Caratterizzazione tecnologico-farmaceutica

Oltre alla caratterizzazione chimico-fisica le nanoparticelle vengono caratterizzate anche dal punto di vista tecnologico-farmaceutico in termini di:

- drug loading (capacità di caricamento del farmaco);
- cinetiche di rilascio del farmaco.

1.5.1 Drug loading

La drug loading (DL) rappresenta il rapporto percentuale in peso (% p/p) tra il farmaco incorporato e la quantità totale di nanoparticelle. È influenzata da diversi fattori quali la solubilità del farmaco nei lipidi, la composizione della matrice, le caratteristiche polimorfiche e le proprietà chimico-fisiche dei lipidi. Requisito fondamentale per ottenere elevati valori drug loading è la solubilità del farmaco nel lipide fuso [Muller e coll., 2000].

1.5.2 Cinetiche di rilascio

La velocità con cui il farmaco viene rilasciato dalle nanoparticelle dipende da vari fattori tra cui solubilità del farmaco nel lipide, struttura chimico-fisica e stato polimorfico del lipide.

Il rilascio del farmaco avviene solitamente in modo bifasico: inizialmente si ha un “burst release” dovuto al desorbimento del farmaco adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle e in un secondo momento viene rilasciato in maniera controllata il farmaco intrappolato all'interno.

Per spiegare come un farmaco può incorporarsi e distribuirsi nel sistema nanoparticellare sono stati proposti tre modelli:

- il “modello della matrice omogenea”, in cui il farmaco è disperso a livello molecolare nella matrice lipidica e il rilascio avviene tramite la sua diffusione attraverso la matrice o per degradazione di quest'ultima [Das et Chaudhury, 2011];
- il “drug-enriched shell model”, in cui il sistema presenta un nucleo centrale lipidico ed un guscio esterno arricchito di farmaco. Tale conformazione è principalmente responsabile del burst release;

- il “drug-enriched core model”, che si verifica quando, durante la preparazione del sistema, il farmaco precipita prima della ricristallizzazione del lipide. In questo modo le molecole di principio attivo si concentrano nel core della nanoparticella e vengono rilasciate in maniera controllata.

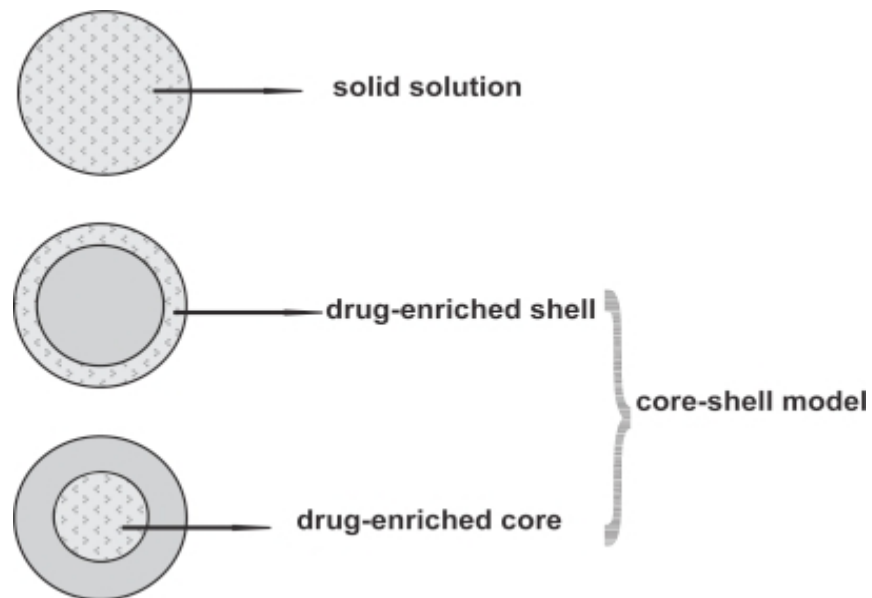


Figura 6. Modelli di incorporazione del farmaco nelle nanoparticelle: Modello della matrice omogenea (in alto); modello drug-enriched shell (al centro); modello drug-enriched core (in basso).

La velocità di rilascio di un principio attivo è influenzata anche dalla temperatura (quando le nanoparticelle sono preparate con tecnica HPH) e dalla quantità di tensioattivi impiegati nella preparazione del sistema: elevate temperature di esercizio ed elevate concentrazioni di

tensioattivo aumentano la solubilità del farmaco nella fase acquosa della pre-emulsione, favorendo un maggiore “burst effect”.

1.6 Nanoparticelle nella terapia del cancro

1.6.1 Chemioterapia

Negli ultimi anni, lo studio e la comprensione del microambiente tumorale hanno facilitato lo sviluppo di nuove terapie contro il cancro.

Il tessuto canceroso, che differisce in maniera sostanziale dal tessuto sano circostante, è costituito da compartimenti cellulari e non cellulari (vascolari e interstiziali).

Nel compartimento non-cellulare la vascolarizzazione è molto eterogenea: aree densamente vascolarizzate che ricevono un elevato apporto di ossigeno e nutrienti si alternano a regioni di necrosi, in cui l'afflusso di sangue è scarso. Altra caratteristica che contraddistingue i tessuti tumorali è l'angiogenesi, ovvero la sintesi di nuovi vasi sanguigni che si presentano molto tortuosi e con ampie fenestrature (tra 380 e 780 nm) a livello della membrana basale. Inoltre, l'aumentata sintesi di molecole quali bradichinina, prostaglandine, ossido nitrico e

del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), contribuisce a rendere il tessuto canceroso altamente permeabile.

Le cellule tumorali sono circondate dall'ambiente interstiziale, costituito da collagene ed un network di fibre elastiche. Diversamente dai tessuti sani, nell'interstizio tumorale la pressione interstiziale è elevata ed il drenaggio linfatico scarso. Quest'ultimo, insieme alle irregolarità dell'architettura vascolare, è responsabile del cosiddetto effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention).

Sebbene l'effetto EPR contribuisca a indirizzare gli agenti chemioterapici nelle regioni ben vascolarizzate della massa tumorale, le molecole di farmaco spesso non riescono a raggiungere le regioni poco vascolarizzate che, di conseguenza, non possono subire l'azione citotossica. Inoltre, la riduzione dell'ossigeno disponibile causata dalla mancanza di vasi sanguigni determina glicolisi anaerobica con produzione di acido lattico. L'acidità del microambiente che ne consegue, a sua volta, conferisce resistenza ai farmaci basici: questi ultimi infatti, presentandosi in forma ionizzata, non riescono a diffondere attraverso le membrane e raggiungere le cellule. L'insieme di questi fattori costituisce i meccanismi di farmaco-resistenza non cellulare [Thakor et Gambhir, 2013].

La farmaco-resistenza cellulare è dovuta invece all'alterazione, nelle cellule tumorali, di alcuni processi biochimici quali apoptosi, meccanismi di trasporto, attività enzimatiche. Un esempio è rappresentato dal sistema di efflusso della glicoproteina P, responsabile della multi drug-resistance (MDR). La glicoproteina P, iperespressa in molti tipi di cellule tumorali, permette l'estruzione dalla cellula di diversi xenobiotici carichi positivamente, tra cui alcuni agenti chemioterapici [Brigger e coll., 2002; Pillai, 2014.]

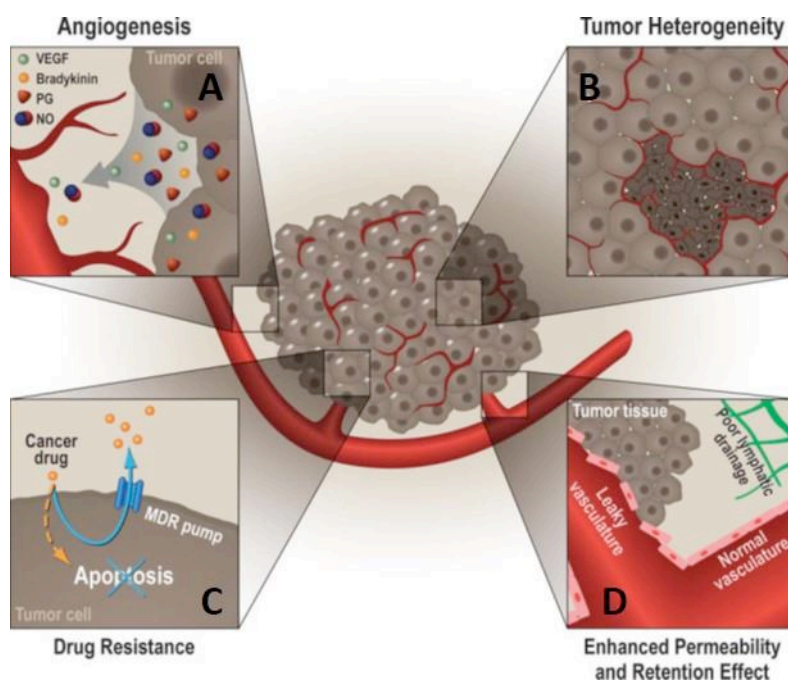


Figura 7. Il microambiente tumorale. Angiogenesi casata dal rilascio di VEGF, bradichinina, ossido nitrico e prostaglandine (A); eterogeneità del tessuto tumorale, con aree di necrosi circondate da aree abbondantemente perfuse (B); esempio di resistenza a farmaci dovuta a pompe di efflusso (C); effetto EPR con accumulo del farmaco nel sito tumorale.

Oltre ai meccanismi di farmaco resistenza, altro grande limite della chemioterapia convenzionale è rappresentato dall'insorgenza di effetti collaterali dovuti alla scarsa selettività degli agenti citotossici, che esplicano la loro azione sia sui tessuti cancerosi che su quelli sani.

Risulta quindi evidente la necessità di terapie innovative, in grado di superare i limiti dovuti ai meccanismi di farmaco-resistenza (cellulare e non cellulare), favorire l'accumulo del farmaco a livello della massa tumorale, riducendone così la dose da somministrare ed i conseguenti effetti collaterali. A tal proposito, l'utilizzo di sistemi colloidali in grado di incapsulare il farmaco e veicolarlo nel sito tumorale, tramite targeting passivo (sfruttando l'effetto EPR) (Fig. 8), o attivo (tramite specifiche interazioni ligando-recettore), rappresenta una strategia promettente.

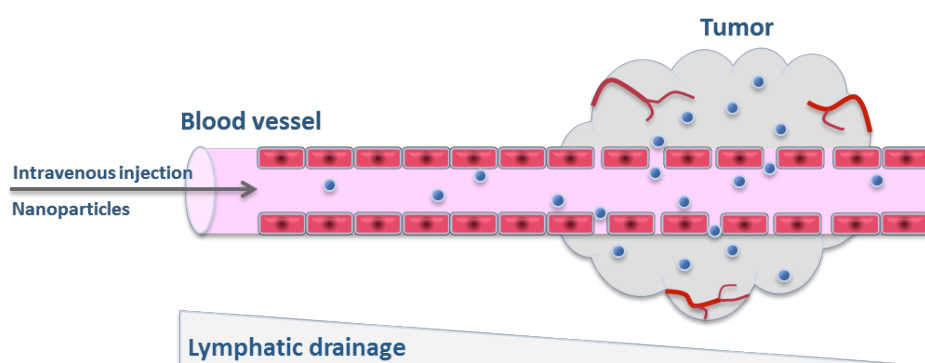


Figura 8. Accumulo di sistemi nanoparticellari nella massa tumorale tramite effetto EPR.

Diversi sono i farmaci chemioterapici sotto forma di nano e micro sistemi, prevalentemente liposomiali e polimerici, già stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso clinico. Nel 1995, la prima formulazione liposomiale di doxorubicina (Doxil®) è stata approvata per il trattamento del sarcoma di Kaposi, ed è attualmente indicata anche per il trattamento del carcinoma ovarico e della mammella. Altro noto esempio di formulazione già immessa in commercio è l'Abraxane® (paclitaxel veicolato in nanoparticelle di albumina), approvato nel 2005 per il trattamento del tumore metastatico alla mammella.

Numerose altre formulazioni invece si trovano attualmente in fase 2 e 3 degli studi clinici (Lipoplatin®, ThermoDox® etc...) [Pillai, 2014; Hull et al., 2014].

Tra i vari tipi di carrier colloidali, le SLN risultano particolarmente vantaggiose per la loro versatilità, biocompatibilità e capacità di incapsulare efficacemente sia molecole lipofile che idrofile [Wong et al., 2007].

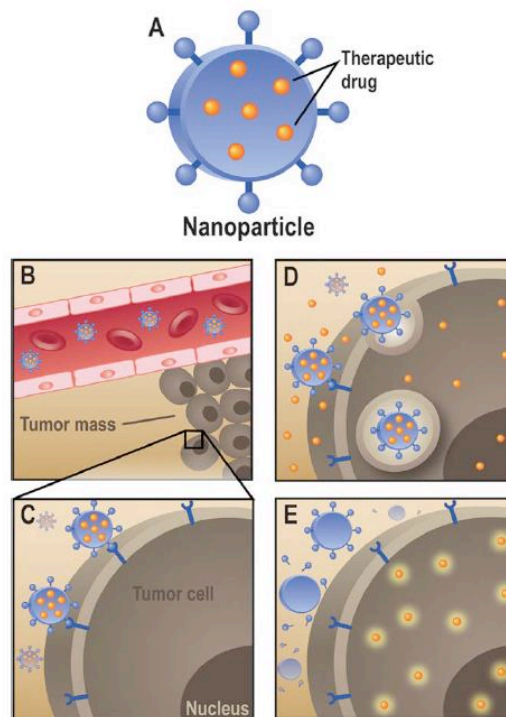


Figura 9. Utilizzo di sistemi nanoparticellari in chemioterapia. Il carrier contenente il farmaco (A) deve: rimanere stabile nel torrente ematico (B); veicolare il farmaco esclusivamente nelle cellule tumorali (C) e rilasciarlo al loro interno (D); essere degradato (E).

1.6.2 Nanoparticelle in terapia genica

In seguito ai progressi ottenuti nello studio della genomica umana, negli ultimi anni la terapia genica si è rivelata sempre più promettente nel trattamento di numerose patologie, comprese le neoplasie maligne [Severino et al., 2015; Jiang et al., 2012].

Con il termine terapia genica si intende l'introduzione di acidi nucleici esogeni (plasmidi, oligonucleotidi antisenso, siRNA) all'interno di cellule target, al fine di indurre l'espressione o la

soppressione di specifiche proteine coinvolte nell'insorgenza di determinate patologie [De Jesus et Zuhorn, 2015; Carrillo et al., 2013]. Il trasferimento di materiale genetico può essere condotto sia *in vivo* che *ex vivo*: nel primo caso, le cellule target vengono trattate direttamente nel paziente (es. iniezioni intradermiche in noduli metastatici, o intravesicali per il trattamento di tumori superficiali alla vescica); nel secondo caso invece cellule tumorali selezionate vengono prelevate e mantenute in coltura, manipolate tramite inserzione di materiale genetico e reintrodotte nel paziente [Cross et Burmester, 2006; Amer, 2014].

Per ottenere l'effetto terapeutico, è necessario che gli acidi nucleici attraversino le diverse barriere biologiche presenti nell'organismo e interagiscano con specifici bersagli intracellulari senza subire la degradazione ad opera delle nucleasi, enzimi presenti sia nei liquidi biologici (sangue) che nei compartimenti intracellulari (lisosomi e citoplasma) [Carrillo et al., 2013; Fabregas et al., 2014; De Jesus et al., 2015]

Sono stati quindi sviluppati diversi sistemi in grado di veicolare il materiale genetico proteggendolo dall'azione delle nucleasi, favorirne l'attraversamento delle membrane biologiche e garantirne il rilascio

intracellulare [De Jesus et Zuhorn, 2015; Del Pozo-Rodríguez et al., 2010].

I sistemi di veicolazione genica attualmente utilizzati possono essere suddivisi in due categorie [De Jesus et Zuhorn, 2015; Sun et al., 2014]:

- Vettori virali → virus (retrovirus, adenovirus, virus dell'herpes simplex, virus adeno-associato) geneticamente modificati. Questo tipo di vettori si contraddistingue per la sua elevata capacità trasfettante. Tuttavia, l'elevato potere immunogeno, i costi elevati, le limitate dimensioni del materiale genico veicolabile e i rischi potenziali associati all'utilizzo di preparazioni virali, li hanno resi vettori poco impiegati nel gene delivery [Severino et al., 2015; Sun et al., 2014].
- vettori non virali → gruppo eterogeneo di veicoli in grado di adsorbire sulla loro superficie materiale genetico mediante la formazione di interazioni elettrostatiche. Caratteristica che accomuna le varie tipologie di vettori non virali è la presenza di cariche superficiali positive, necessaria per permettere l'interazione con gli acidi

nucleici carichi negativamente [De Jesus et Zuhorn, 2015; Cortesi et al., 2014; Carrillo et al., 2013]. Rispetto ai vettori virali, quelli non virali possono essere opportunamente progettati e modificati chimicamente, al fine di ottenere un'elevata capacità trasfettante e un direzionamento specifico a cellule e tessuti. Inoltre, l'utilizzo di appropriati materiali non immunogenici, biocompatibili e biodegradabili, consente di ottenere sistemi con bassi profili di tossicità.

Diverse tipologie di vettori non virali sono state sviluppate e testate, inclusi dendrimeri, peptidi, nanoparticelle inorganiche, polimeri cationici e più recentemente liposomi e lipidi cationici [De Jesus et Zuhorn, 2015].

In particolare, diversi studi hanno dimostrato l'efficacia delle SLN cationiche come vettori non virali per gene delivery in quanto capaci di legare materiale genetico, proteggerlo dall'azione di enzimi di degradazione e veicolarlo all'interno di specifiche cellule, sia in vitro che in vivo [Doktorovova et al., 2011].

Si ritiene che l'interazione tra gli acidi nucleici e le SLN avvenga principalmente tramite adsorbimento degli acidi nucleici sulla superficie delle particelle, così come schematicamente mostrato in Figura 10, in seguito alla formazione di legami elettrostatici ed interazioni di tipo idrofobico.

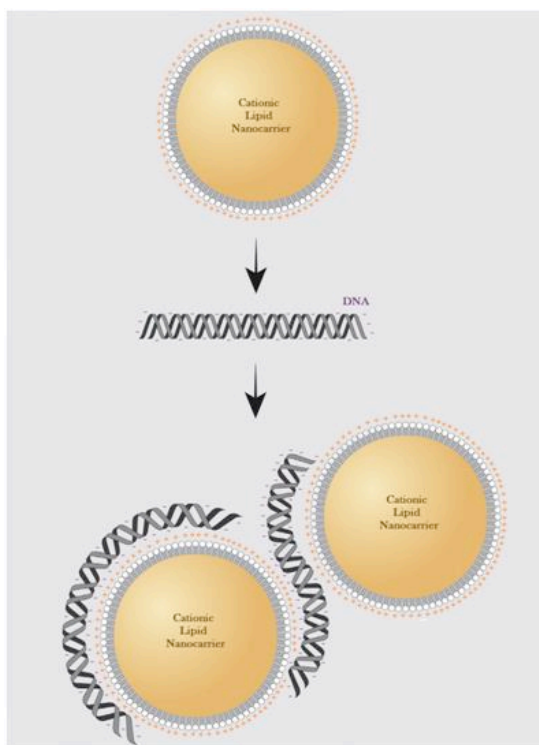


Figura 10. Interazione elettrostatica e formazione del complesso tra SLN cationiche e DNA.

Di conseguenza mentre la capacità di intrappolare farmaci lipofili dipende principalmente dalla struttura interna della matrice delle SLN,

nella veicolazione di acidi nucleici risultano più determinanti le proprietà di superficie.

Parametri quali proprietà fisiche del sistema, dimensioni, morfologia e stato di aggregazione condizionano in maniera notevole le interazioni tra le nanoparticelle e il materiale genico, determinando l'attività e la eventuale tossicità del complesso [De Jesus et Zuhorn, 2015].

Al fine di ottenere dei sistemi con adeguate caratteristiche chimico-fisiche e buona stabilità risulta importante la scelta dei lipidi. Ad esempio è più opportuno scegliere un lipide cationico che abbia una catena carboniosa di lunghezza simile a quella dei lipidi costituenti la matrice del sistema, in modo da ottenere maggiore affinità e interazione tra i vari componenti, aumentando quindi la stabilità del sistema. Inoltre, è preferibile utilizzare lipidi cationici costituiti da due catene carboniose, in quanto, quelli contenenti una singola catena presentano una maggiore citotossicità [Tabatt et al., 2004]. La Figura 11 mostra i lipidi cationici più comunemente impiegati nella preparazione di SLN cationiche.

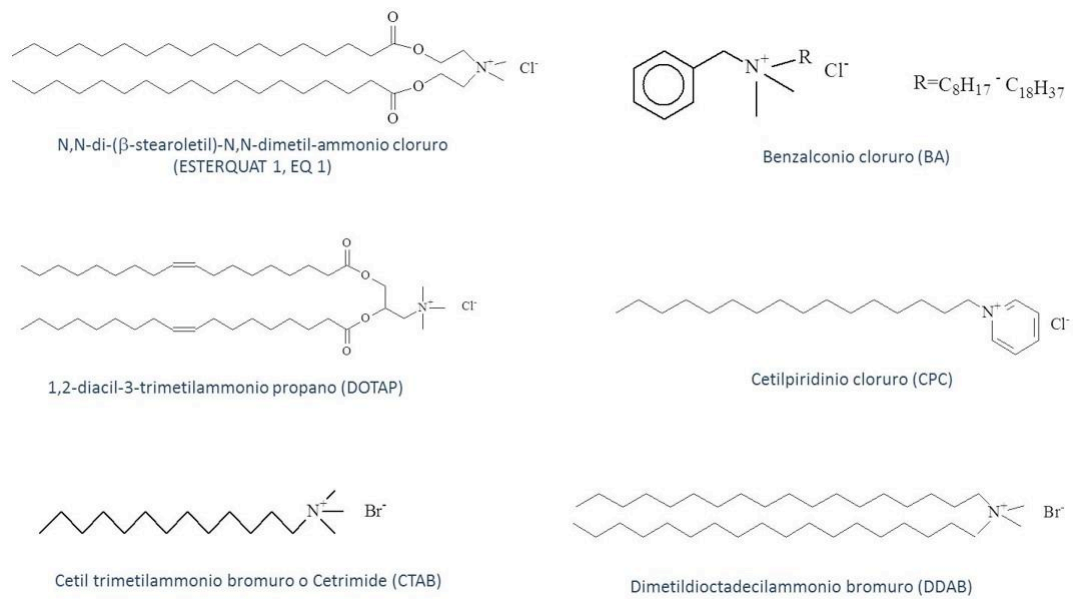


Figura 11. Lipidi cationici più comunemente impiegati nella preparazione di SLN cationiche.

Dalla quantità di lipide cationico incorporata nella matrice dipendono il valore di carica superficiale delle SLN e di conseguenza il rapporto di carica (+/-) dei complessi tra SLN e acidi nucleici. E' stato osservato che generalmente all'aumentare di questo valore aumentano sia l'efficacia di trasfezione che la stabilità dei complessi in presenza di proteine del siero.

La quantità di lipide cationico necessaria per immobilizzare gli acidi nucleici può però variare a sua volta dal tipo di lipide che costituisce il core delle SLN. [De Jesus et Zuhorn, 2015].

In conclusione, risulta necessario progettare e modificare opportunamente la formulazione dal punto di vista quali-quantitativo, in modo da poter conferire al sistema adeguata stabilità ed elevata capacità trasfettante.

1.7 Vie di somministrazione delle nanoparticelle nella terapia del cancro

1.7.1 Somministrazione sistemica

L'utilizzo sistemico di carrier colloidali è limitato dalla presenza del sistema MPS (Mononuclear Phagocytic System) e del RES (Reticulo Endothelial System), i cui componenti, riconoscendole come estranee, fagocitano le particelle e le trasportano a fegato, milza, polmoni e midollo osseo. Quest'effetto può essere sfruttato per direzionare farmaci chemioterapici ai tumori MPS localizzati (ad esempio epatocarcinoma, metastasi epatiche provenienti da tumori del tratto gastro-intestinale, tumori broncopolmonari, mieloma e leucemia), o in generale ai macrofagi, per il trattamento di infezioni del sistema MPS (tubercolosi, toxoplasmosi e leishmaniosi) [Wissing e coll., 2004].

La veicolazione di nanoparticelle in altri organi risulta invece difficile a causa del breve tempo di circolazione nel torrente ematico: mediamente infatti, l'emivita di una nanoparticella è di circa 3-5 minuti in seguito alla somministrazione per via endovenosa. Per il trattamento di tumori a organi non facenti parte del sistema MPS è dunque necessario modificare la superficie delle nanoparticelle in modo da renderle “stealth”, ovvero invisibili ai macrofagi.

L'uptake da parte dei macrofagi ed il conseguente destino biologico del carrier, sono fortemente correlati alle dimensioni e alle proprietà di superficie. In particolare, una dimensione inferiore a 100 nm e/o una superficie idrofilica possono ridurre l'opsonizzazione e la clearance ad opera del sistema MPS.

Per rendere le nanoparticelle “stealth” risulta utile usare polimeri idrofili come poloxameri, poliossietilenglicoli (PEG) o polisaccaridi. [Brigger et al., 2002; Wissing e coll., 2004].

1.7.2 Somministrazione locale

Diversamente dalle molecole idrosolubili, che vengono rapidamente assorbite tramite i capillari sanguigni, le particelle colloidali iniettate localmente si infiltrano nello spazio interstiziale

attorno al sito di iniezione e vengono gradualmente assorbite dai capillari linfatici. Per questo motivo, la somministrazione locale (nella regione peri-tumorale) o per via sottocutanea può essere sfruttata limitatamente per trattare tumori o metastasi linfatiche.

2. SCOPO DELLA TESI

Considerato il crescente interesse in campo tecnologico-farmaceutico rivolto alle nanoparticelle lipidiche e la loro versatilità di impiego, scopo del lavoro di dottorato è stato quello di realizzare diversi sistemi nanoparticellari in grado di veicolare sia farmaci che materiale genetico per applicazioni in terapia oncologica, in particolare per il trattamento del carcinoma epatocellulare e del carcinoma ovarico.

2.1 Il carcinoma epatocellulare (HCC)

Il carcinoma epatocellulare è la sesta neoplasia più frequente al mondo e rappresenta la seconda causa di morte per cancro [Holvoet et al., 2015]. L'incidenza dell'HCC aumenta con l'età ed in genere è più frequente negli uomini rispetto alle donne. È un tumore altamente aggressivo, spesso diagnosticato in fase avanzata, motivo per cui le terapie attualmente disponibili hanno un'efficacia limitata [Raza et Sood, 2014; Poma et al., 2006]. La sopravvivenza media nei pazienti affetti da HCC risulta essere infatti di pochi mesi [Wu et al., 2009].

Importanti fattori di rischio per l'insorgenza dell'HCC sono epatiti croniche e malattie metaboliche del fegato. In particolare la cirrosi epatica, che si sviluppa come conseguenza di un'inflammazione cronica, è considerata il fattore di rischio principale, dal momento che circa il 70-90% degli epatocarcinomi insorge in un fegato cirrotico (Fig. 12). La probabilità di sviluppare HCC è inoltre aumentata dall'esposizione a co-carcinogeni fra i quali l'alcool, il fumo di sigaretta e le aflatossine.

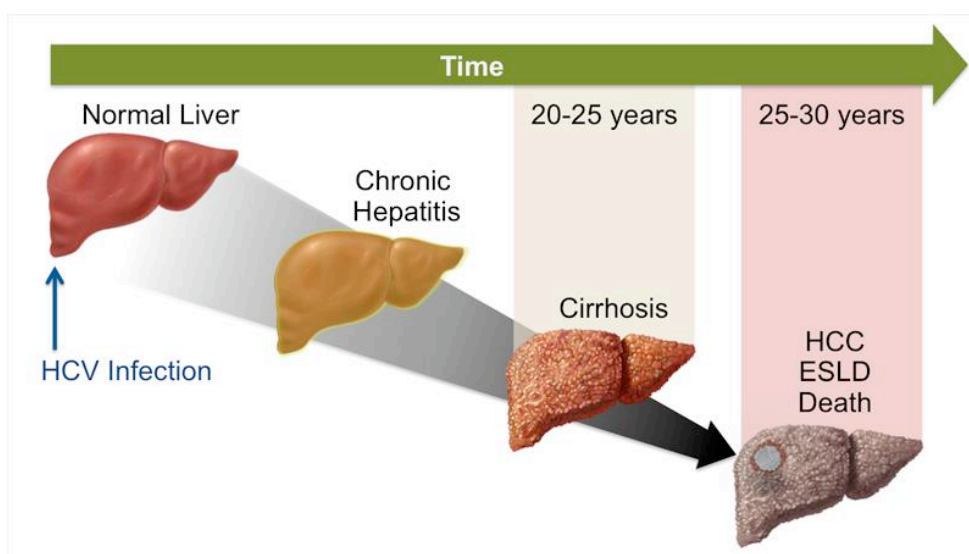


Figura 12. Sviluppo e tempi di insorgenza di HCC.

L'epatocarcinogenesi è un processo multifasico che comporta profonde alterazioni nell'espressione genica

responsabili dell'aumento della proliferazione cellulare e infine dello sviluppo del tumore. Il numero ed il tipo di fasi possono variare fra i casi di tumore (in base ai fattori di rischio incidenti), pur essendo costante il fenotipo tumorale promosso. È possibile comunque seguire un percorso generale di evoluzione neoplastica [Farazi e DePinho, 2006] (Fig. 13).

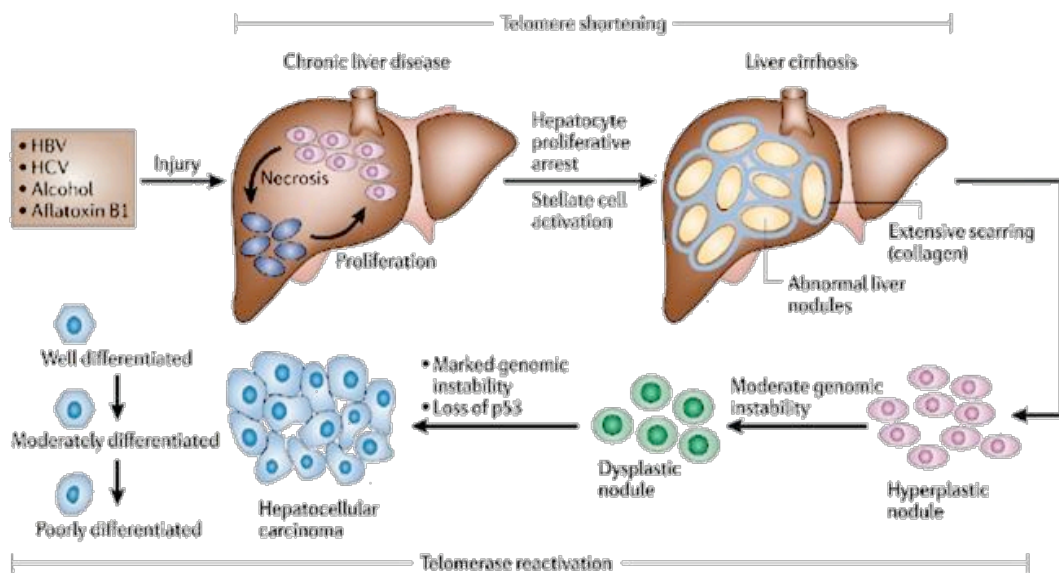


Figura 13. Progressione istopatologica del carcinoma epatocellulare.

Inizialmente, diversi agenti eziologici (HBV, HCV, aflatossina, alcool ecc.) possono determinare negli epatociti alterazioni genetiche che modificano l'espressione di geni regolatori del ciclo cellulare. E'

noto, per esempio, che il DNA del virus HBV possa integrarsi nel genoma dell'ospite [IARC????, 1994], e che metaboliti dell'aflatossina B siano reattivi nei confronti degli acidi nucleici [Garner et al., 1972], determinando aberrazioni genetiche.

Questi fattori di rischio sono in grado di scatenare una risposta immunitaria che induce infiammazione e necrosi degli epatociti. Conseguentemente, il danno epatico stimola la proliferazione cellulare, nel tentativo di rigenerazione. Ripetuti cicli di questo processo distruttivo-rigenerativo provocano l'espansione delle cellule danneggiate geneticamente.

Popolazioni cellulari selezionate proliferano organizzandosi in noduli cirrotici, che possono trasformarsi in noduli displastici pre-maligni, caratterizzati da minori capacità rigenerative. Anche l'interazione con il microambiente epatico creato (danno infiammatorio e conseguente rilascio di citochine e di altri mediatori) svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e progressione della neoplasia, come la neoformazione di vasi sanguigni e metastasi. [Bataller e Brenner, 2005].

Infine, diverse mutazioni a carico di oncogeni sono state descritte nell'HCC, inclusi p53, c-Myc, Hepatocyte Growth Factor (HGF),

Epidermal Growth Factor (EGF) and Insulin-like Growth Factor (IGF), RAS e β -catenina [Cervello et al., 2015].

La conoscenza dei meccanismi genetici e dei pathways implicati nell'insorgenza del carcinoma epatocellulare risulta di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuove terapie.

2.2 Il carcinoma ovarico

Il carcinoma ovarico è la sesta causa più comune di cancro nella popolazione femminile ed è considerata la causa principale di morte per tumori ginecologici nei paesi sviluppati, con circa 22.000 nuovi casi e 15.000 decessi per anno. I tumori ovarici vengono classificati in base al loro tessuto d'origine in:

- Tumori epiteliali → originano dalle cellule epiteliali che rivestono superficialmente le ovaie e costituiscono circa l'80-90% delle neoplasie ovariche maligne;
- Tumori germinali → originano dalle cellule germinali e rappresentano circa il 5% delle neoplasie ovariche maligne. Sono pressoché esclusivi dell'età giovane (infanzia e

adolescenza) e sono differenziabili dagli altri tumori maligni dell'ovaio perché determinano la produzione di marcatori tumorali riscontrabili nel sangue (come l'alfaproteina o la gonadotropina corionica) diversi da quelli prodotti dai tumori di origine epiteliale;

- Tumori stromali → originano dallo stroma gonadico (tessuto di sostegno dell'ovaio) e rappresentano circa il 4% delle neoplasie ovariche maligne. Risultano più facilmente diagnosticabili rispetto agli altri due tipi tumorali, in quanto determinano alterazioni endocrine con eccessiva produzione di ormoni sia femminili sia maschili. La maggior parte di questi tumori è caratterizzata da una bassa malignità [Vitale et al., 2013; Jelovac et Armstrong, 2011; AIRC, 2014] (Fig. 14).

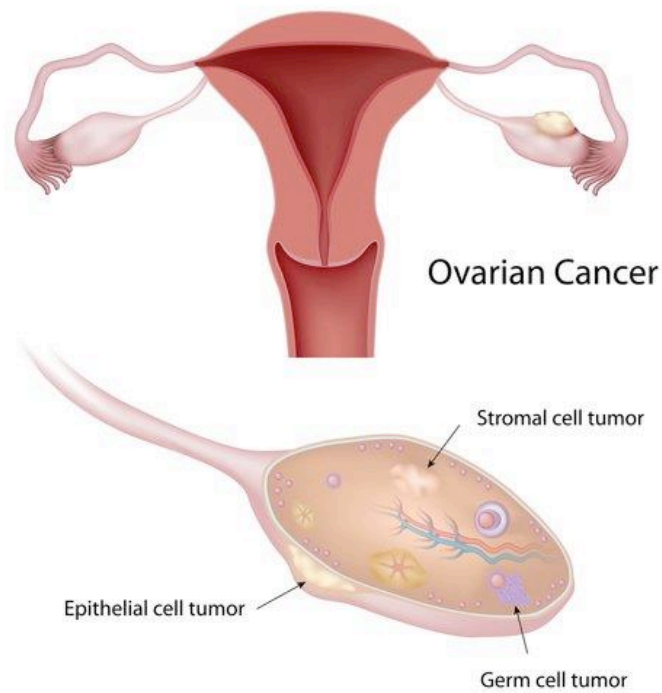


Figura 14. Rappresentazione schematica dei differenti tipi di carcinoma ovarico.

Tra i fattori associati al rischio di sviluppare neoplasie ovariche, è di grande rilevanza la storia familiare di carcinoma ovarico, con un aumento del rischio di 3.6 volte. Significativa è anche l'associazione tra carcinoma ovarico e tumore mammario.

L'assenza di un metodo di screening attendibile, unito ai sintomi aspecifici e all'indolente decorso della malattia, rendono difficile la diagnosi del tumore ovarico negli stadi iniziali. Inoltre, il dosaggio

routinario del marker CA-125 e le ecografie transvaginali non sono sufficienti per stabilire una diagnosi precoce della malattia.

Di conseguenza, in molti casi il carcinoma ovarico viene diagnosticato in fase già avanzata (stadio III o IV della classificazione FIGO) [Vitale et al., 2013].

Sebbene non sia ancora stato individuato un chiaro fattore eziologico responsabile dell'insorgenza della patologia, è stato osservato che il rischio di sviluppare tumore ovarico è direttamente proporzionale al numero di ovulazioni che si verificano in vita [Jelovac et Armstrong, 2011]. Dunque, i fattori associati alla riduzione del numero di ovulazioni, quali numero di gravidanze portate a termine, lunga durata del periodo di allattamento e uso di contraccettivi orali sono correlati ad una diminuzione del rischio di insorgenza della patologia. Al contrario, fattori associati ad un maggior numero di ovulazioni e/o esposizione agli estrogeni come la nulliparità, il menarca precoce o la menopausa tardiva ne incrementano il rischio. Inoltre, la presenza di condizioni infiammatorie (es. endometriosi) sembrano aumentare l'insorgenza del tumore ovarico, mentre la sterilizzazione tubarica e l'isterectomia la riducono. Nonostante i fattori ormonali, riproduttivi e ambientali (esposizione ad asbesto e talco, obesità e dieta

ricca di grassi) possano contribuire allo sviluppo di questa neoplasia, i fattori genetici risultano in ogni caso i più determinanti [Jelovac et Armstrong, 2011].

In particolare, le mutazioni dei geni BRCA rivestono particolare importanza nell'eziologia di alcuni tipi di tumori ovarici. Il gene BRCA1, situato nel cromosoma 17q ed il gene BRCA2, situato nel cromosoma 13q, svolgono un ruolo essenziale nei meccanismi di riparazione del DNA danneggiato e sembrano agire come oncosoppressori. Mutazioni a carico di questi geni risultano dunque in un accumulo di anomalie cromosomiche con aumento della probabilità di sviluppare neoplasie. Oltre alle mutazione dei geni BRCA, è stata osservata un'incidenza maggiore di carcinoma ovarico nelle donne con storia familiare di sindrome di Lynch 2 [Jelovac et Armstrong, 2011; Gorodnova et al., 2015].

La terapia attuale del carcinoma ovarico prevede interventi di chirurgia citoriduttiva seguiti dalla somministrazione, per via endovenosa o intraperitoneale, di chemioterapici a base di platino (es. cisplatino o carboplatino) e taxani (es. paclitaxel), utilizzati anche in combinazione tra loro. Nonostante ciò la comparsa di ricadute è un fenomeno frequente [Kim et al., 2011]. Le cause alla base della

resistenza ai chemioterapici sono multi-fattoriali e includono l'espressione della glicoproteina P, mutazioni del gene p53, alti livelli di espressione di Bcl-2 e altri geni coinvolti nella regolazione dell'apoptosi.

L'attivazione dell'apoptosi può avvenire attraverso due vie che convergono sulle stesse proteine effettrici, le caspasi. Nella via intrinseca (o mitocondriale) il controllo dell'apoptosi è garantito dalle proteine BCL, che agiscono mediante dimerizzazione e regolano la permeabilità della membrana mitocondriale, che determina a sua volta l'attivazione della caspasi 9. Le caspasi 8 e 10 sono coinvolte invece nella via estrinseca (o recettore-mediata), che ha inizio con il legame di "segnali di morte" tra cui TNF α , TNF β , FADD e FAS a specifici recettori sulla membrana cellulare. L'attivazione di entrambi i pathways apoptotici (intrinseco ed estrinseco) risulta in ogni caso nell'attivazione e clivaggio della pro-caspasi 3, terminando con la morte cellulare.

L'identificazione di nuove molecole capaci di superare i meccanismi di resistenza che limitano il successo dei chemioterapici attualmente utilizzati potrebbe essere di significativo impatto nella terapia del tumore ovarico [Wahl et al., 2007].

2.3 Sorafenib: meccanismo d'azione

Il sorafenib è un inibitore multichinasico approvato ed utilizzato come farmaco di prima scelta per il trattamento del carcinoma epatocellulare. Sebbene questo farmaco possa prolungare la sopravvivenza media di circa 3 mesi in pazienti con HCC in stadio avanzato, il suo uso in terapia è limitato dai suoi elevati costi e dagli importanti effetti collaterali [Raza et Sood, 2014].

Nonostante il meccanismo con cui il sorafenib agisce da anti-tumorale non sia stato ancora chiarito del tutto è noto che tale molecola interferisce con due processi biologici determinanti per la crescita tumorale: la proliferazione e l'angiogenesi, regolate dal pathway Ras/Raf/MEK/ERK (cascata delle MAP chinasi) e dalla secrezione autocrina/paracrina di VEGF e PDGF (Fig. 15).

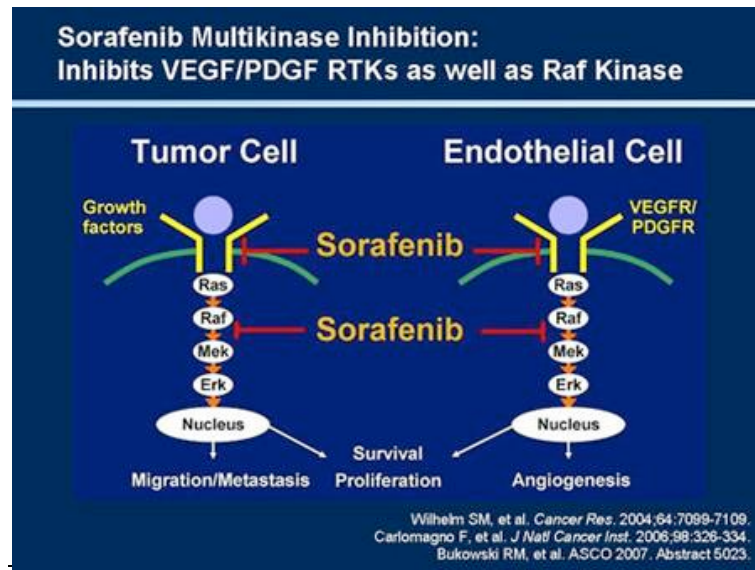


Figura 15. Meccanismo d'azione del Sorafenib

Il pathway delle mitogen activated protein kinase (MAPK), attivato da fattori di crescita e citochine, rappresenta una via di comunicazione attraverso la quale i segnali extracellulari possono influenzare l'espressione genica. Componente fondamentale è la proteina Ras, piccola proteina G monomerica mantenuta sulla superficie interna della membrana plasmatica da un gruppo lipidico. Nella sua forma attiva Ras richiama Raf, la quale, dopo essersi localizzata sulla membrana plasmatica, si attiva dando inizio ad una catena di reazioni di fosforilazione [Karp et al., 2003]. Raf media la fosforilazione di mitogen-activated protein kinase kinase (Mek1 e Mek2) in due residui di serina vicini (Ser218 e Ser222 in Mek1, Ser222

e Ser226 in Mek2). I principali substrati di Mek1 e Mek2 sono extracellular signal regulated kinase-1 e -2 (ERK1/2) che vengono fosforilati in specifici residui di tirosina e treonina. Questa serie di fosforilazioni consente la traslocazione al nucleo di Erk [Catalanotti et al., 2009]. Una volta nel nucleo, Erk fosforila e attiva la trascrizione di geni specifici tra cui c-fos e c-jun. I prodotti di questi geni, le proteine Fos e Jun, interagiscono e formano il fattore di trascrizione eterodimerico adaptor protein-1 (AP-1) [Karp et al., 2003]. Questo fattore trascrizionale attiva geni coinvolti nella proliferazione cellulare compresa la ciclina D1 che ha un ruolo fondamentale nel condurre la cellula dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare (Fig. 16).

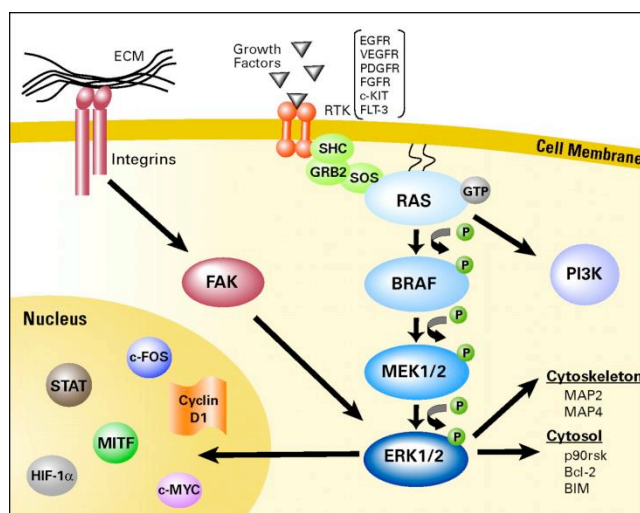


Figura 16. Pathway Ras/Raf/MEK/Erk.

L'espressione e l'attività funzionale (determinata per fosforilazione) di MEK1-2 ed ERK1-2 sono incrementate nel tessuto tumorale di fegato, rispetto alla regione adiacente non tumorale [Schmidt et al., 1997]. Questi dati suggeriscono un'attivazione costitutiva di Ras e/o Raf a monte del pathway delle MAP chinasi. Dal momento che la chinasi Ras è raramente mutata nell'HCC, così come l'isoforma B del suo effettore Raf, la loro attivazione aberrante non può essere di natura mutazionale. Invece il gene di Raf-1 (isoforma C) è iper-regolato nel 50% dei tumori HCC e, di conseguenza, in questi tumori la proteina risulta notevolmente espressa. Inizialmente, il sorafenib è stato riconosciuto come inibitore dell'attività chinasi di Raf-1 e delle forme normale e mutata di Raf-B [Wilhelm et Chien, 2002].

In diverse linee cellulari di HCC, il sorafenib inibisce la fosforilazione di ERK in modo dose-dipendente ed il grado di inibizione differisce secondo i livelli basali presenti nella cellula di fosfo-ERK [Zang et al., 2009].

Nelle linee cellulari PLC/PRF/5 e HepG2 il farmaco blocca la proliferazione cellulare e stimola apoptosi inibendo la fosforilazione di MEK, ERK e del fattore traduzionale IF4E e riducendo i livelli di

ciclina D1 e della proteina anti-apoptotica Mcl-1. Le stesse linee cellulari, trapiantate in topi nudi, sviluppano un tumore la cui grandezza e vascolarizzazione regrediscono dopo trattamento con sorafenib in maniera dose-dipendente [Liu Li et al., 2006]. Questi dati confermano che il sorafenib agisce direttamente sia sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare che sull'angiogenesi.

Alcuni di questi effetti antitumorali osservati risultano essere mediati da meccanismi indipendenti dal segnale MEK/ERK. Raf-1 è, infatti, in grado di legare e modulare una serie di proteine cellulari senza che l'attivazione di ERK sia necessaria. Un pathway di segnalazione diverso da quello di ERK è stato coinvolto nell'induzione dell'apoptosi in cellule HCC trattate con sorafenib. In questo modello il farmaco induce l'espressione di GADD45 β , sensore cellulare mediatore della risposta apoptotica allo stress genotossico, tramite la fosforilazione e attivazione di JNK/c-Jun. GADD45 β è comunemente ipo-espresso nell'HCC [Ou et al., 2010]. Studi relativi al meccanismo con cui il sorafenib induce apoptosi in melanoma dimostrano che si tratta di eventi biochimici MAPchinasi-indipendenti [Panka e coll., 2006]. Inoltre, studi in vitro mostrano che il sorafenib agisce attraverso meccanismi che coinvolgono la regolazione della proteina anti-

apoptotica Bcl-2 e che svolge funzione anti-angiogenetica. L'angiogenesi nell'HCC, come in altri tumori solidi, si basa sull'attivazione, proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali. Queste fasi sono mediate dal legame di fattori angiogenici come VEGF e PDGF, secreti da cellule del tumore (cellule HCC, infiammatorie infiltranti o epatiche stellate), con i rispettivi recettori VEGF2, 3 e PDGFR- β espressi sui periciti e sulle cellule endoteliali [Semela et Dufour, 2004; Yamaguchi et al., 2000] (Fig. 17).

L'espressione di VEGF e PDGF aumenta durante l'epatocarcinogenesi ed in particolare la sovraespressione di PDGF è stata collegata all'incremento del potenziale metastatico [Huynh, 2010].

Farmaci che agiscono inibendo i pathway correlati a VEGF e PDGF, data l'importanza di tali fattori di crescita sul potenziale metastatico del tumore e sull'angiogenesi, risultano essere promettenti agenti terapeutici nel trattamento dell'epatocarcinoma cellulare.

Il sorafenib blocca l'angiogenesi VEGF e PDGF-dipendente, mostrando un miglioramento statisticamente rilevante in pazienti con patologia avanzata [Wörns et Galle, 2010].

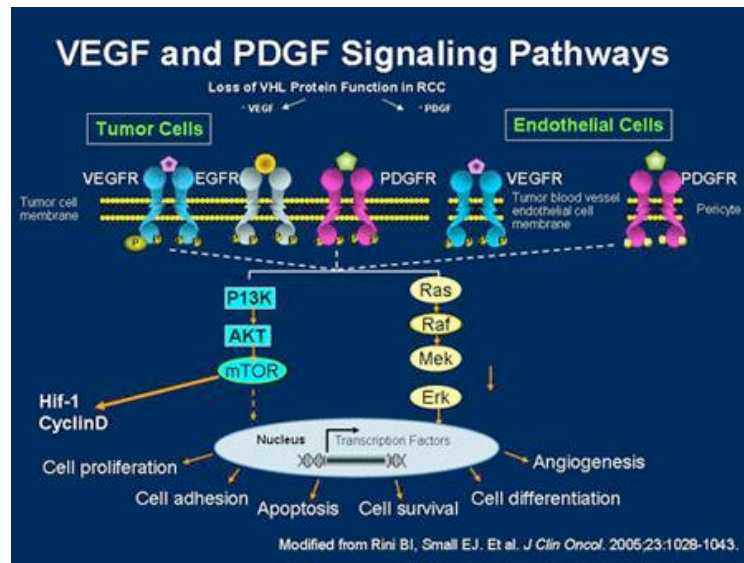


Figura 17. Pathway di segnalazione di VEGF e PDGF.

I recettori VEGF2, 3 e PDGFR- β appartengono alla classe dei recettori ad attività tirosin-chinasica e possiedono una struttura di base costituita da una singola catena polipeptidica che attraversa la membrana plasmatica.

In seguito al legame tra i fattori di crescita e i recettori, si verifica un cambiamento conformazionale del dominio extracellulare che promuove il processo di dimerizzazione del recettore (stato attivo). A questo segue un processo di trans-fosforilazione a livello dei residui tirosinici che conduce alla formazione dei siti di ancoraggio che vengono riconosciuti dai trasduttori dei segnali intracellulari (Fig. 18).

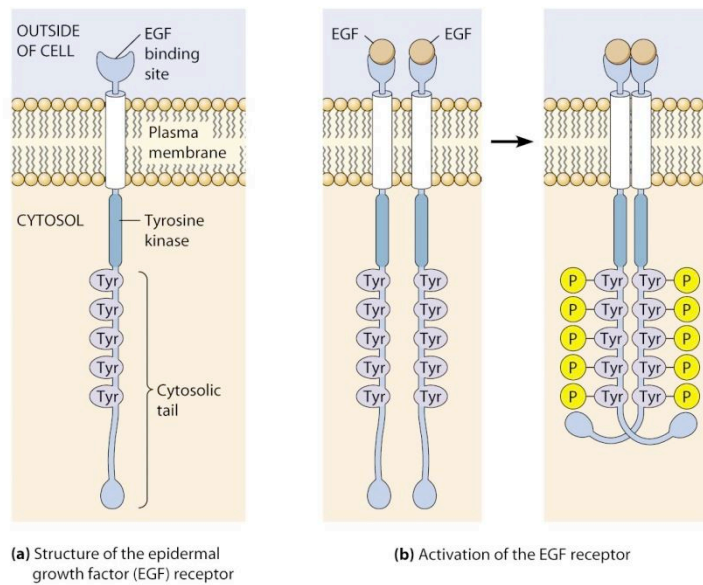


Figura 18. Struttura del recettore e meccanismo di attivazione recettoriale.

Complessivamente sono quindi tre gli effetti anti-tumorali attribuibili al sorafenib e rilevati sperimentalmente:

- inibizione delle chinasi Raf;
- inibizione dei recettori RTK pro-angiogenetici;
- induzione dello stress del reticolo endoplasmatico con conseguente attivazione dei meccanismi pro-apoptotici.

2.4 Ruolo della Nuclear Protein 1 (Nupr1) nel cancro

La Nuclear Protein-1 (Nupr-1), chiamata anche p8 o Com1 (Candidate of Metastasis-1), è una proteina che risulta sovraespressa in diversi tipi di tumori maligni [Vincent et al., 2012; Cano et al., 2011]. Essa, infatti, può favorire l'insorgenza di metastasi, essendo coinvolta nella regolazione di processi quali la migrazione, l'invasione e l'adesione cellulare [Vincent et al., 2012; Cano et al., 2011]. La Nupr-1 ad esempio, può indurre lo sviluppo di processi metastatici favorendo la trasduzione intracellulare del segnale mediato dal fattore di crescita TGF β [Cano et al., 2011]. Il TGF β è una citochina che, interagendo con specifici recettori metabotropici ad attività tirosin-chinasica intrinseca, regola molti processi cellulari tra cui la proliferazione, la differenziazione e la produzione di matrice extra-cellulare [Cano et al., 2011].

La Nupr-1 risulta essere coinvolta anche nella regolazione del ciclo cellulare e nell'induzione di chemioresistenza in diversi tipi di cellule tumorali.

E' noto per esempio che la Nupr-1 può indurre resistenza verso la doxorubicina, favorendo la trascrizione della proteina p21,

regolatrice del ciclo cellulare. A seconda della sua localizzazione cellulare, p21 può comportarsi sia come gene soppressore del tumore che come oncogene [Vincent et al., 2012]:

- a livello nucleare p21 induce arresto della crescita cellulare sia inibendo specifiche chinasi ciclina-dipendenti, che inibendo la sintesi del DNA tramite interazioni con l'antigene di proliferazione nucleare PCNA;
- a livello citoplasmatico, invece, p21 forma un complesso con l'ASK1 (Apoptosis Signaling Kinase 1) determinando l'attivazione del fattore anti-apoptotico BLC-2 [Vincent et al., 2012].

Oltre a favorire l'insorgenza di fenomeni di chemioresistenza p21-mediati, la Nupr-1 è in grado anche di formare un complesso con la protomiosina α , inibendone l'attività antiapoptotica. La protomiosina α è infatti in grado di bloccare l'apoptosi indotta per via mitocondriale impedendo la formazione dell'apoptosoma e quindi l'attivazione della pro-caspasi 9 [Cano et al., 2011].

In letteratura è riportato inoltre che l'espressione della Nupr-1 può essere indotta dalla presenza di ROS (Reacting Oxygen Species)

ritenendo che la stessa possa essere coinvolta nella genesi di processi anti-infiammatori in grado di proteggere la cellula dallo stress ossidativo [Weis et al., 2015; Momoda et al., 2007].

La proteina Nupr-1 potrebbe dunque rappresentare un nuovo target molecolare per il trattamento di diverse patologie e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici [Cano et al., 2011].

2.5 Curcumina: meccanismo d'azione

La curcumina è un polifenolo a basso peso molecolare estratto dal rizoma della *Curcuma longa*, di cui rappresenta il principale componente biologicamente attivo (Fig. 19).

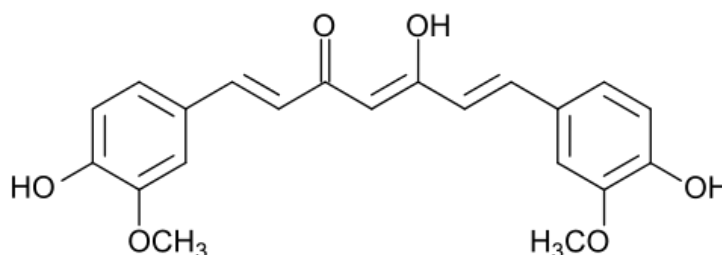


Figura 19. Struttura chimica della curcumina.

Per secoli, la curcumina è stata usata come spezia, agente colorante e rimedio terapeutico nella medicina tradizionale indiana [Bisht et al., 2007]. Le sue proprietà antinfiammatorie e antiossidanti sono note infatti da diversi anni, ma più recentemente questa molecola ha suscitato particolare interesse per le sue proprietà antitumorali, attribuite all'azione su molteplici target molecolari [Sharma et al., 2005].

E' stato dimostrato che la curcumina possiede azione proapoptotica su diversi tipi di cellule tumorali coinvolgendo entrambe le vie apoptotiche (intrinseca ed estrinseca) e diversi pathways, che possono differire a seconda del tipo cellulare, dello stadio di differenziazione o della sua concentrazione [Johnson et Mukhtar, 2007; Reuter et al., 2008].

In particolare, la curcumina svolge un'azione inibitoria su diversi fattori di trascrizione (tra cui NF-kB, AP-1, STAT-3, β -catenina, EGR-1 e HIF-1) generalmente up-regolati nelle cellule tumorali. Di particolare interesse risulta il ruolo inibitorio di questa molecola sui pathways di sopravvivenza di NF-kB e PI3K/Akt.

Il fattore NF-kB è solitamente espresso in quasi tutti i tipi di cellule tumorali e determina blocco dell'apoptosi. La sua attivazione

risulta inibita dalla curcumina, così come la conseguente espressione di diversi geni coinvolti nella proliferazione e sopravvivenza cellulare (Bcl-2, ciclina D1, MMP-9). Ciò determina nelle cellule tumorali induzione dell'apoptosi, arresto del ciclo cellulare e della proliferazione.

Akt è una proteina citosolica la cui attività consiste nella fosforilazione di vari substrati proteici a livello dei loro residui di serina e treonina, con attivazione di diversi pathways che portano alla crescita cellulare ed alla resistenza all'apoptosi. Diversi studi hanno dimostrato che la curcumina può defosforilare la proteina Akt attiva, con conseguente inibizione del pathway di segnalazione PI3K/Akt e induzione dell'apoptosi.

Recentemente è stato provato inoltre che la curcumina può indurre apoptosi attraverso un meccanismo legato all'incremento dello stress del reticolo endoplasmatico [Reuter et al., 2008].

L'azione antitumorale della curcumina non è però dovuta solo all'induzione di pathways pro-apoptotici: questa molecola infatti risulta coinvolta anche nella regolazione di diverse citochine ed enzimi proinfiammatori (TNF- α , diverse interleuchine, COX-2), proteine-chinasi (MAPK) fattori di crescita e relativi recettori (EGFR1, HER-2,

VEGF, FDF, PDGF etc...) implicati nei processi di proliferazione e invasione cellulare, formazione di metastasi e angiogenesi [Kunnumakkara et al., 2008; Anand et al., 2008].

Inoltre, è stato dimostrato che la curcumina può agire sinergicamente ai farmaci chemioterapici convenzionali in quanto sensibilizza le cellule cancerose riducendo i meccanismi di farmacoresistenza [Reuter et al., 2008].

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il lavoro svolto durante il periodo di dottorato ha previsto la realizzazione di diversi sistemi nanoparticellari lipidici in grado di veicolare materiale genico e farmaci utili in terapia oncologica. In particolare, sono state preparate nanoparticelle cariche di sorafenib ed SLN cationiche capaci di veicolare il plasmide shNupr1 per il trattamento del carcinoma epatocellulare e SLN cariche di curcumina per il trattamento del carcinoma ovarico.

3.1 Nanoparticelle lipidiche contenenti sorafenib

Sono stati realizzati due tipi di carrier lipidici nanostrutturati (NLC), sia vuoti che carichi di sorafenib.

Tali carrier sono stati preparati utilizzando la tecnica della precipitazione etanolica, la quale ha consentito di incorporare all'interno dei nanosistemi quantità notevoli di farmaco.

Sono stati preparati due campioni di nanoparticelle carichi di sorafenib utilizzando una stessa matrice lipidica solida (tripalmitina) e

due diverse matrici lipidiche liquide costituite da Captex 355 EP/NF (trigliceridi dell'acido caprilico/caprico) o Miglyol 812 (trigliceridi dell'acido caproico/caprilico/caprico).

Al fine di valutare la tossicità dei materiali utilizzati sono stati realizzati i corrispondenti campioni privi di farmaco.

Tutti i sistemi ottenuti sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico in termini di dimensioni, indice di polidispersità (PDI), carica superficiale (ζ -potential) e morfologia. In seguito sono stati caratterizzati anche dal punto di vista tecnologico-farmaceutico determinando la capacità di carico (loading capacity %) e le cinetiche di rilascio del farmaco (drug release) in plasma umano.

Sono stati inoltre effettuati test emolitici e studi di citotossicità *in vitro* tramite saggi MTS su quattro diverse linee cellulari di epatocarcinoma: Hep3B, HepG2, Huh7 e PLC. Sulla linea cellulare HepG2 è stato eseguito anche il saggio clonogenico, per valutare la capacità delle cellule tumorali, in presenza del farmaco libero e veicolato dalle NLC, di formare colonie.

3.1.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta

Per potere valutare le caratteristiche chimico-fisiche dei sistemi nanoparticellari sono state eseguite misure delle dimensioni con relativo indice di polidispersità (PDI). E' stata valutata anche la carica superficiale delle nanoparticelle tramite misure di potenziale zeta in acqua bidistillata, tampone a pH 7.4 (PBS) e soluzione fisiologica (NaCl 0.9% p/v).

La Tabella 1 mostra i valori delle dimensioni e di PDI ottenuti dall'analisi dei diversi campioni di nanoparticelle.

	Tripalm-Captex vuote	Tripalm-Captex piene	Tripalm-Miglyol vuote	Tripalm-Miglyol piene
Size in H₂O (nm)	201.0	221.3	184.1	186.0
PDI	0.255	0.204	0.260	0.223
Size in PBS pH 7.4 (nm)	223.7	215.5	230.2	229.3
PDI	0.402	0.659	0.438	0.516
Size in NaCl 0.9 % (nm)	223.0	221.0	307.1	219.0
PDI	0.595	0.612	0.442	0.417

Tabella 1. Valori di dimensioni e indice di polidispersità delle NLC in acqua, PBS a pH 7.4 e soluzione fisiologica (NaCl 0.9% (p/v)).

Confrontando i dati presenti in tabella è possibile affermare che entrambi i sistemi (sia vuoti che carichi di farmaco) presentavano

dimensioni simili, che si mantenevano tali anche in PBS pH 7.4 e in NaCl 0.9%. Dall'analisi dei valori di PDI si deduce che il mezzo acquoso salino tende ad aumentarne la polidispersità.

La Tabella 2 mostra i valori di potenziale zeta dei campioni negli stessi mezzi di dispersione utilizzati per l'analisi del size.

	Trip-Captex vuote	Trip-Captex piene	Trip-Miglyol vuote	Trip-Miglyol piene
H₂O	-37.0 ± 6.92	-40.3 ± 8.74	-38.0 ± 7.60	-33.5 ± 4.97
PBS pH 7.4	-14.4	-16.2	-17.9	-16.0
NaCl 0.9 %	-9.46	-17.2	-11.5	-18.9

Tabella 2. Valori di potenziale zeta (mV) delle NLC in acqua, PBS a pH 7.4 e soluzione fisiologica (NaCl 0.9% (p/v)).

La presenza dei sali nei mezzi acquosi ha determinato una riduzione della carica superficiale dei sistemi, influenzandone molto probabilmente la polidispersità, che è risultata aumentata in tali condizioni (Tab.1).

3.1.2 Studi di stabilità

Per ogni sistema sono stati condotti studi di stabilità nel tempo tramite misure di size con relativo PDI e misure di potenziale zeta in

acqua. Le Figure 20 e 21 mostrano i valori delle dimensioni e l'indice di polidispersità dei diversi campioni di nanoparticelle fino a 90 giorni.

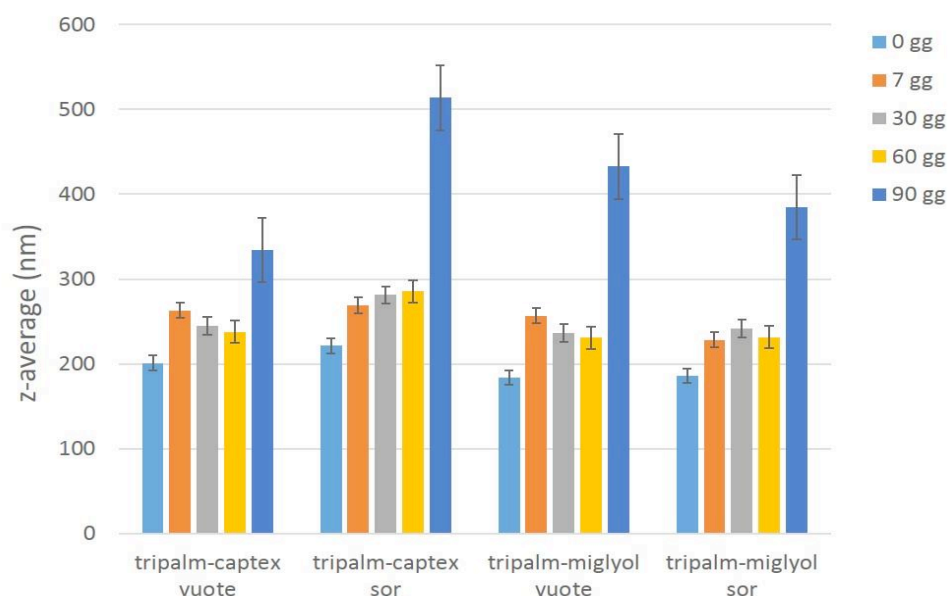


Figura 20. Valori di dimensioni delle NLC appena preparate e dopo 7, 30, 60 e 90 giorni.

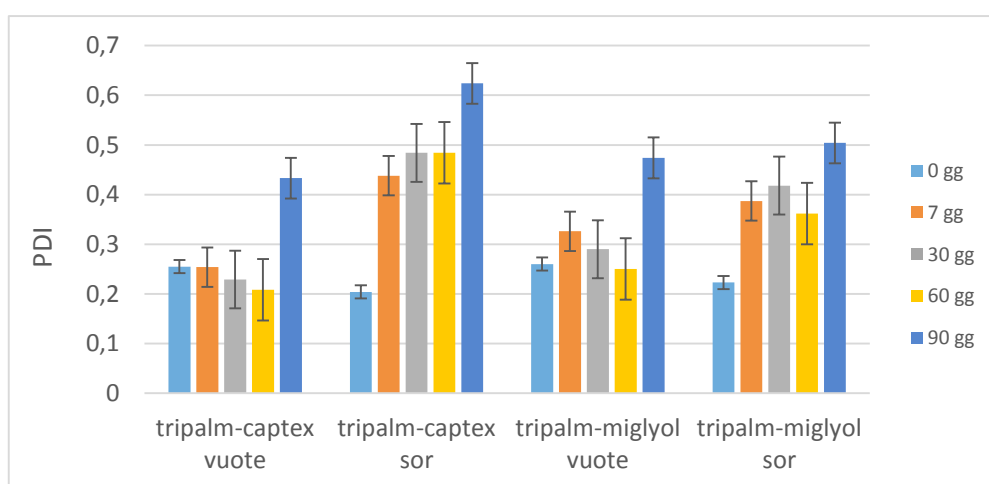


Figura 21. Valori di PDI delle NLC appena preparate e dopo 7, 30, 60 e 90 giorni.

I dati mostrano che i sistemi nanoparticellari si mantengono stabili fino a 60 giorni. Dopo tale periodo si osserva un incremento delle dimensioni e del PDI, probabilmente dovuto a fenomeni di aggregazione.

La Figura 22 mostra i valori di potenziale zeta dei diversi campioni agli intervalli di tempo considerati.

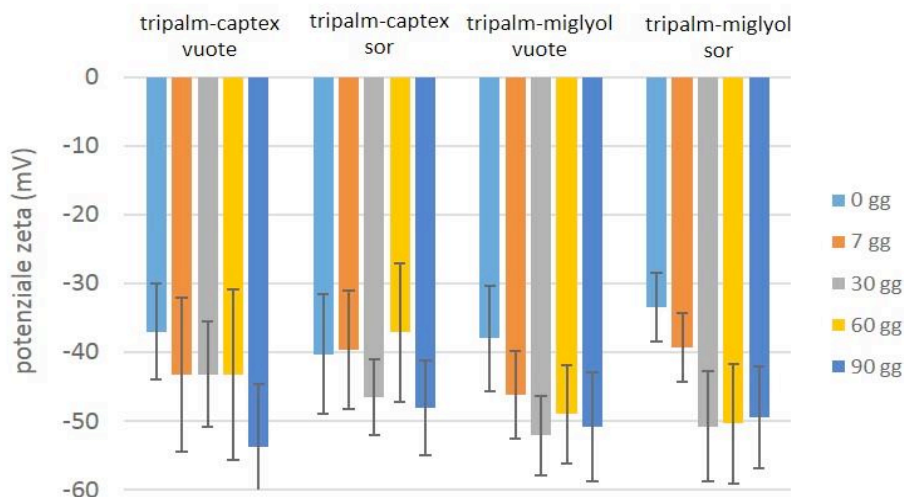


Figura 22. Valori di potenziale zeta (mV) e di deviazione standard (mV) delle NLC appena preparate e dopo 7, 30, 60 e 90 giorni.

Le misure di potenziale zeta mostrano solo leggeri aumenti in valore assoluto fino a 60 giorni, mentre la differenza più significativa si nota dopo 90 giorni, molto probabilmente a causa di una modificazione

della matrice nanoparticellare dopo conservazione a freddo e per un periodo di tempo più lungo.

3.1.3 Analisi SEM

Al fine di confermare le dimensioni nanometriche delle nanoparticelle ottenute tramite DLS e valutarne la morfologia, tali sistemi sono stati sottoposti ad un'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM). Le immagini ottenute sono riportate in Figura 23.

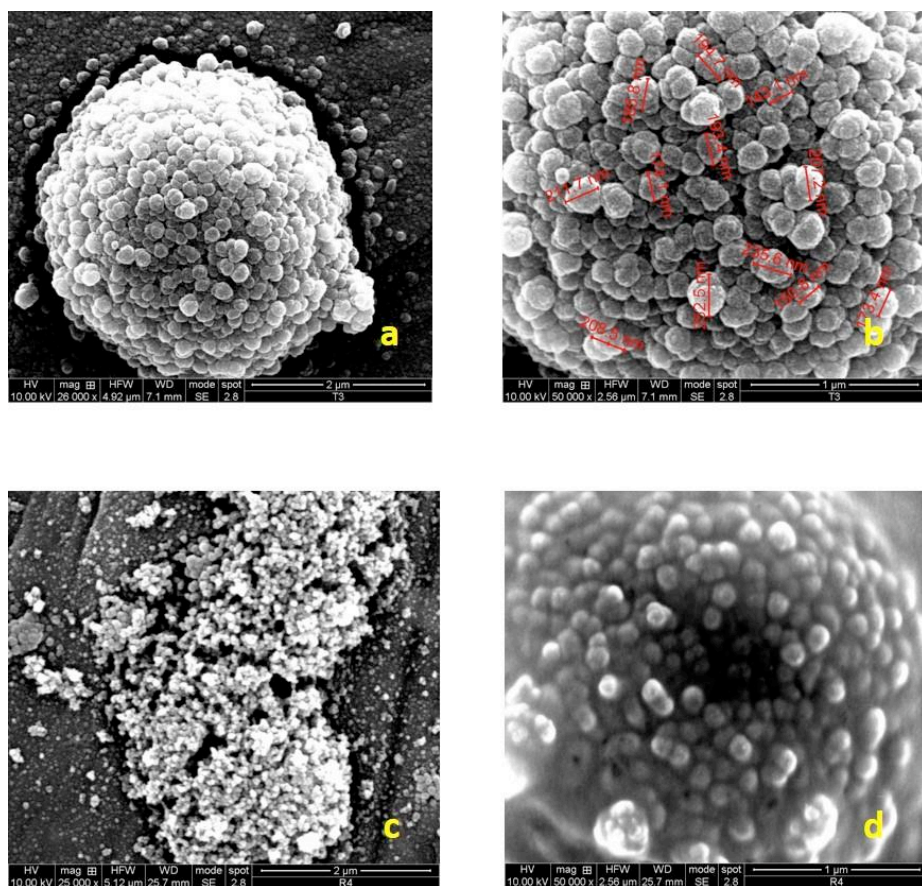


Figura 23 (a, b, c, d). Immagini SEM delle nanoparticelle cariche di sorafenib tripalmitina-Miglyol (a e b) e tripalmitina-Captex (c e d), rispettivamente. Le barre in basso a destra rappresentano le misure espresse in μm .

Tali immagini risultano essere in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi dimensionale ed evidenziano inoltre, la forma sferica dei campioni ottenuti.

3.1.4 Loading capacity (LC%) ed efficienza di intrappolamento (EE%)

Per determinare la quantità di sorafenib intrappolata nelle nanoparticelle sono state effettuate analisi all'HPLC, così come riportato nella parte sperimentale. I valori di loading capacity (LC%), espressi come percentuale in peso di farmaco rispetto alla quantità di nanoparticelle (farmaco + matrice lipidica) e di efficienza di intrappolamento (EE%) sono riportati in Tabella 3.

	Tripalm-Captex sor	Tripalm-Miglyol sor
DL %	18.46	10.30
EE %	100.00	58.52

Tabella 3. Valori di drug loading (DL%) ed efficienza di intrappolamento (EE%) dei sistemi nanoparticellari.

Come si può osservare, il sistema costituito dalla matrice lipidica tripalmitina-Captex presenta una LC% ed una EE% più elevate, dovute probabilmente ad una maggiore solubilità del farmaco nel Captex 355 EP/NF. Questo lipide liquido, contenendo esteri del glicerolo con acidi grassi a catena più lunga rispetto a quelli contenuti nel Miglyol 812, potrebbe essere in grado di solubilizzare meglio il sorafenib, molecola altamente lipofila.

3.1.5 Studi di stabilità del Sorafenib in plasma umano

Gli studi di stabilità del sorafenib in plasma umano sono stati condotti a $37\text{ °C} \pm 0.1\text{ °C}$ fino a 24 ore. I dati ottenuti sono mostrati in Figura 24.

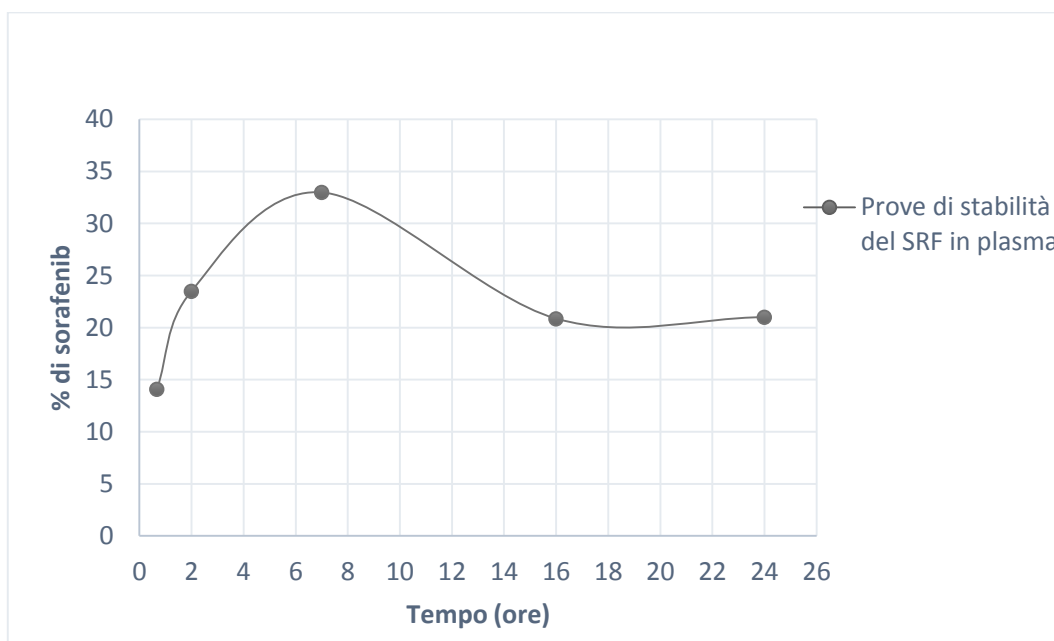


Figura 24. Prove di stabilità del Sorafenib in plasma.

Come si può osservare, la concentrazione di sorafenib nel plasma aumenta gradualmente fino a sette ore, probabilmente perché il farmaco si solubilizza gradualmente nel mezzo, raggiungendo un massimo di solubilità a sette ore. Successivamente invece si riscontra una

diminuzione di concentrazione del farmaco dovuta verosimilmente a fenomeni di degradazione dello stesso e/o legame alle proteine, come riportato in letteratura (Villarroel et al., 2012).

3.1.6 Studi di rilascio del Sorafenib in plasma umano

I seguenti studi di rilascio sono stati effettuati utilizzando plasma umano a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, così come riportato nella parte sperimentale. Sono stati valutati gli stessi intervalli di tempo considerati per gli studi di stabilità del farmaco.

Di seguito sono riportati i profili di rilascio del sorafenib dalle NLC (Fig. 25).

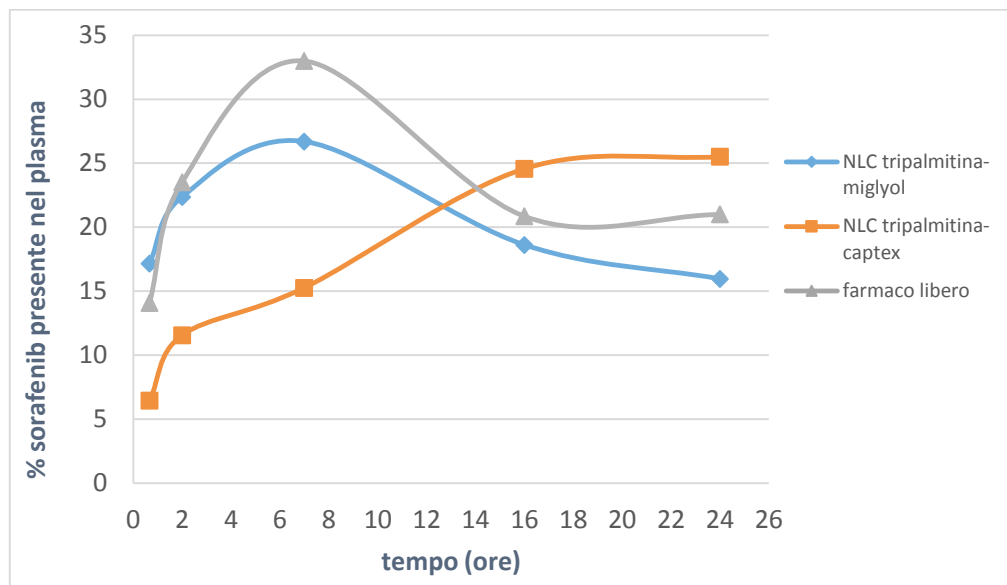


Figura 25. Profili di rilascio del sorafenib in plasma umano dalle NLC.

Come si evince dal grafico le cinetiche di rilascio del sorafenib presentano un andamento molto diverso nei due sistemi considerati. Confrontando le curve di rilascio con la curva di stabilità del sorafenib libero in plasma si può affermare che entrambi i sistemi proteggono il farmaco dalla degradazione. Il sistema tripalmitina-Captex in particolare presenta un rilascio prolungato del farmaco: entro 7 ore infatti la quantità di farmaco rilasciata dalle NLC nel mezzo è inferiore rispetto alla quantità di farmaco libero riscontrata nelle prove di stabilità. Prendendo in considerazione le percentuali di farmaco presenti all'interno dei sistemi nanoparticellari e le percentuali rilasciate dagli stessi (Tab. 4), è possibile notare che a 2 ore, il 30%

circa di farmaco caricato nelle NLC tripalmitina-Miglyol risulta mancante, in quanto probabilmente degradato o legato alle proteine plasmatiche; nel sistema costituito dalla matrice lipidica tripalmitina-Captex invece non si verificano fenomeni di degradazione e/o legame alle proteine plasmatiche. A 24 ore, nel sistema tripalmitina-Miglyol vi è circa il 50% di farmaco che si degrada o si lega alle proteine, mentre nel sistema tripalmitina-Captex è solo il 20% circa. La Tabella 4 mostra le percentuali di sorafenib residua all'interno delle NLC, rilasciata nel plasma e quindi la quota totale presente.

Tempo	% sorafenib all'interno delle NLC		% sorafenib rilasciata		Totale sorafenib %	
	Trip-Migl	Trip-Cap	Trip-Migl	Trip-Cap	Trip-Migl	Trip-Cap
2 ore	47.0	88.4	22.4	11.4	69.4	99.8
24 ore	34.6	54.3	15.9	25.5	50.5	79.8

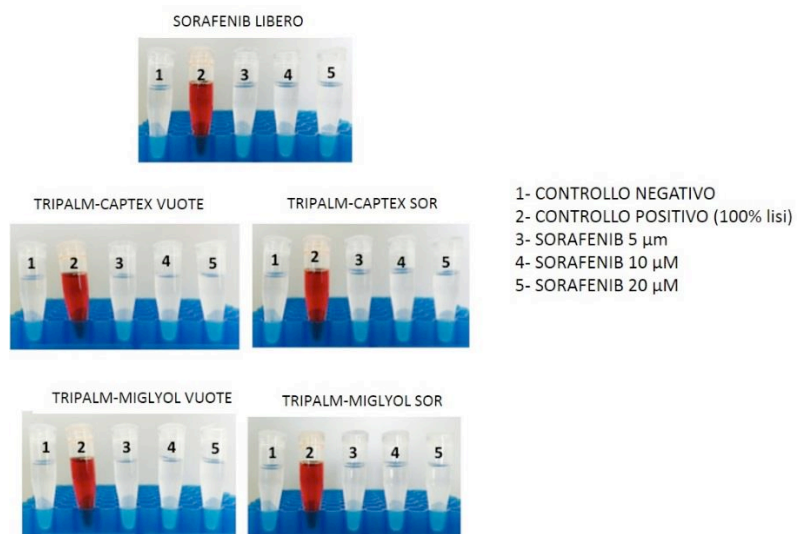
Tabella 4. Percentuali di sorafenib residua all'interno delle NLC, rilasciata nel plasma e quantità totale.

Osservando invece la curva relativa al comportamento del farmaco libero a 24 ore solo il 20% circa è rilevabile mediante analisi HPLC, mentre la restante parte si è possibilmente degradata e/o legata

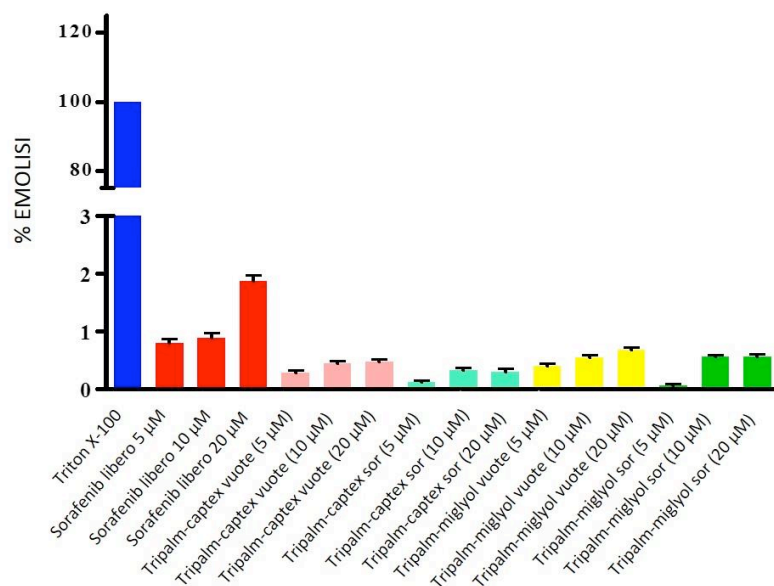
alle proteine plasmatiche. Conseguentemente si deduce che entrambi i sistemi proteggono il farmaco dalla degradazione e dal legame alle proteine. Inoltre, essendo presente ancora una certa quantità di farmaco all'interno dei sistemi particellari, non è da escludere che questo possa essere rilasciato dopo le 24 ore.

3.1.7 Test emolitici

Al fine di ottenere informazioni preliminari sulla biocompatibilità dei nanosistemi, progettati per la somministrazione parenterale, sono stati effettuati test emolitici incubando con eritrociti umani le NLC vuote o cariche di sorafenib (alle concentrazioni di farmaco di 5, 10 e 20 μM) per 1 ora a $37^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$. L'emoglobina rilasciata in seguito alla lisi degli eritrociti è stata successivamente quantificata tramite spettroscopia UV. Gli eritrociti sono stati trattati rispettivamente con una soluzione all'1% (v/v) di Triton X-100 e DPBS a pH 7.4 al fine di ottenere i valori corrispondenti al 100% e 0% di lisi. La Figura 26 mostra che nelle condizioni utilizzate, le NLC vuote o cariche di sorafenib non hanno determinato significativa azione emolitica. Infatti, la percentuale di emolisi riscontrata è risultata per ogni campione inferiore al 2.0%.



(a)



(b)

Figura 26. Risultati dei test emolitici ottenuti dopo incubazione degli eritrociti con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex ed NLC tripalmitina-Miglyol vuote e cariche di sorafenib (a concentrazione 5, 10 e 20 μM) per 1 ora a 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. I dati mostrati rappresentano la media di tre diversi esperimenti.

3.1.8 Studi di vitalità cellulare

Al fine di valutare che la citotossicità fosse causata esclusivamente dall'azione del farmaco e non dai componenti della formulazione, le quattro linee cellulari di epatocarcinoma (Hep3B, HepG2, Huh7 e PLC), dettagliatamente descritte nella parte sperimentale, sono state incubate con sorafenib libero, NLC vuote ed NLC cariche di sorafenib.

I saggi di vitalità cellulare sono stati effettuati rimuovendo il mezzo di coltura sia dopo 6 ore che dopo 24 ore, lavando i pozzetti con PBS a pH 7.4 per due volte.

Nel caso in cui la rimozione del mezzo di coltura è avvenuta dopo 6 ore, in tutte e 4 le linee cellulari la vitalità cellulare si è ridotta in seguito a trattamento con sorafenib veicolato da entrambi i sistemi nanoparticellari. Inoltre le NLC vuote non hanno svolto alcuna attività citotossica. Tale fenomeno è risultato particolarmente evidente nella linea cellulare HepG2 (Fig. 27, 28, 29, 30).

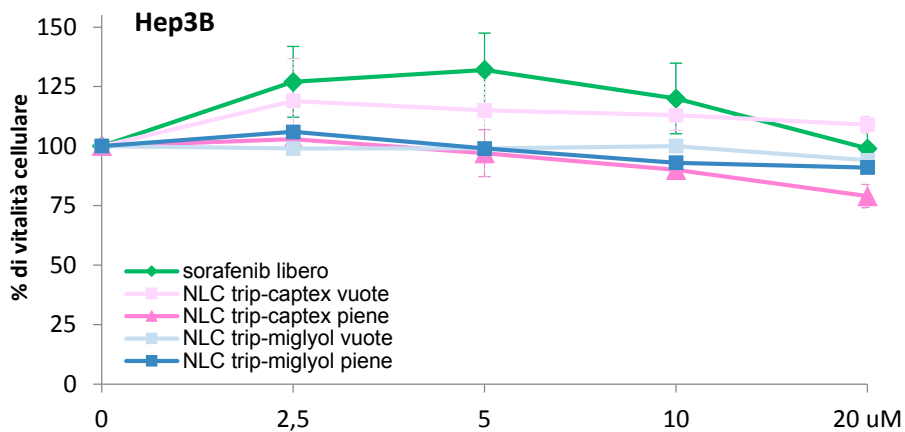


Figura 27. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule Hep3B determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 6 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con PBS a pH 7.4 per due volte e l'esperienza è stato continuato fino a 72 ore.

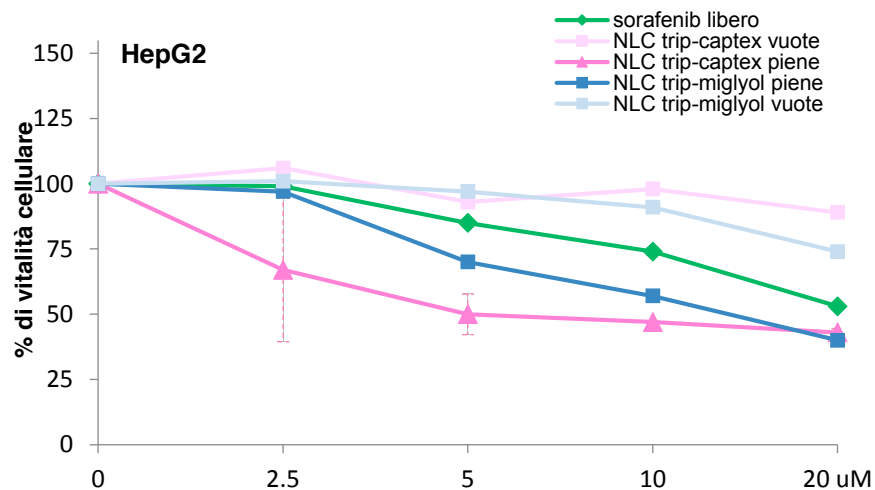


Figura 28. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule HepG2 determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 6 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con a pH 7.4 per due volte e l'esperienza è stato continuato fino a 72 ore.

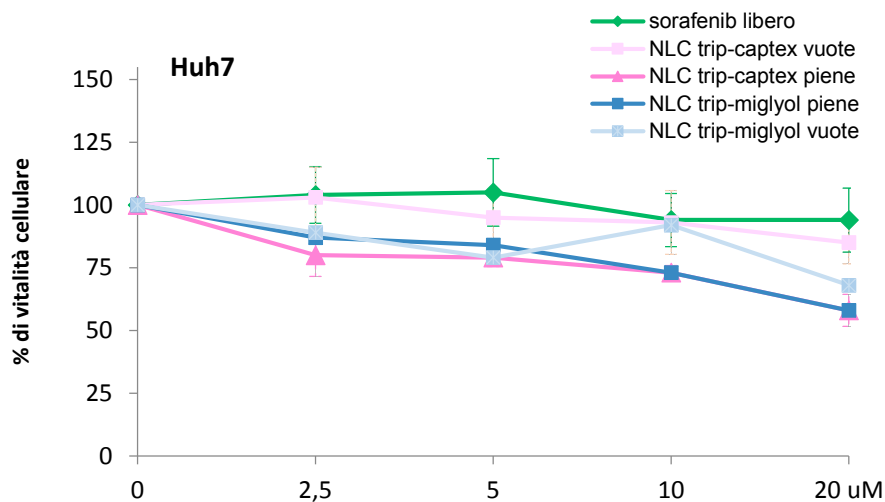


Figura 29. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule Huh7 determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 6 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con PBS a pH 7.4 per due volte e l'esperimento è stato continuato fino a 72 ore.

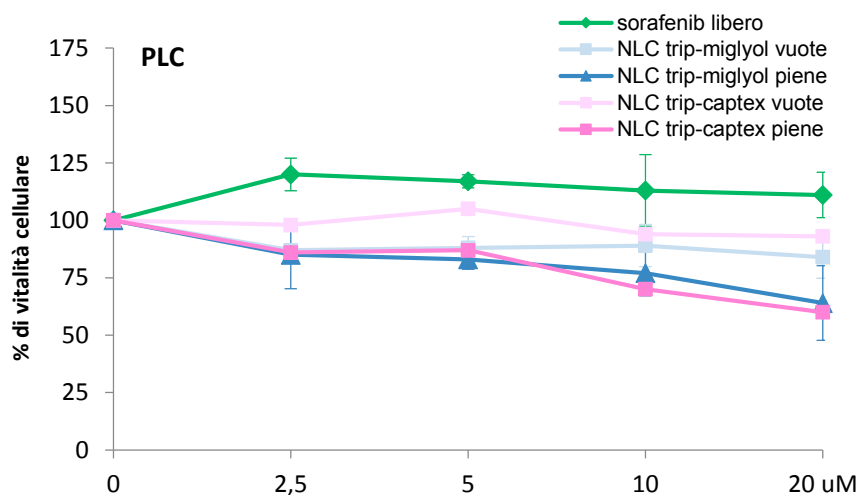


Figura 30. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule PLC determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 6 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con PBS a pH 7.4 per due volte e l'esperimento è stato continuato fino a 72 ore.

Nel caso in cui la rimozione del mezzo di coltura è avvenuta dopo 24 ore, il farmaco libero, rispetto alla forma veicolata, ha determinato alla concentrazione di 10 μM una riduzione maggiore della vitalità cellulare nelle linee Hep3B (Fig. 31) ed HepG2 (Fig. 32). Ciò potrebbe essere dovuto ad una differenza di permeabilità cellulare tra i 4 tipi cellulari. Nella linea Huh7 invece, la vitalità cellulare è risultata inferiore in seguito a trattamento con il sorafenib (alla concentrazione di 10 μM) veicolato dalle NLC (Fig. 33). Nella linea cellulare PLC, alla concentrazione di 10 μM , il sorafenib libero e il sorafenib veicolato hanno determinato effetti paragonabili sulla vitalità cellulare (Fig. 34).

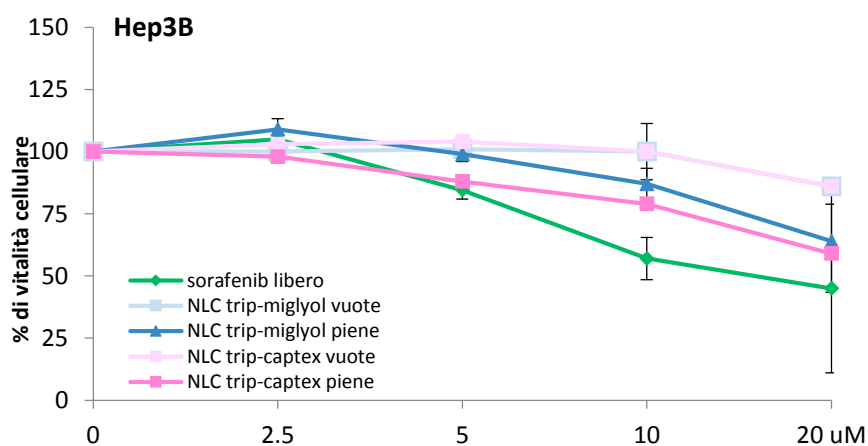


Figura 31. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule Hep3B determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 24 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con PBS a pH 7.4 per due volte e l'esperimento è stato continuato fino a 72 ore.

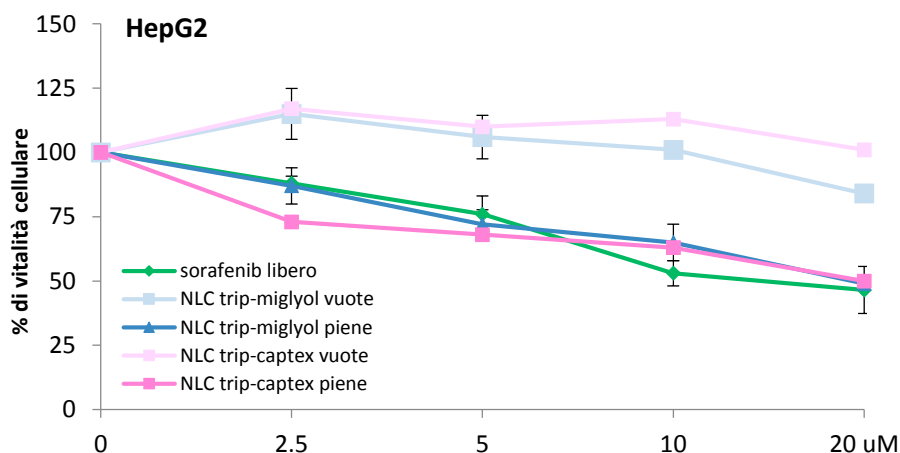


Figura 32. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule HepG2 determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 24 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con PBS a pH 7.4 per due volte e l'esperimento è stato continuato fino a 72 ore.

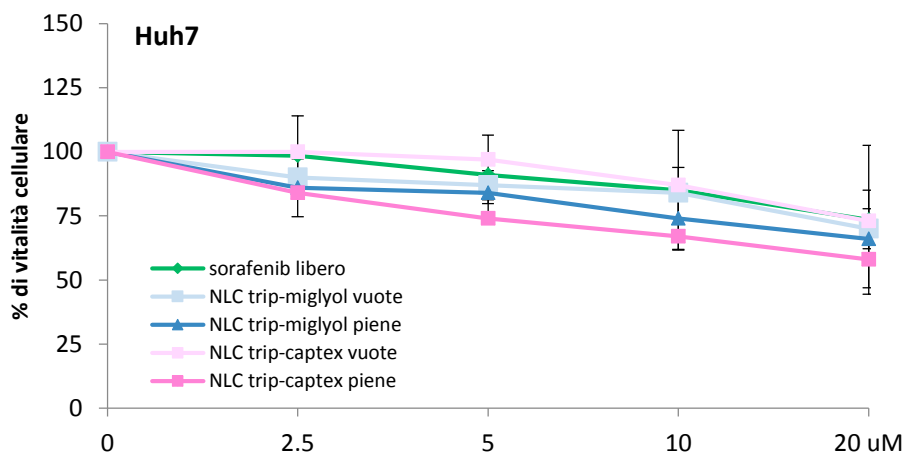


Figura 33. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule Huh7 determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 24 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con PBS a pH 7.4 per due volte e l'esperimento è stato continuato fino a 72 ore.

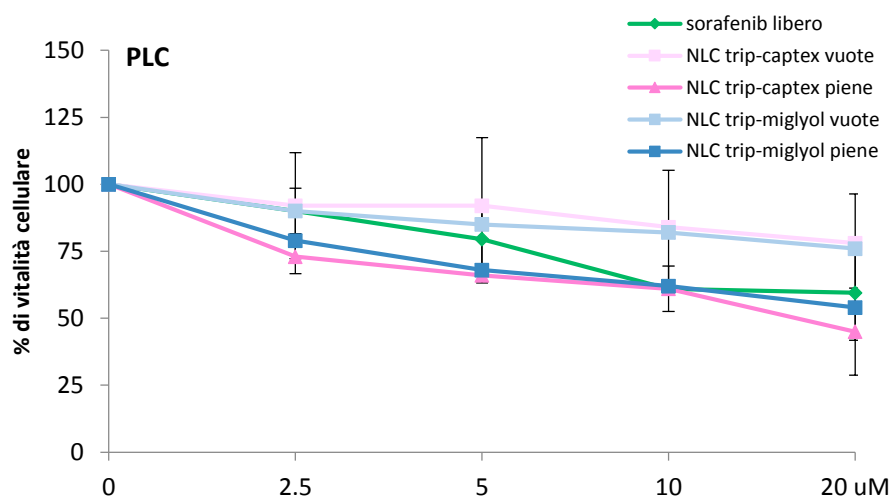


Figura 34. Percentuale di vitalità cellulare delle cellule PLC determinata mediante saggio MTS dopo 72 ore di trattamento con sorafenib libero, NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco e vuote ed NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco e vuote. Dopo 24 ore di trattamento è stato effettuato un lavaggio di ciascun pozzetto con PBS a pH 7.4 per due volte e l'esperimento è stato continuato fino a 72 ore.

3.1.9 Saggio clonogenico

Oltre ai saggi MTS, al fine di valutare il comportamento cellulare per tempi più lunghi, è stato effettuato un saggio clonogenico utilizzando inizialmente il sistema tripalmitina-Captex nella linea cellulare HepG2. Il saggio clonogenico è un test in vitro su cellule in sopravvivenza, basato sulla capacità di una singola cellula di crescere e organizzarsi in colonie (50 cellule), e verifica essenzialmente ogni cellula della popolazione per la sua capacità di subire la divisione in maniera "illimitata". Il saggio clonogenico rappresenta il metodo di scelta per valutare l'efficacia di farmaci citotossici.

Come si può osservare, sia dall'immagine che dal grafico (Fig. 35), la capacità delle cellule HepG2 di formare colonie risulta essere inibita in seguito al trattamento con sorafenib, in maniera dose dipendente.

Inoltre, tale inibizione risulta essere molto più accentuata quando il sorafenib viene utilizzato in forma veicolata dalle NLC, segno che l'attività del farmaco è incrementata rispetto alla sua forma libera.

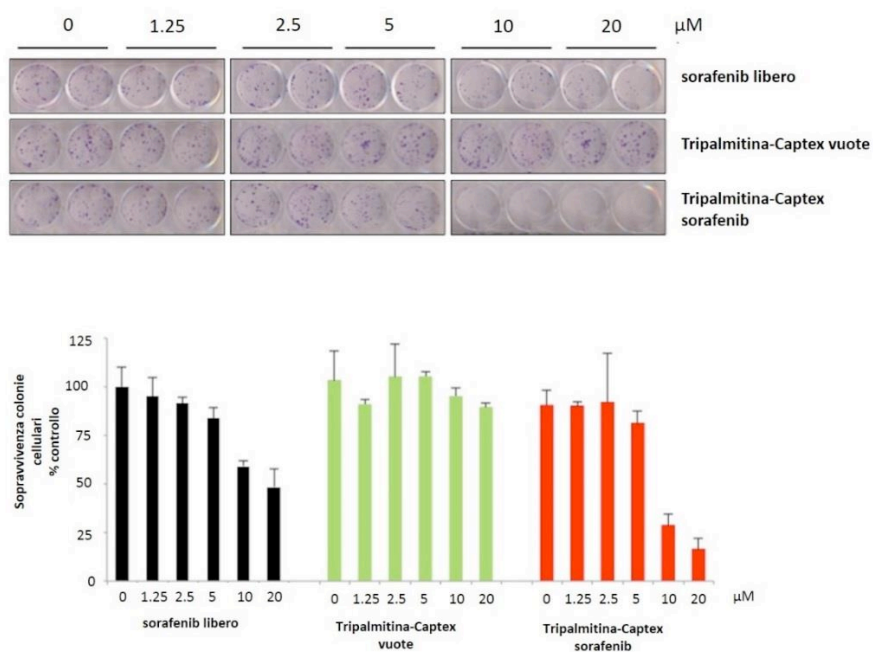


Figura 35. Saggio clonogenico in cellule HepG2.

3.2 Nanoparticelle lipidiche per la veicolazione del plasmide shNupr1

Nel presente lavoro sono stati realizzati diversi sistemi nanoparticellari lipidici utili in terapia genica per il trattamento del carcinoma epatocellulare.

Le nanoparticelle sono state ottenute tramite tecnica della precipitazione etanolica, sfruttando due diversi strumenti di omogeneizzazione: UltraTurrax T25 ed omogeneizzatore ad alta pressione Microfluidizer LM-10 (Microfluidics, Westwood, MA, USA). Tutti i sistemi preparati sono stati purificati mediante dialisi e successivamente caratterizzati da un punto di vista chimico-fisico in termini di size e potenziale zeta. Inoltre sono stati effettuati saggi per valutare la capacità di interazione con il DNA, la biocompatibilità e la capacità di trasfezione.

3.2.1 SLN cationiche preparate mediante omogeneizzazione con UltraTurrax

3.2.1.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta

Le SLN cationiche sono state preparate utilizzando il Precirol ATO 5 (gliceril distearato) come matrice lipidica, il DDAB (dioctadecil-dimetilammonio bromuro) come lipide cationico, ed il Brij 76 o il Pluronic F68 come tensioattivi non ionici, tramite la tecnica della precipitazione etanolica, come riportato nella parte sperimentale.

Per potere valutare le caratteristiche chimico-fisiche dei sistemi nanoparticellari sono state eseguite misure delle dimensioni con relativo indice di polidispersità (PDI) e misure di potenziale zeta.

I risultati ottenuti sono mostrati in Tabella 5.

CAMPIONE	SIZE (nm)	PDI	POTENZIALE ZETA ± DEV.ST
SLN-Brij	295.2	0.427	+40.0 ± 5.61
SLN-Pluronic	271.4	0.399	+29.3 ± 5.62

Tabella 5. Valori di dimensioni, indice di polidispersità e potenziale zeta delle SLN.

Entrambi i sistemi hanno mostrato dimensioni inferiori a 300 nm, con indice di polidispersità inferiore a 0.500. I valori piuttosto elevati di potenziale zeta hanno confermato l'avvenuta incorporazione del

DDAB nella matrice lipidica che consentirà l'interazione con il plasmide.

3.2.1.2. Capacità delle SLN cationiche di complessare il plasmide shNupr1

Per la complessazione del plasmide shNupr1 sono stati utilizzati entrambi i sistemi SLN-Brij e SLN-Pluronic in sospensione acquosa, senza previa liofilizzazione, in quanto tali sistemi sono risultati stabili dopo conservazione in acqua a 4°C, mantenendo le caratteristiche chimico-fisiche inalterate.

I complessi SLN:DNA sono stati ottenuti disperdendo in acqua bidistillata uguali volumi di plasmide shNupr1 (alla concentrazione di 5 ng/μl) e SLN cationiche alle opportune concentrazioni, in modo da ottenere rapporti in peso SLN:DNA di 25:1, 50:1, 100:1, 200:1 e 240:1.

La capacità di entrambi i sistemi nanoparticellari di complessare il plasmide shNupr1 è stata verificata contemporaneamente mediante elettroforesi in gel d'agarosio e misure di potenziale zeta. Come si può osservare nell'immagine del gel elettroforetico (Fig. 36), le SLN-Brij hanno mostrato una capacità complessante migliore rispetto alle SLN-Pluronic: il DNA è risultato essere completamente complessato dalle

SLN-Brij al rapporto SLN:DNA di 100:1 (p/p), mentre per le SLN-Pluronic la totale complessazione è stata ottenuta al rapporto SLN:DNA di 240:1 (p/p).

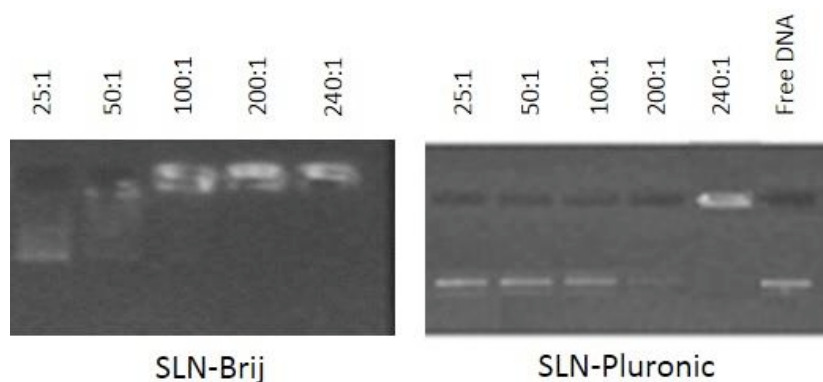


Figura 36. Mobilità elettroforetica in gel d'agarosio dei complessi a diversi rapporti SLN:shNupr1 (p/p)

L'andamento dei valori di potenziale zeta in funzione dei vari rapporti SLN:DNA ha confermato i risultati dell'elettroforesi.

La Figura 37 mostra come, all'aumentare del rapporto SLN:DNA, si verifichi un incremento del potenziale zeta con raggiungimento di valori positivi nei rapporti a partire da 100:1 (p/p) per le SLN-Brij, e nel rapporto di 240:1 (p/p) per le SLN-Pluronic.

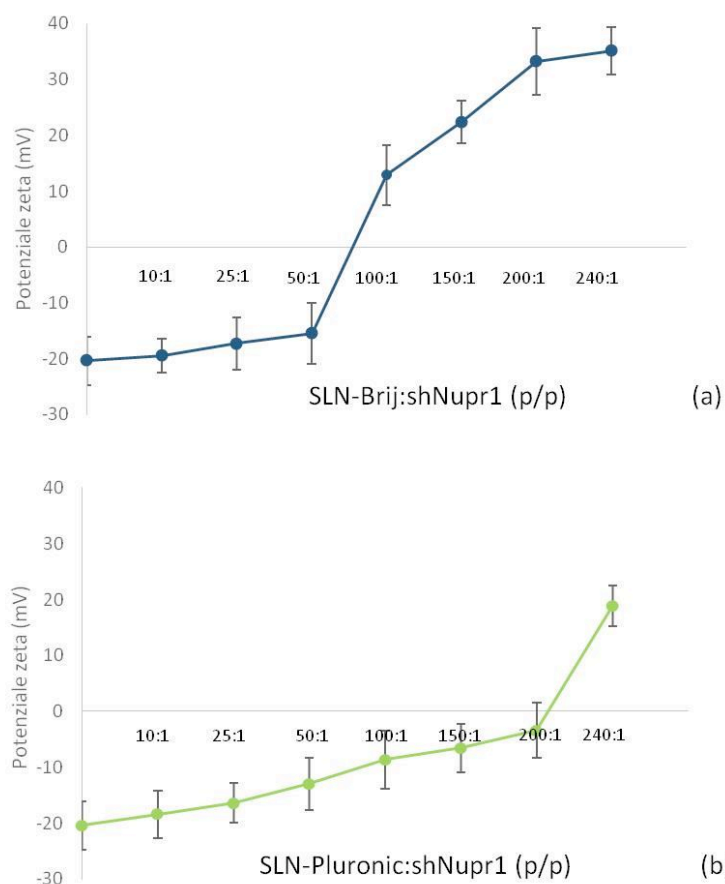


Figura 37. Valori di potenziale zeta dei complessi SLN-Brij:shNupr1 (a) e SLN-Pluronic:shNupr1 (b) a diversi rapporti p/p.

Tutti i complessi sono stati caratterizzati anche in termini di size e PDI tramite tecnica PCS.

La Figura 38 (a e b) mostra i valori di size e PDI dei complessi in acqua bidistillata, ottenuti con rapporti in peso SLN:shNupr1 compresi tra 10:1 e 240:1.

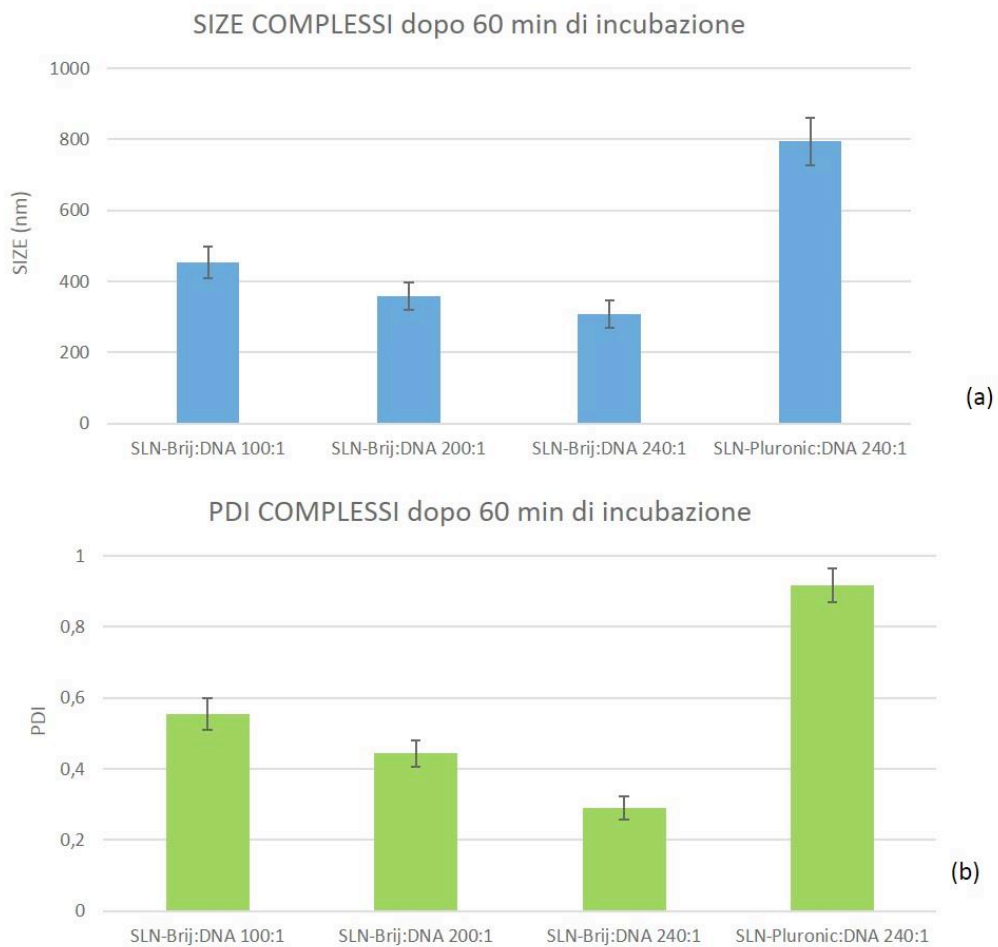


Figura 38. Dimensioni (a) ed indice di polidispersità (PDI) (b) dei complessi SLN-Brij:shNupr1 e SLN-Pluronic:shNupr1 a differenti rapporti, dopo 60 min di incubazione in acqua bidistillata.

Come si può osservare dai dati riportati nella figura sopra, i complessi ottenuti con le SLN-Pluronic presentavano dimensioni e PDI maggiori all'aumentare del rapporto in peso SLN:DNA, mentre una situazione completamente diversa si verificava con i complessi ottenuti con le SLN-Brij. Infatti all'aumentare del rapporto in peso SLN:DNA

sia la dimensione delle particelle che la polidispersità dei sistemi tendevano a diminuire.

3.2.1.3 Studi di vitalità cellulare

Al fine di valutare l'eventuale citotossicità dei sistemi nanoparticellari e dei relativi complessi con il plasmide, sono stati effettuati saggi MTS sulla linea cellulare di epatocarcinoma umano Hep3B.

Le cellule sono state incubate con le SLN e con i complessi ottenuti utilizzando le nanoparticelle e i plasmidi shNupr1 e shControl. Quest'ultimo è stato scelto come plasmide controllo in quanto privo della sequenza di nucleotidi responsabile dell'azione sulla proteina Nupr1.

I complessi SLN-Brij hanno determinato citotossicità ed alterazione della morfologia cellulare probabilmente a causa di fenomeni di aggregazione verificatisi nel mezzo di coltura cellulare (dati non mostrati). Dopo incubazione con le SLN-Pluronic invece non è stata riscontrata significativa riduzione della percentuale di vitalità cellulare rispetto al controllo (Fig. 39).

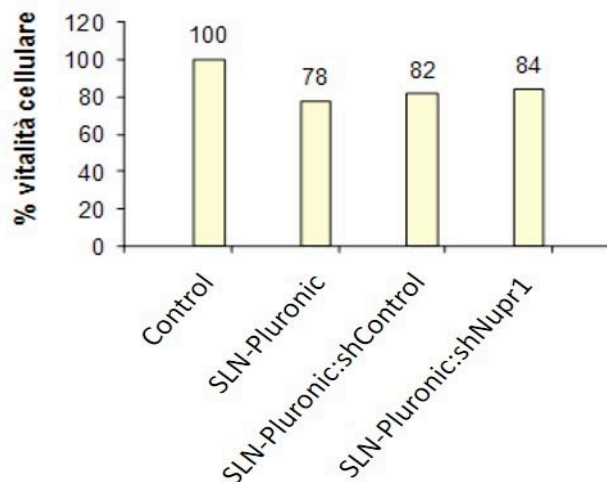


Figura 39. Citotossicità delle SLN-Pluronic e dei rispettivi complessi al rapporto SLN:DNA 240:1 (p/p) sulle cellule Hep3B. I dati sono espressi come percentuale di vitalità in cellule trattate con i sistemi, in riferimento a cellule non trattate (Control) e rappresentano la media di tre diversi esperimenti.

3.2.1.4 Valutazione dell'efficienza di trasfezione

Sulla base dei dati ottenuti con il saggio di vitalità cellulare sono stati effettuati degli studi di trasfezione utilizzando solo i complessi ottenuti con le SLN-Pluronic (al rapporto in peso di 240:1). L'efficienza di trasfezione dei complessi è stata paragonata a quella della Lipofectamine 2000, utilizzata comunemente come agente trasfettante (controllo).

Dal momento che la presenza del plasmide shNupr1 all'interno del nucleo cellulare determina la produzione di small interfering RNA

(siRNA) che silenziano l'espressione del gene Nupr1, la capacità trasfettante del complesso selezionato è stata valutata determinando quantitativamente l'espressione di Nupr1 mediante PCR semi-quantitativa.

Come mostrato in Figura 40, l'espressione della Nupr1 è risultata pari al 70% nelle cellule trasfettate con le SLN-Pluronic rispetto al controllo.

Si è dunque ottenuta una riduzione del 30% di silenziamento del gene Nupr1.

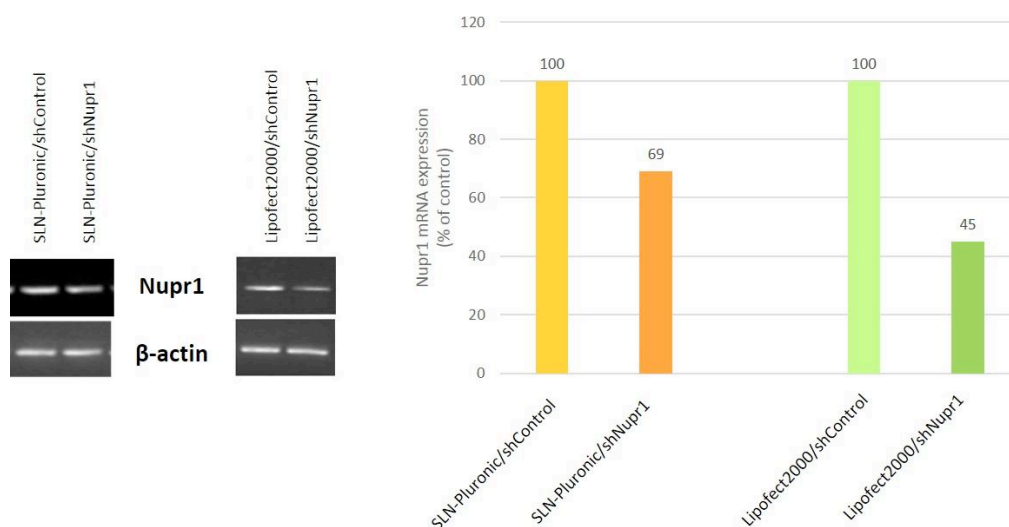


Figura 40. Trasfezione su cellule Hep3B. Le cellule sono state trasfettate con i complessi SLN-Pluronic:shControl e SLN-Pluronic:shNupr1. Dopo 24h è stato estratto l'RNA totale mediante Trizol. L'RNA è stato retrotrascritto e il cDNA ottenuto è stato impiegato per valutare i livelli di espressione di Nupr1.

3.2.1.5 Saggio della degradazione ad opera della DNasi I

Per valutare la capacità delle SLN cationiche di proteggere il DNA dalla degradazione enzimatica, è stato effettuato il saggio della degradazione ad opera della DNasi.

Sono stati saggiati i complessi ottenuti con le SLN-Pluronic al rapporto in peso di 240:1, in quanto capaci di trasfettare il plasmide shNupr1 nelle cellule di epatocarcinoma e prive di effetti citotossici.

Il plasmide nudo ed i complessi SLN:DNA sono stati incubati per 30 minuti a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in presenza e in assenza di DNasi I.

Successivamente i campioni sono stati estratti, precipitati e sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio al fine di valutare l'integrità del plasmide.

In Figura 41 è possibile osservare gli effetti protettivi esercitati dalle nanoparticelle cationiche nei confronti del DNA.

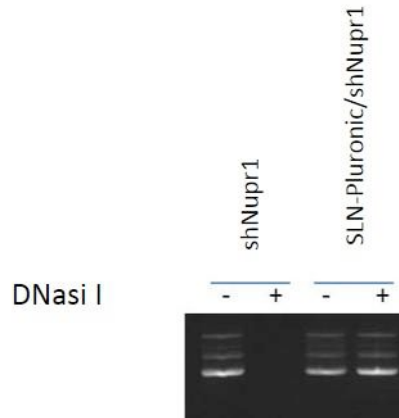


Figura 41. Elettroforesi in gel d'agarosio di shNupr1 dopo digestione da parte della DNasi I. Il plasmide shNupr1 nudo ed i complessi SLN:shNupr1 al rapporto 240:1 (p/p) sono stati incubati in assenza ed in presenza di DNasi I per 30 minuti a 37°C \pm 1°C.

Il saggio elettroforetico conferma infatti che, mentre il plasmide nudo è stato completamente digerito dopo l'incubazione con la DNasi I, il DNA complessato con le SLN cationiche non è stato degradato. Di conseguenza si può affermare che le SLN cationiche sono in grado di proteggere il DNA dall'azione dell'enzima di degradazione (DNasi).

3.2.2 SLN cationiche preparate mediante omogeneizzazione con Microfluidizer LM-10

3.2.2.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta

Le SLN cationiche sono state preparate utilizzando gli stessi materiali utilizzati precedentemente descritti (paragrafo 3.2.1) e cioè il Precirol ATO 5 (gliceril distearato) come matrice lipidica, il DDAB (dioctadecil-dimetilammonio bromuro) come lipide cationico, ed il Brij 76 o il Pluronic F68 come tensioattivi non ionici. In questo caso è stata sempre utilizzata la tecnica della precipitazione etanolica, ma la pre-emulsione calda ottenuta è stata sottoposta a successiva omogeneizzazione ad alta pressione mediante uso dell'omogeneizzatore Microfluidizer LM 10 (Microfluidics, Westwood, MA, USA), così come riportato nella parte sperimentale.

Al fine di valutare le caratteristiche chimico-fisiche dei sistemi nanoparticellari sono state eseguite misure delle dimensioni con relativo indice di polidispersità (PDI) e misure di potenziale zeta. I risultati ottenuti sono mostrati in Tabella 6. Entrambi i sistemi hanno mostrato dimensioni inferiori a 200 nm, con indice di polidispersità

inferiore a 0.350. La presenza del DDAB, incorporato nella matrice lipidica, ha conferito alle nanoparticelle valori di carica superficiale positivi ed elevati.

CAMPIONE	SIZE (nm)	PDI	POTENZIALE ZETA ± DEV.ST
SLN-Brij-MF	184.4	0.306	+43.3±7.73
SLN-Pluronic-MF	185.5	0.330	+32.0±9.22

Tabella 6. Valori di dimensioni, indice di polidispersità e potenziale zeta delle SLN in acqua bidistillata.

3.2.2.2 Capacità delle SLN cationiche di complessare il plasmide shNupr1

Per la complessazione del plasmide shNupr1 sono stati utilizzati entrambi i sistemi SLN-Brij-MF e SLN-Pluronic-MF in sospensione acquosa, senza previa liofilizzazione, in quanto sono risultati stabili dopo conservazione in sospensione a 4°C, mantenendo le caratteristiche chimico-fisiche inalterate.

I complessi SLN:DNA sono stati ottenuti disperdendo in acqua bidistillata uguali volumi di shNupr1 (alla concentrazione di 5 ng/μl) e SLN cationiche alle opportune concentrazioni, in modo da ottenere rapporti in peso SLN:DNA di 10:1, 25:1, 50:1, 100:1 e 200:1.

La capacità di entrambi i sistemi nanoparticellari di complessare il plasmide shNupr1 è stata verificata contemporaneamente mediante elettroforesi in gel d'agarosio e misure di potenziale zeta. Come si può osservare nell'immagine del gel elettroforetico (Fig. 42), le SLN-Brij-MF hanno mostrato una capacità complessante migliore rispetto alle SLN-Pluronic-MF: il DNA è risultato essere completamente complessato dalle SLN-Brij-MF al rapporto SLN:DNA di 50:1 (p/p), mentre per le SLN-Pluronic-MF la totale complessazione è stata ottenuta al rapporto SLN:DNA di 100:1 (p/p).

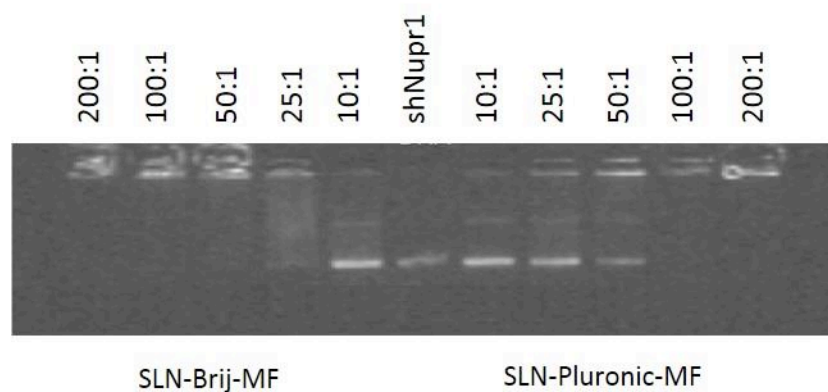


Figura 42. Mobilità elettroforetica in gel d'agarosio dei complessi a diversi rapporti SLN:shNupr1 (p/p)

E' inoltre possibile notare come, rispetto alle SLN ottenute tramite omogeneizzazione con UltraTurrax T25, le SLN cationiche

prodotte con l'omogeneizzazione ad alta pressione mostrino una capacità complessante migliore. I rapporti in peso SLN:DNA necessari per complessare totalmente il plasmide risultano infatti inferiori per entrambi i sistemi (50:1 piuttosto che 100:1 per le SLN-Brij-MF; 100:1 piuttosto che 240:1 per le SLN-Pluronic-MF).

L'andamento dei valori di potenziale zeta in funzione dei vari rapporti SLN:DNA ha confermato i risultati dell'elettroforesi.

La Figura 43 mostra come, all'aumentare del rapporto SLN:DNA, si verifichi un incremento del potenziale zeta con raggiungimento di valori positivi nei rapporti a partire da 50:1 (p/p) per le SLN-Brij-MF, e nel rapporto di 100:1 (p/p) per le SLN-Pluronic-MF.

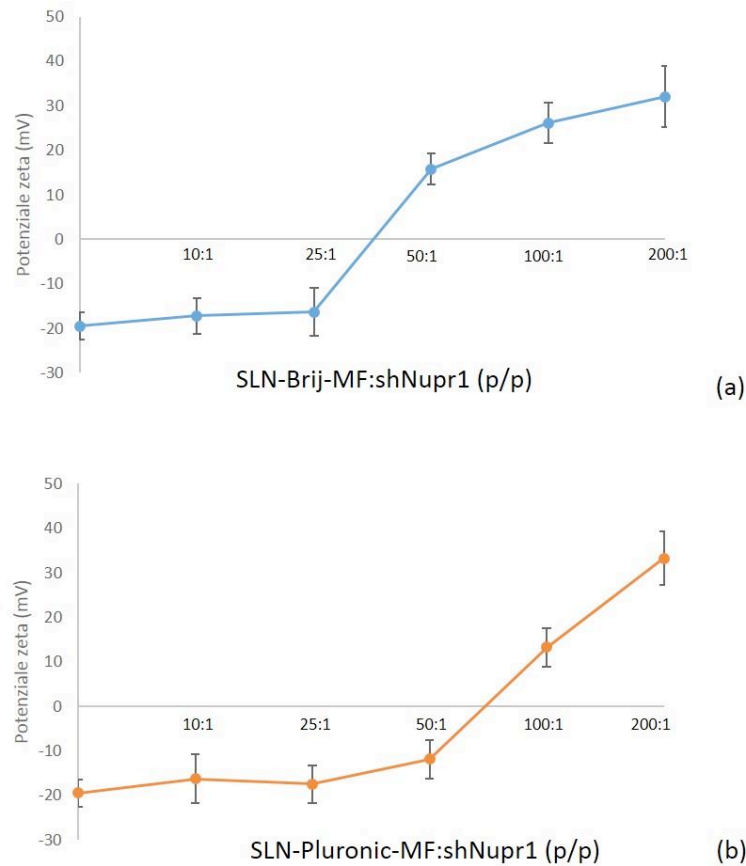


Figura 43. Valori di potenziale zeta dei complessi SLN-Brij-MF:shNupr1 (a) e SLN-Pluronic-MF:shNupr1 (b) a diversi rapporti p/p.

3.2.2.3 Analisi dimensionale dei complessi SLN:shNupr1

E' stato effettuato inoltre uno studio delle dimensioni dei complessi ottenuti in diversi intervalli di tempo (Fig. 44 a e b). Come si può osservare, le dimensioni dei complessi ottenuti tendevano ad aumentare fino a circa sei ore di incubazione. Dopo tale periodo rimanevano stabili fino a 24 ore. Nel caso delle SLN-Brij-MF è stato

osservato anche che le dimensioni tendevano a diminuire all'aumentare dei rapporti SLN:DNA. Probabilmente i diversi comportamenti dei due tipi di SLN sono da attribuire alla presenza di tensioattivi diversi (Brij 76 o Pluronic F68), che influenzano le interazioni superficiali tra SLN e DNA. Sono attualmente in corso misure tramite Microscopia a Forza Atomica (AFM) dei complessi ottenuti al fine di verificare ed eventualmente confermare i dati ottenuti tramite la PCS.

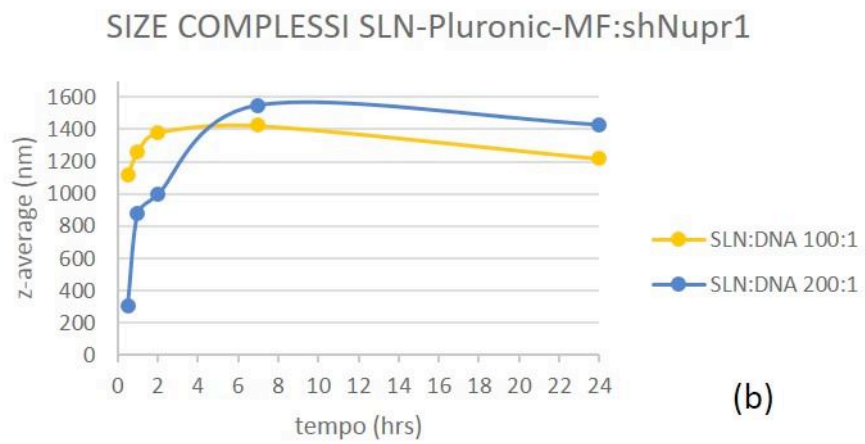
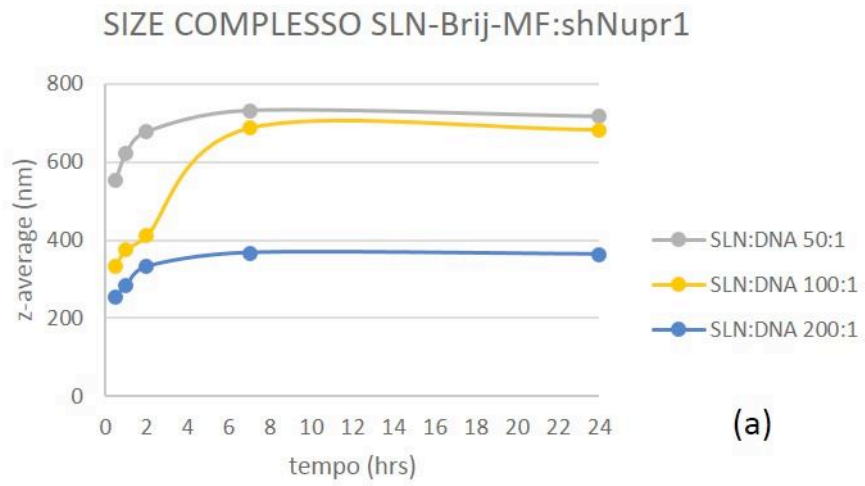


Figura 44. Valori di size dei complessi SLN-Brij-MF (a) e SLN-Pluronic-MF (b) con shNupr1 a diversi rapporti in peso fino a 24 ore.

3.2.2.4 Stabilità dei complessi SLN:shNupr1 in presenza di albumina

La stabilità dei complessi in presenza di proteine plasmatiche è un parametro importante per valutare l'efficacia dei nanosistemi come vettori per gene delivery. Nel plasma infatti, sono presenti diverse proteine, cariche negativamente a pH fisiologico, che possono agire da scambiatori anionici e sostituirsi al DNA dopo interazione con la superficie positiva delle nanoparticelle. A tale scopo è stata valutata la stabilità dei complessi (SLN-Brij-MF:shNupr1 ai rapporti 50:1, 100:1 e 200:1 (p/p); SLN-Pluronic-MF:shNupr1 ai rapporti 100:1 e 200:1 (p/p)) tramite elettroforesi in gel d'agarosio, dopo incubazione fino a 24 ore con una soluzione acquosa di BSA (Bovine Serum Albumin), la cui concentrazione è descritta nella parte di materiali e metodi. L'albumina è stata scelta tra i possibili scambiatori anionici in quanto rappresenta la proteina più abbondante nel plasma.

Come si può osservare in Figura 45, almeno fino a 24 ore tutti i complessi SLN:DNA, nei rapporti in peso analizzati, sono risultati stabili. Il DNA infatti, continuando ad interagire con le SLN, non è migrato verso il catodo ed è rimasto trattenuto nel pozzetto. I dati ottenuti suggeriscono dunque che, non avvenendo scambio anionico con l'albumina, i complessi SLN:DNA potrebbero circolare nel torrente

ematico senza subire dissociazione, e veicolare il materiale genico nell'organo bersaglio.

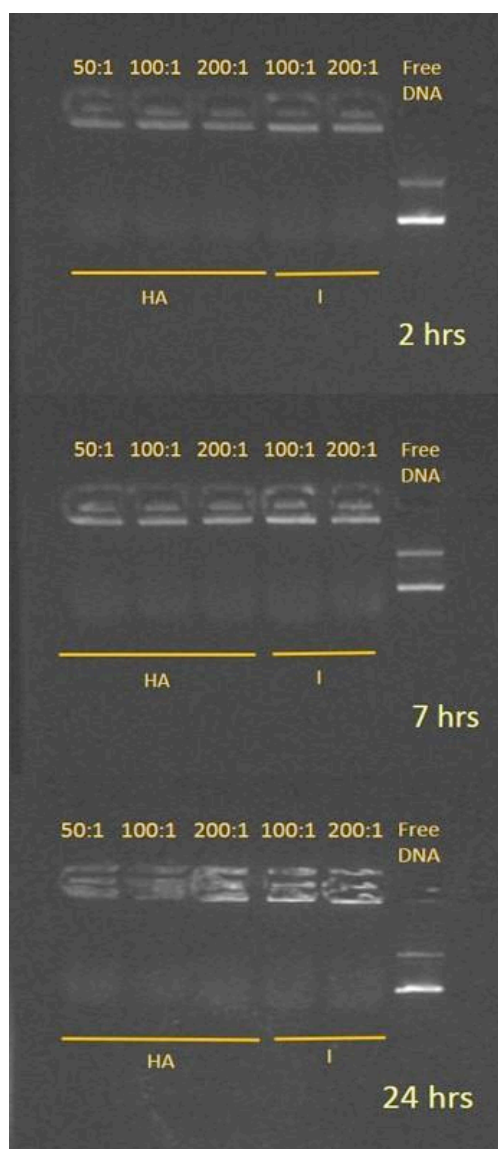


Figura 45. Mobilità elettroforetica in gel d'agarosio dei complessi SLN:DNA dopo 2, 7 e 24 ore di incubazione con una soluzione acquosa di BSA.

3.2.2.5 Test emolitici

Al fine di ottenere informazioni preliminari sulla biocompatibilità dei nanosistemi, progettati per la somministrazione parenterale, sono stati effettuati test emolitici incubando con eritrociti umani le SLN cationiche vuote o complessate con il plasmide shNupr1. Dopo un'ora di incubazione a $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ l'emoglobina rilasciata in seguito alla lisi dei globuli rossi è stata quantificata tramite spettroscopia UV. Gli eritrociti sono stati trattati rispettivamente con una soluzione all'1% (v/v) di Triton X-100 e DPBS a pH 7.4 al fine di ottenere i valori corrispondenti al 100% e 0% di lisi. E' stato osservato per tutti i sistemi che la complessazione con il plasmide riduce significativamente la percentuale di emolisi. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che il DNA scherma la carica positiva presente sulla superficie delle SLN, che sarebbe principalmente responsabile della lisi dei globuli rossi. Confrontando le SLN con Brij e quelle con Pluronic, è possibile notare che agli stessi rapporti di complessazione il sistema SLN-Pluronic-MF, determina una percentuale di emolisi maggiore rispetto al sistema SLN-Brij-MF (Fig. 46 a e b). In tutti i casi considerati, è possibile accettare le percentuali di emolisi ottenute incubando gli eritrociti con tutti i complessi SLN:DNA.

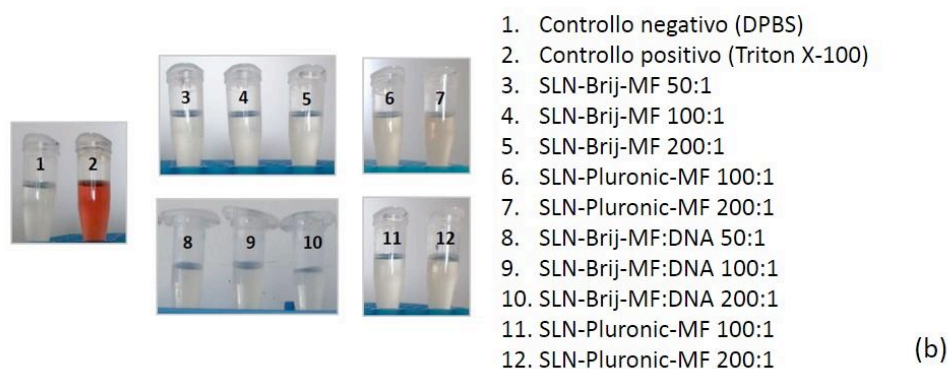
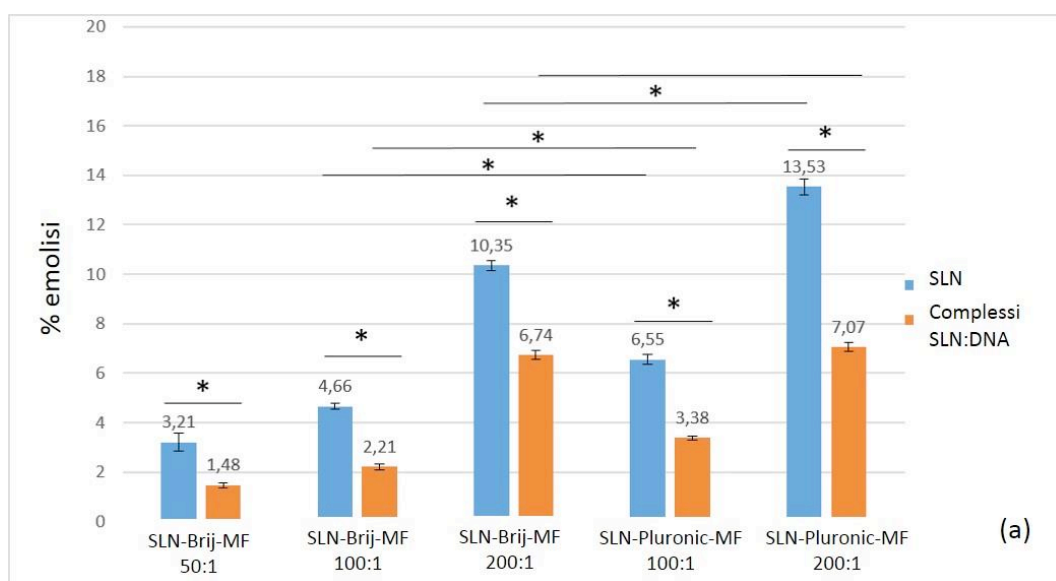


Figura 46. Risultati dei test emolitici ottenuti dopo incubazione delle SLN vuote o complessate con il plasmide shNupr1, con eritrociti umani per 1 ora a 37°C. I dati mostrati rappresentano la media di tre diversi esperimenti.

3.2.2.6 Studi di vitalità cellulare

Al fine di valutare l'eventuale citotossicità dei sistemi nanoparticellari e dei relativi complessi con il plasmide, sono stati effettuati saggi MTS sulla linea cellulare di epatocarcinoma umano Hep3B.

Le cellule sono state incubate con le SLN e con i complessi ottenuti utilizzando il plasmide shControl in diversi rapporti in peso (50:1, 100:1 e 200:1 per le SLN-Brij-MF; 100:1 e 200:1 per le SLN-Pluronic-MF). shControl è stato scelto come plasmide controllo in quanto privo della sequenza di nucleotidi responsabile dell'azione sulla proteina Nupr1.

Le SLN-Pluronic-MF, sia vuote che complessate con il plasmide, non hanno mostrato effetti citotossici a nessuno dei rapporti in peso testati. Le SLN-Brij-MF hanno invece determinato riduzione della vitalità cellulare in maniera concentrazione dipendente, in modo più evidente quando complessate con il plasmide (Fig. 47).

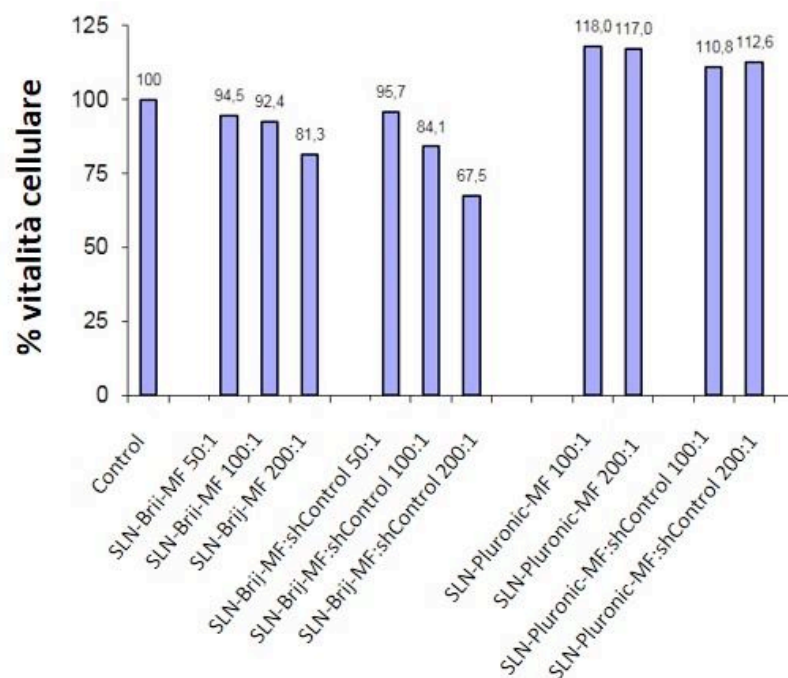


Figura 47. Citotossicità delle SLN-Brij-MF e delle SLN-Pluronic-MF vuote e con i rispettivi complessi con il plasmide shControl ai rapporti (p/p) indicati su cellule Hep3B. I dati sono espressi come percentuale di vitalità in cellule trattate con i sistemi e rappresentano la media di tre diversi esperimenti.

3.3 Nanoparticelle lipidiche contenenti curcumina

Sono stati realizzati tre tipi di nanoparticelle lipidiche solide (SLN), sia vuote che cariche di curcumina.

La tecnica della precipitazione etanolica, utilizzata per la produzione delle SLN, ha consentito di incorporare all'interno dei nanosistemi quantità notevoli di curcumina.

Sono stati preparati tre campioni di nanoparticelle carichi di curcumina utilizzando tre diverse matrici lipidiche solide: Imwitor 900 (miscela di mono- e di gliceridi dell'acido stearico e palmitico), Compritol 888 ATO (miscela di mono-, di- e trigliceridi dell'acido behenico) e Precirol ATO 5 (gliceril distearato).

Al fine di valutare la tossicità dei materiali utilizzati sono stati realizzati i corrispondenti campioni privi di farmaco.

Tutti i sistemi ottenuti sono stati caratterizzati da un punto di vista chimico-fisico in termini di carica superficiale (ζ -potential), dimensioni, indice di polidispersità (PDI) in acqua e mezzi salini. In seguito sono stati caratterizzati anche da un punto di vista tecnologico-farmaceutico in termini di capacità di carico (loading capacity %) e di capacità di rilascio del farmaco (drug release). Il sistema avente le

caratteristiche migliori è stato inoltre testato in vitro su due linee cellulari di carcinoma ovarico: A2780S e A2780CP, rispettivamente cisplatino sensibili e resistenti.

3.3.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta

Le caratteristiche chimico-fisiche dei sistemi nanoparticellari sono state valutate tramite misure delle dimensioni con relativo indice di polidispersità (PDI) e misure di carica superficiale in acqua bidistillata, tampone a pH 7.4 (PBS) e soluzione fisiologica (NaCl 0.9% p/v).

Le Tabelle 8, 9, 10 mostrano i valori delle dimensioni, PDI e potenziale zeta ottenuti dall'analisi dei diversi campioni di nanoparticelle rispettivamente in acqua bidistillata, PBS a pH 7.4 e NaCl 0.9% p/v.

CAMPIONE	SIZE (nm)	PDI	POTENZIALE.ZETA ± DEV.ST.
SLN-Imwitor vuote	127.23	0.318	-21.2±1.8
SLN-Imwitor Cur	135.15	0.325	-24.1±1.5
SLN-Compritol vuote	105.15	0.288	-24.3±2.3
SLN-Compritol Cur	110.42	0.265	-27.3±2.1
SLN-Precirol vuote	117.14	0.266	-18.4±1.9
SLN-Precirol Cur	129.62	0.315	-21.5±2.0

Tabella 8. Valori di size, PDI e potenziale zeta (mV) ± Dev. St. delle SLN in acqua bidistillata.

CAMPIONE	SIZE (nm)	PDI	POTENZIALE ZETA ± DEV.ST.
SLN-Imwitor vuote	197.11	0.431	-12.4
SLN-Imwitor Cur	224.67	0.472	-13.7
SLN-Compritol vuote	180.36	0.380	-16.6
SLN-Compritol Cur	211.44	0.385	-8.87
SLN-Precirol vuote	259.17	0.396	-9.45
SLN-Precirol Cur	270.66	0.425	-10.7

Tabella 9. Valori di size, PDI e potenziale zeta (mV) delle SLN in PBS a pH 7.4

CAMPIONE	SIZE (nm)	PDI	POTENZIALE ZETA ± DEV.ST.
SLN-Imwitor vuote	223.79	0.443	-14.7
SLN-Imwitor Cur	254.66	0.482	-12.9
SLN-Compritol vuote	187.05	0.413	-11.6
SLN-Compritol Cur	220.46	0.408	-7.96
SLN-Precirol vuote	241.97	0.365	-10.1
SLN-Precirol Cur	277.39	0.397	-9.9

Tabella 10. Valori di size, PDI e potenziale zeta (mV) delle SLN in NaCl 0.9% (p/v).

Le SLN, sia piene che cariche di curcumina, hanno presentato dimensioni comprese tra 105 e 135 nm in acqua bidistillata, con valori di PDI non superiori a 0.32, ad indicare l'omogeneità dei sistemi. I valori di potenziale zeta sono risultati abbastanza negativi da garantirne la stabilità chimico-fisica. Nei mezzi salini è stato riscontrato per tutti i sistemi un incremento dei valori di size, che si sono comunque mantenuti al di sotto dei 300 nm. Dall'analisi dei valori di PDI e potenziale zeta si deduce che il mezzo acquoso salino ha determinato

anche un lieve aumento della polidispersità ed una riduzione, in valore assoluto, dei valori di carica superficiale.

3.3.2 Loading capacity (LC%)

Per determinare la quantità di curcumina intrappolata nelle nanoparticelle sono state effettuate analisi all'HPLC, così come riportato nella parte sperimentale. I valori di loading capacity (LC%), espressi come percentuale in peso di farmaco rispetto alla quantità di nanoparticelle (farmaco + matrice lipidica) sono risultati rispettivamente 21.1%, 25.3% e 27.4% per le SLN-Imwitor Cur, SLN-Compritol Cur e SLN-Precirol Cur. In tutti i casi l'efficienza di intrappolamento è risultata prossima al 100%.

3.3.3 Cinetiche di rilascio in plasma umano

Gli studi di rilascio sono stati effettuati incubando le SLN in plasma umano a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, come riportato nella parte sperimentale. I profili di rilascio della curcumina dalle SLN sono riportati in Figura 48.

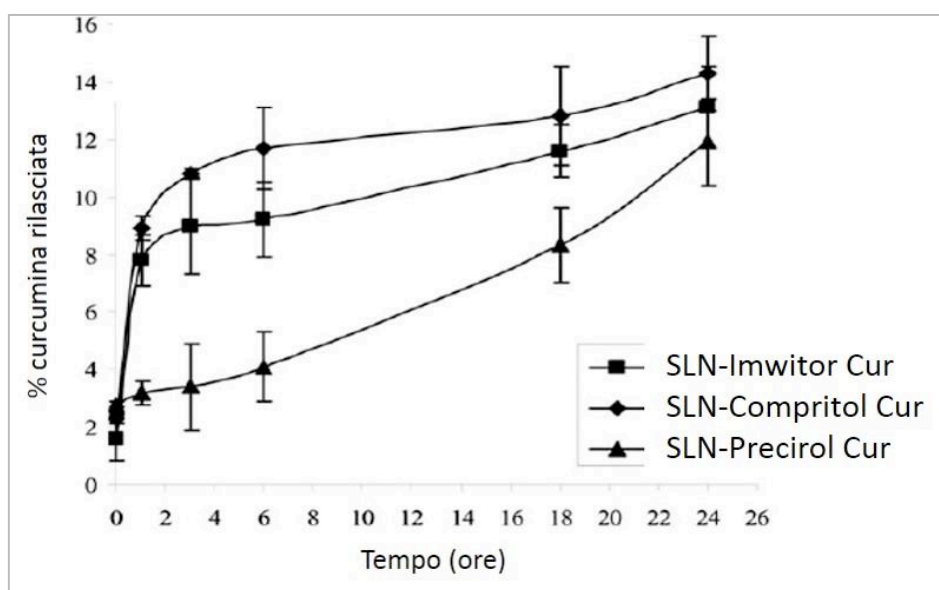


Figura 48. Profili di rilascio della curcumina in plasma umano dalle SLN.

Come si evince dal grafico, i sistemi (le SLN-Imwitor Cur e le SLN-Compritol Cur in maniera più evidente) hanno presentato un burst effect iniziale, seguito da un rilascio controllato di curcumina. In particolare, dopo 24 ore di incubazione la quantità totale di curcumina rilasciata è risultata pari a circa il 12-13%. Considerato che in letteratura è ampiamente riportato che la curcumina presenta una buona stabilità in plasma [Bondi et al., 2010; Ramalingam et Ko, 2014; Leung et Kee, 2009], è stata determinata anche la quantità residua all'interno delle SLN. Tali studi hanno confermato che dopo 24 ore di incubazione la quantità non rilasciata di curcumina si trovava ancora all'interno delle nanoparticelle (dati non mostrati).

La presenza di curcumina all'interno dei nanosistemi era abbastanza elevata e questo costituisce un dato molto importante, considerando che in questo modo essa avrebbe la possibilità di essere rilasciata in situ dopo avere raggiunto l'organo bersaglio.

3.3.4 Studi di vitalità cellulare

Inizialmente sono stati valutati gli effetti della curcumina, in forma libera e veicolata dalle SLN-Compritol, sulla morfologia delle cellule A2780S e A2780CP. Dalle immagini ottenute al microscopio invertito (Fig. 49) si può notare come il trattamento di 24 ore con curcumina libera e con le SLN-Compritol Cur abbia provocato profonde alterazioni della morfologia cellulare. Al contrario, la morfologia è rimasta invariata e paragonabile a quella del controllo (cellule trattate con solo DMSO) quando le cellule sono state incubate con le SLN-Compritol vuote, indicando l'assenza di tossicità del carrier.

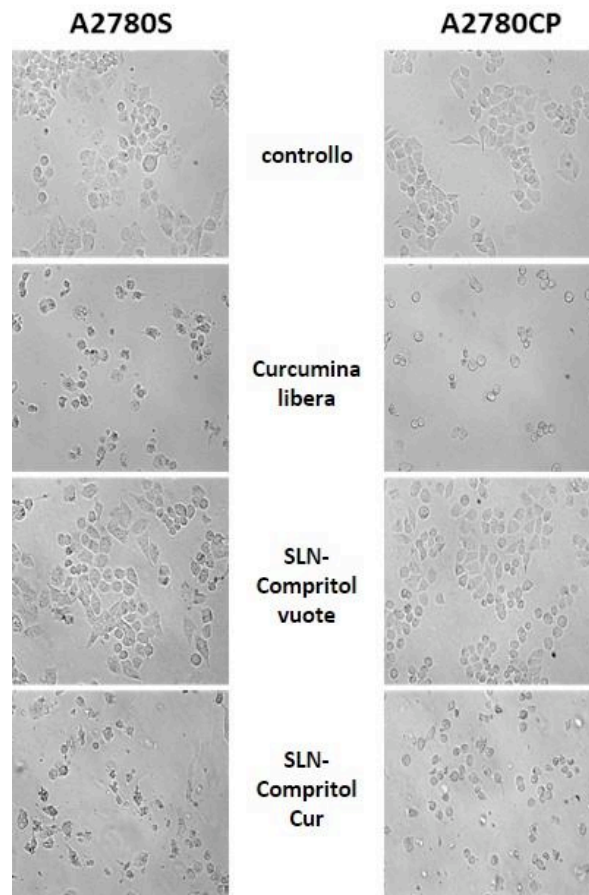


Figura 49. Cellule di carcinoma ovarico A2780S e A2780CP trattate con DMSO (controllo), curcumina libera (30 μ M), SLN-Compritol vuote o cariche di curcumina (30 μ M) per 24 ore. I monostrati cellulari sono stati esaminati al microscopio invertito e fotografati.

Al fine di confermare i risultati ottenuti dagli studi morfologici, sono state effettuate prove di citotossicità tramite saggi MTS su entrambe le linee cellulari, incubando le cellule per 72 ore con curcumina libera, SLN-Compritol Cur e SLN-Compritol vuote.

In Figura 50 si può osservare che in entrambe le linee cellulari le nanoparticelle vuote non hanno provocato riduzione della vitalità

cellulare. In seguito a trattamento con curcumina libera o veicolata dalle SLN invece, la vitalità cellulare è stata ridotta in maniera paragonabile e concentrazione-dipendente, per concentrazioni di curcumina superiori a 10 μM .

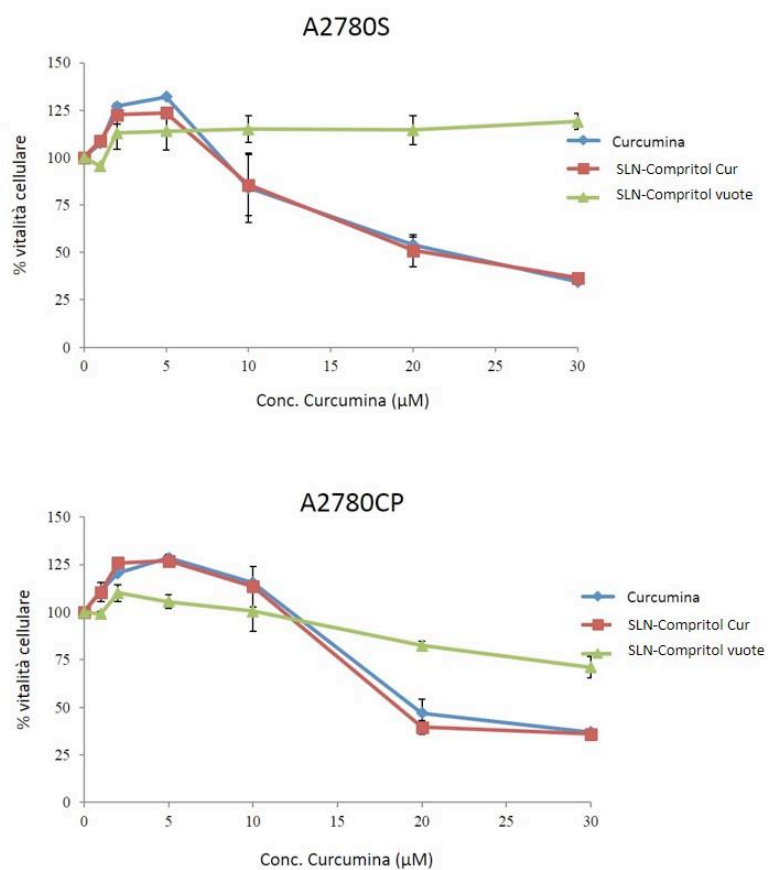


Figura 50. Effetti della curcumina libera, SLN vuote e SLN cariche di curcumina sulla vitalità delle cellule di carcinoma ovarico A2780S e A2780CP. Le cellule sono state trattate per 72 ore e la vitalità cellulare è stata determinata tramite saggi MTS.

3.3.5 Studio del meccanismo molecolare della curcumina libera e veicolata da SLN

Al fine di valutare il meccanismo d'azione molecolare della curcumina, è stata analizzata tramite Western blotting l'espressione di alcune proteine coinvolte nei fenomeni apoptotici, di stress o sopravvivenza cellulare dopo trattamento delle due linee cellulari con curcumina libera e veicolata. In particolare, si può notare in Figura 51 come, in presenza di curcumina, sia libera che veicolata, venga ridotta l'espressione di Mcl-1, Bcl2 e survivina (proteine antiapoptotiche), β -catenina (oncogene) ed IL-6 (coinvolta nella sopravvivenza cellulare). Risultano anche evidenti il clivaggio di PARP (proteina coinvolta nei meccanismi di riparazione del DNA) con la presenza del frammento di 85 kDa e l'attivazione del pathway proapoptotico p38-MAPK (solo nelle cellule A2780S).

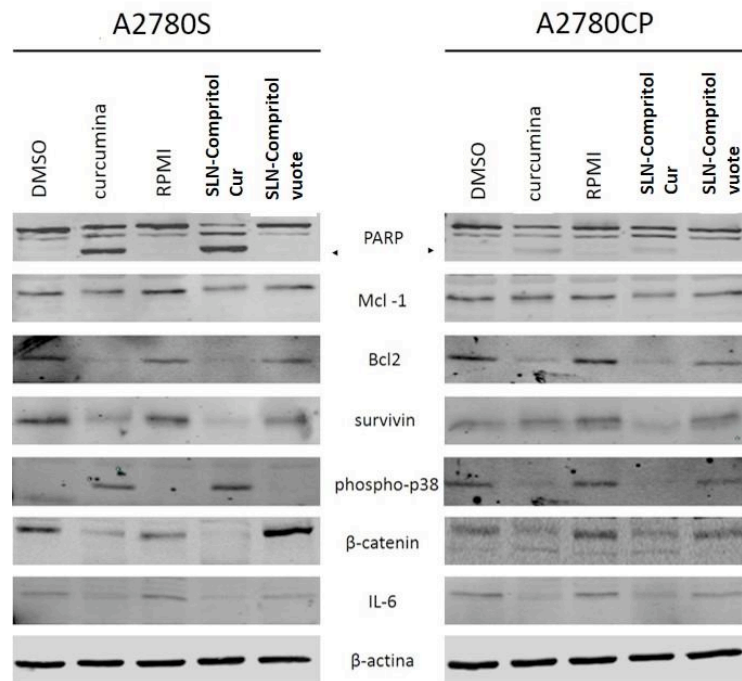


Figura 51. Le linee cellulari A2780S e A2780CP sono state trattate per 24 ore con DMSO (controllo), curcumina libera (30 μ M), mezzo di coltura (RPMI), SLN-B vuote e SLN-B Cur (30 μ M). Dopo il trattamento, le cellule sono state raccolte e lisate. Quantità equivalenti di proteine estratte sono state analizzate per PARP, Mcl-1, Bcl2, survivina, phospho-p38, β -catenina ed IL-6 tramite Western blotting. Le freccette indicano il frammento di 85 kDa di PARP.

3.3.6 Uptake cellulare

La curcumina è una molecola naturalmente fluorescente nello spettro del visibile dove appare di colore verde. Al fine di valutare la capacità delle cellule A2780S e A2780CP di internalizzare le SLN cariche di curcumina, è stato effettuato un saggio in vitro incubando le cellule con curcumina libera o veicolata dalle SLN e osservandole con un microscopio a fluorescenza. La Figura 52 mostra il marcato

incremento della fluorescenza nelle cellule trattate con curcumina libera e veicolata dalle SLN-Compritol, rispetto al controllo (cellule trattate con solo DMSO) e a quelle trattate con SLN-Compritol vuote, indicando che in entrambi i casi la curcumina è stata internalizzata dalle cellule.

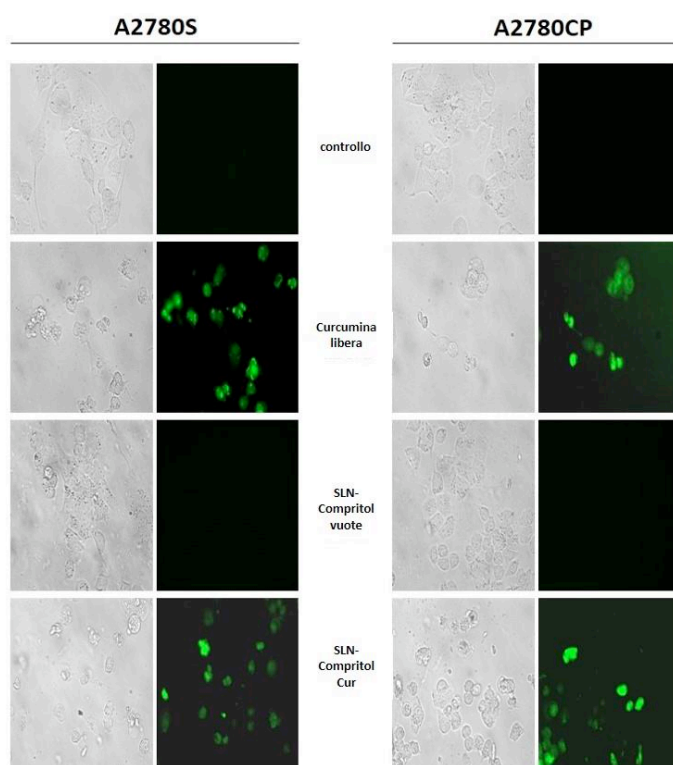


Figura 52. Marcato incremento della fluorescenza nelle cellule A2780S e A2780CP incubate per 24 ore con curcumina libera (30 μ M) e veicolata dalle SLN-B (30 μ M) paragonate al controllo e a quelle trattate con le SLN-B vuote.

3.3.7 Effetti della curcumina libera e veicolata da SLN sull'apoptosi cellulare

Gli effetti sull'apoptosi cellulare della curcumina, sia in forma libera che veicolata, sono stati studiati tramite microscopia a fluorescenza. Le cellule A2780S e A2780CP sono state incubate con curcumina libera, SLN-Compritol Cur e SLN-Compritol vuote e paragonate ad un controllo di cellule trattate con solo DMSO. In Figura 53 è possibile osservare la condensazione nucleare e la frammentazione del DNA, caratteristiche dell'apoptosi, nelle cellule trattate con curcumina libera e SLN-Compritol cariche di curcumina.

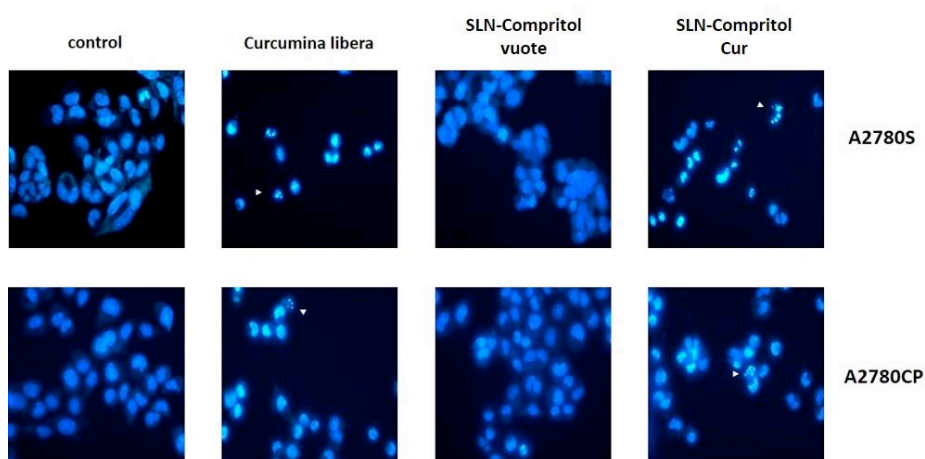


Figura 53. Le cellule A2780S e A2780CP sono state incubate in presenza di DMSO (controllo), curcumina libera, SLN-Compritol vuote, SLN-Compritol Cur, marcate con il colorante Hoechst 33258 specifico per il DNA e visualizzate al microscopio a fluorescenza. Le freccette indicano le cellule in cui è avvenuta frammentazione nucleare.

3.3.8 Saggio clonogenico

Al fine di valutare la capacità delle singole cellule tumorali di formare colonie dopo trattamento per 7 giorni con curcumina libera e veicolata, è stato effettuato un saggio clonogenico sulle linee cellulari A2780S e A2780CP. Come si può osservare in Figura 54, la proliferazione cellulare risulta essere inibita in maniera dose dipendente in seguito al trattamento con curcumina. Inoltre, tale inibizione risulta essere molto più accentuata quando la curcumina viene veicolata dalle SLN, segno che la sua attività a lungo termine è incrementata rispetto a quella della forma libera.

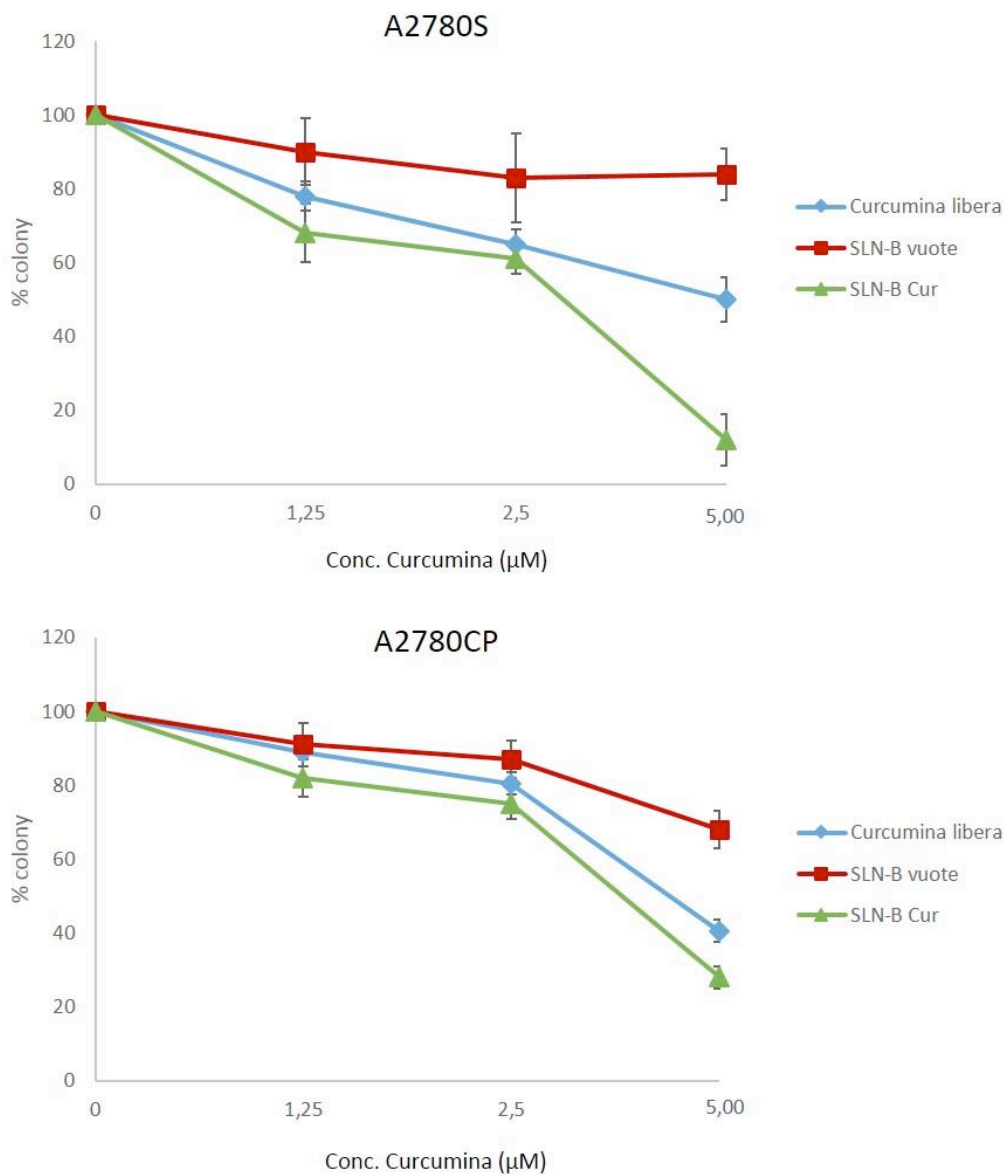


Figura 54. Il saggio clonogenico è stato effettuato paragonando gli effetti della curcumina in forma libera e veicolata dalle SLN sulle cellule A2780S e A2780CP. Le cellule sono state trattate con solo DMSO (controllo), curcumina libera e veicolata alle concentrazioni indicate, e SLN vuote. Dopo 6 ore le cellule sono state lavate con mezzo di coltura (RPMI), cresciute per 7 giorni e contate al microscopio ottico.

4. CONCLUSIONI

Considerato il crescente interesse in campo tecnologico-farmaceutico rivolto alle nanoparticelle lipidiche e la loro versatilità di impiego, il presente lavoro di dottorato è stato finalizzato alla preparazione di SLN e NLC utilizzate come carrier di farmaci ed acidi nucleici, al fine di valutarne la potenzialità d'impiego nel trattamento del carcinoma epatocellulare e del carcinoma ovarico.

Per quanto riguarda le nanoparticelle contenenti sorafenib, i carriers lipidici hanno mostrato buone capacità di incorporare il farmaco e dimensioni tali da poter essere proposte per la formulazione di sistemi colloidali in campo farmaceutico.

Le dimensioni nanometriche sono state confermate dalla Microscopia Elettronica a Scansione (SEM), la quale ha dato anche informazioni sulla morfologia sferica delle nanoparticelle.

I dati sperimentali ottenuti dagli studi di rilascio del sorafenib dalle nanoparticelle in plasma umano hanno mostrato una migliore protezione del farmaco nei confronti della degradazione e/o legame alle proteine plasmatiche. I sistemi hanno quindi migliorato la biodisponibilità del sorafenib che, in forma libera, risulta suscettibile a fenomeni di degradazione e legame alle proteine.

I sistemi inoltre non hanno mostrato significativa attività emolitica, requisito fondamentale per la somministrazione parenterale di sistemi colloidali.

La veicolazione del sorafenib mediante l'impiego di tali sistemi, potrebbe dunque offrire una maggiore possibilità di accumulo del farmaco nel tessuto tumorale epatico mediante un targeting passivo.

Il saggio clonogenico in vitro, condotto su una linea cellulare di carcinoma epatico umano (HepG2) ha evidenziato che la veicolazione di sorafenib tramite NLC, inibisce, in maniera dose-dipendente, la formazione di colonie cellulari. Inoltre l'attività del farmaco è molto più elevata quando impiegato in forma veicolata dalle NLC.

Questi risultati suggeriscono che i sistemi descritti nel presente lavoro potrebbero essere proposti come carriers per la veicolazione del sorafenib in prove in vivo, al fine di poter valutare un eventuale miglioramento dell'attività terapeutica del farmaco veicolato rispetto alla sua forma libera.

Oltre alle nanoparticelle cariche di sorafenib, per il trattamento del carcinoma epatocellulare sono state progettate e realizzate SLN cationiche in grado di complessare il plasmide shNupr1, avente la funzione di ridurre l'espressione della proteina Nupr1, coinvolta in diversi meccanismi di carcinogenesi e proliferazione tumorale.

La tecnica della precipitazione etanolica ha consentito di ottenere nanoparticelle di dimensioni nanometriche con un valore di potenziale zeta positivo ed elevato. L'omogeneizzazione mediante uso dell'omogeneizzatore ad alta pressione Microfluidizer LM-10, rispetto a quella ottenuta tramite Ultra Turrax T25, ha consentito di ottenere particelle con dimensioni inferiori, meno polidisperse e più stabili alla conservazione.

Tutte le SLN cationiche ottenute (contenenti Brij 76 o Pluronic F68) sono state capaci di legare efficientemente il DNA a determinati rapporti in peso SLN:DNA, come confermato dalla mobilità elettroforetica dei complessi in gel d'agarosio e dalle relative misure di potenziale zeta. In particolare, i sistemi ottenuti tramite omogeneizzazione ad alta pressione hanno mostrato migliori capacità complessanti.

I sistemi ottenuti mediante omogeneizzazione con Ultra Turrax T25 (sia le SLN-Brij che le SLN-Pluronic) hanno efficientemente trasfettato il plasmide shNupr1 nella linea cellulare Hep3B di epatocarcinoma, ma solamente quelli contenenti Pluronic non hanno mostrato citotossicità sulla stessa linea cellulare. Per questo motivo il saggio della DNasi I è stato effettuato solo sui complessi ottenuti con le SLN-Pluronic. Tali sistemi hanno dimostrato di proteggere il plasmide dalla degradazione ad opera della DNasi I.

I sistemi ottenuti tramite omogeneizzazione ad alta pressione non sono invece risultati citotossici sulla linea cellulare Hep3B, ed i relativi complessi con il DNA si sono mantenuti stabili in presenza di albumina, scelta come scambiatore anionico, almeno fino a 24 ore. Inoltre, informazioni preliminari sulla biocompatibilità dei complessi sono state ottenute tramite test emolitici.

Sono attualmente in corso su questi sistemi prove di trasfezione e di protezione dalla degradazione ad opera della DNasi.

Per il trattamento del carcinoma ovarico, sono state invece progettate e realizzate nanoparticelle lipidiche contenenti curcumina, polifenolo estratto dal rizoma della *Curcuma longa*, avente proprietà antitumorali, antiossidanti e antinfiammatorie.

La tecnica utilizzata per la preparazione delle diverse SLN con curcumina (tecnica della precipitazione etanolica) ha permesso di ottenere particelle con dimensioni nanometriche e capaci di intrappolare elevate quantità. I dati sperimentali ottenuti dagli studi di rilascio dalle nanoparticelle in plasma umano hanno mostrato un rilascio lento e controllato della curcumina.

La curcumina veicolata dalle SLN ha mostrato efficacia terapeutica paragonabile a quella della curcumina libera sulle cellule A2780CP e A2780S di carcinoma ovarico, come si evince dai saggi MTS. Anche i meccanismi d'azione della curcumina veicolata sono risultati paragonabili a quelli della curcumina libera, inclusi l'induzione dell'apoptosi cellulare (come dimostrato dalla condensazione nucleare), il clivaggio di PARP, la riduzione dell'espressione delle proteine antiapoptotiche Bcl-2, Mcl1 e survivina, così come l'attivazione del pathway proapoptotico p38

mitogen-activated protein kinase (MAPK), la riduzione dei livelli di IL-6 e dell'oncoproteina β -catenina.

I dati più interessanti sono stati ottenuti dal saggio clonogenico, il quale invece ha evidenziato una maggiore attività della curcumina veicolata dalle SLN rispetto a quella libera, sulla capacità di formare colonie.

Questi risultati suggeriscono che tali sistemi potrebbero essere proposti come carrier per la veicolazione della curcumina in prove in vivo al fine di poter valutare un miglioramento dell'attività terapeutica della molecola veicolata rispetto alla forma libera, nel trattamento del carcinoma ovarico.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Materiali

Il sorafenib (base libera) è stato acquistato presso LC Laboratories, Division of PKC Pharmaceuticals, Inc. (Woburn, MA, USA). La tripalmitina è stata acquistata alla Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany). Il Captex 355 EP/NF (trigliceridi dell'acido caprilico/caprico 50/50 w/w) è stato fornito da ABITEC Corporation (Ohio, USA). L'Imwitor 900 (miscela di mono- e di gliceridi dell'acido stearico e palmitico) ed il Miglyol 812 (trigliceridi dell'acido caproico/caprilico/caprico 50/45/5% w/w) sono stati forniti dalla Sasol GmbH (Hamburg, Germany). Il Compritol 888 ATO (miscela di mono-, di- e trigliceridi dell'acido behenico, approssimativamente 15, 50 e 35% p/p rispettivamente) ed il Precirol ATO 5 (gliceril distearato) sono stati forniti dalla Gattefossè s.a. (Saint-Priest, France). La curcumina, il Pluronic F68 ed il dioctadecildimetilammonio bromuro (DDAB), sono stati acquistati alla Sigma Aldrich (Milano, Italy). Il Brij 76 è stato acquistato alla Fluka, (Milano, Italy). L'Epikuron 200 (fosfatidilcolina di soia 95%) è stato fornito dalla Cargill (Milano, Italy). Il taurocolato di sodio è stato fornito dalla PCA (Basaluzzo, Italy). Gli altri reagenti

chimici, di grado analitico, sono stati forniti dalla Sigma Aldrich (Milano, Italy). Il siero bovino fetale (FBS) è stato acquistato alla Gibco (Carlsbad, USA). La L-glutammina, l'RPMI, ed il sodio piruvato sono stati acquistati alla Sigma Aldrich (Milano, Italy).

5.2 Metodi

5.2.1 Preparazione dei carrier lipidici nanostrutturati contenenti sorafenib

Tutti i campioni sono stati ottenuti con la tecnica della precipitazione etanolica. La fase lipidica è stata preparata portando a fusione la tripalmitina sotto costante agitazione magnetica ($85^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ circa). Successivamente al lipide solido fuso, è stato aggiunto il lipide liquido (Captex 355 EP/NF o Miglyol 812). L'Epikuron 200 è stato solubilizzato a caldo in etanolo e quindi addizionato alla fase lipidica. Per la preparazione dei sistemi carichi di sorafenib, il farmaco è stato aggiunto al lipide fuso, sotto agitazione, prima dell'aggiunta della soluzione etanolica di Epikuron.

La soluzione calda ottenuta è stata dispersa in 100 ml di acqua bi-distillata a $2-3^{\circ}\text{C}$ contenente taurocolato di sodio, sotto agitazione,

a 9,500 rpm per 10 minuti mediante impiego di Ultra Turrax T25 (IKA, D-Staufen, Germany). Le dispersioni delle NLC ottenute sono state sottoposte ad esaustiva dialisi mediante impiego di tubi da dialisi aventi un cut-off di peso molecolare 12,000-14,000 Da (Spectra/Por®, California, USA), successivamente liofilizzate mediante uso di un freeze-dryer (Labconco FreeZone 4.5 liter, USA) e conservate in freezer a $-20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.2.2 Preparazione delle nanoparticelle lipidiche cationiche

Le SLN cationiche sono state preparate tramite la tecnica della precipitazione etanolica. Il lipide solido (Precirol ATO 5) è stato riscaldato fino ad una temperatura superiore, di circa 10°C , rispetto al punto di fusione e successivamente al lipide fuso è stata aggiunta una soluzione etanolica calda di tensioattivi non ionico e cationico (Brij 76 o Pluronic F68, e DDAB). Le nanoparticelle lipidiche solide sono state ottenute disperdendo la soluzione calda ottenuta in :

- acqua bidistillata a circa $2-3^{\circ}\text{C}$, omogeneizzando mediante impiego di Ultra Turrax T25 (IKA, D-Staufen, Germany) a 9,500 rpm per 10 minuti; oppure

- acqua bidistillata a circa 80 °C, omogeneizzando successivamente con omogeneizzatore ad alta pressione Microfluidizer LM-10 (Microfluidics, USA) a 15,000 psi per 2 minuti.

Le nanoparticelle sono state purificate tramite dialisi utilizzando tubi da dialisi con cut-off di peso molecolare 12,000/14,000 Dalton (Spectra/Por®, California, USA) e conservate in sospensione.

5.2.3 Preparazione delle nanoparticelle lipidiche contenenti curcumina

Le SLN sono state preparate tramite la tecnica della precipitazione etanolica. In tutti i casi il lipide solido (Imwitor 900, Compritol 888 ATO o Precirol ATO 5) è stato riscaldato fino ad una temperatura superiore, di circa 10 °C, rispetto al punto di fusione e, per la preparazione delle SLN piene, al lipide fuso è stata aggiunta la curcumina. Successivamente alla miscela è stata aggiunta una soluzione etanolica calda di Epikuron 200. Le SLN sono state ottenute disperdendo la soluzione ottenuta in acqua bidistillata fredda (2-3°C) contenente taurocolato di sodio. La dispersione è stata omogeneizzata con UltraTurrax T25 alla velocità di 13,500 rpm per 10 minuti. Le nanoparticelle sono state purificate tramite dialisi utilizzando tubi da

dialisi con cut-off di peso molecolare 12,000/14,000 Dalton (Spectra/Por®, California, USA), successivamente liofilizzate mediante uso di un freeze-dryer (Labconco FreeZone 4.5 liter, USA) e conservate in freezer a $-20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.2.4 Determinazione delle dimensioni delle nanoparticelle

Il diametro medio e l'indice di polidispersità o PDI (misura della distribuzione delle nanoparticelle) sono stati determinati tramite Spettroscopia di Correlazione Fotonica (PCS) con uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) che utilizza una tecnologia di back-scattering non invasiva.

I campioni sono stati diluiti con acqua bidistillata Millipore filtrata su filtri di nylon con porosità di $0.2\ \mu\text{m}$, o nei mezzi salini (PBS a pH 7.4 e NaCl 0.9% p/v) fino all'ottenimento di una concentrazione ottimale. Le misure sono state effettuate ad un angolo di 173° rispetto al raggio incidente e ad una temperatura di 25°C . Ogni valore rappresenta la media di tre determinazioni.

5.2.5 Misure di potenziale zeta

La carica superficiale delle nanoparticelle (potenziale zeta) è stata determinata tramite uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) che sfrutta la tecnica della microelettroforesi. Le misure sono state effettuate ad una temperatura di 25°C sui campioni di nanoparticelle dispersi negli stessi mezzi acquosi utilizzati per l'analisi delle dimensioni.

5.2.6 Analisi SEM

Per gli studi morfologici, i campioni liofilizzati sono stati osservati utilizzando il microscopio elettronico a scansione ESEM FEI Quanta 200F. I campioni sono stati dispersi in acqua (conc. 0.3 mg/ml) e depositati direttamente su uno stub di alluminio. L'acqua è stata allontanata per evaporazione a temperatura ambiente per 24 ore e successivamente, prima dell'analisi, tutti i campioni sono stati rivestiti di polvere di oro, sotto vuoto, per 2 minuti, utilizzando uno Scancoat six Pirani S01 (Edwards, Milan, Italy).

5.2.7 Analisi cromatografica del Sorafenib

Gli studi di stabilità, la loading capacity % (quantità percentuale di principio attivo contenuto nelle NLC) e le cinetiche di rilascio del sorafenib sono stati effettuati tramite un appropriato metodo di analisi HPLC. L'analisi è stata condotta utilizzando uno strumento UFLC (Shimadzu Instrument Kyoto, Japan) costituito da due pompe (prominence LC-20AD), un detector UV-Vis SPD-20A e un sistema di interfaccia strumento-computer (CBM-20A). Come fase stazionaria è stata utilizzata una colonna C18 (Chromolith, 2 μ m, 100 x 4.60 mm i.d., Merck). L'eluizione è stata effettuata in condizioni isocratiche mediante uso di una fase mobile costituita da CH₃CN 100% ad un flusso di 1.2 ml/min. L'analisi quali-quantitativa è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 264 nm. L'integrazione automatica dei picchi del sorafenib è stata effettuata servendosi di una curva di taratura ottenuta iniettando all'HPLC soluzioni a concentrazioni note di sorafenib in una miscela di solventi organici costituita da CH₂Cl₂/CH₃CN/EtOH (4:4:2 v/v/v).

L'equazione della retta ottenuta per il sorafenib è: $y = 2.02 \cdot 10^5 x$
(y = area del picco; x = concentrazione del composto in μ g/ml).

Il coefficiente di correlazione lineare è risultato pari a $R^2 = 0.9999$.

Il range di concentrazione utilizzato per la curva di taratura entro cui si mantiene la linearità è compreso tra 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.8 Analisi cromatografica della curcumina

La loading capacity e i processi di rilascio di curcumina dai sistemi nanoparticellari sono stati determinati tramite un appropriato metodo HPLC. L'analisi cromatografica è stata condotta a temperatura ambiente usando un UFLC (Shimadzu Instrument Kyoto, Japan) costituito da due pompe (prominence LC-20AD), un detector UV-Vis SPD-20A e un sistema di interfaccia strumento-computer (CBM-20A). Come fase stazionaria è stata utilizzata una colonna C18 (μ Bondapak, 3 μm , 150 x 4.6 mm i.d., Supelco). La fase mobile era formata da una miscela $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{THF}$ (35/5/60 v/v) rispettivamente, con un flusso di 0.2 ml/min.

Il detector UV-VIS (Shimadzu) collegato all'uscita della colonna cromatografica è stato impostato ad una lunghezza d'onda pari a 416 nm.

L'analisi quantitativa della curcumina è stata effettuata tramite integrazione automatica dei picchi cromatografici, servendosi di curve di taratura ottenute iniettando all'HPLC soluzioni a concentrazione nota del farmaco.

L'equazione della retta ottenuta è: $y = 412.41x - 7662.4$ (y =area del picco; x =concentrazione del composto in $\mu\text{g/ml}$). Il coefficiente di correlazione lineare è risultato pari a $R^2 = 0.9948$. Il range di concentrazione utilizzato per la curva di taratura entro cui si mantiene la linearità è compreso tra 25 e 250 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.9 Determinazione della loading capacity (sorafenib e curcumina)

Le quantità di sorafenib e curcumina incorporate nelle nanoparticelle (loading capacity % o LC%), espresse come percentuali di farmaco contenute in 100 mg di materiale secco (matrice lipidica + farmaco) sono state calcolate nel seguente modo:

- 2 mg di nanoparticelle tripalmitina-Captex caricate con sorafenib sono stati solubilizzati in 8 ml di una miscela di solventi organici $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOH}$ (4:4:2 v/v/v);

- 2 mg di nanoparticelle tripalmitina-Miglyol caricate con sorafenib sono stati solubilizzati in 20 ml della stessa miscela.
- 5 mg di nanoparticelle caricate con curcumina sono stati solubilizzati in 10 ml di THF.

Le soluzioni ottenute sono state filtrate con filtri da 0.45 μm in PTFE e analizzate tramite HPLC (metodi sopra descritti) per determinare le quantità di sorafenib e curcumina presenti.

5.2.10 Studi di stabilità del sorafenib in plasma umano

La stabilità del sorafenib in plasma umano è stata valutata disperdendo 1 mg di farmaco libero in 4 ml di plasma e ponendo tale sospensione in bagnetto termostato alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, sotto agitazione costante. Ad intervalli di tempo prefissati è stato prelevato 1 ml di plasma, filtrato (nylon 0.45 μm) ed addizionato di 4 ml di acetonitrile. Le proteine plasmatiche precipitate sono state allontanate mediante centrifugazione del campione a 11,800 rpm per 15 minuti a 4°C utilizzando una centrifuga (Beckman Allegra X-22R) con rotore ad angolo fisso F0630. Il liquido surnatante è stato prelevato,

filtrato con filtri in PTFE da 0.45 μ m (Millipore, Milano, Italy) ed iniettato all'HPLC utilizzando la metodica sopra descritta.

5.2.11 Studi di rilascio del sorafenib in plasma umano

Il rilascio di sorafenib è stato effettuato, per ciascun sistema nanoparticellare, in cinque intervalli di tempo prefissati.

A tale scopo sono state preparate due sospensioni contenenti :

- 2.0 mg di NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco disperse in 1.5 ml di plasma umano;
- 3.6 mg di NLC tripalmitina-Miglyol cariche di farmaco disperse in 1.5 ml di plasma umano.

Tali sospensioni sono state poste in un bagnetto termostato alla temperatura di 37°C \pm 0.1°C, sotto agitazione meccanica costante. Ad intervalli di tempo prefissati i campioni sono stati prelevati, filtrati con filtri in nylon da 0.45 μ m (VWR, Milan, Italy) e addizionati di un volume di CH₃CN pari al quadruplo del volume del filtrato. In seguito alla precipitazione delle proteine plasmatiche i campioni sono stati centrifugati a 11,800 rpm per 15 minuti utilizzando la centrifuga sopra descritta. Il liquido surnatante è stato prelevato e filtrato con filtri in PTFE da 0.45 μ m (Millipore, Milan, Italy) ed iniettato all'HPLC

utilizzando la metodica sopra descritta. L'area dei picchi ottenuti è stata confrontata con quella ottenuta iniettando soluzioni organiche di sorafenib a concentrazione nota.

E' stata determinata anche la quantità di sorafenib eventualmente rimasta all'interno delle nanoparticelle dopo i rilasci. A tal proposito sono stati preparati due campioni per ogni sistema (uno a 2 ore e l'altro a 24 ore). Il primo campione è stato preparato disperdendo 2 mg di NLC tripalmitina-Captex cariche di farmaco in 1.5 di plasma umano; l'altro è stato preparato disperdendo nel medesimo volume 3.6 mg di NLC tripalmitina-Miglyol. Tali sospensioni sono state poste ad una temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, sotto costante agitazione meccanica. Ai tempi prestabiliti (2 ore e 24 ore) i campioni sono stati prelevati e filtrati sottovuoto. Le NLC, trattenute dal filtro, sono state recuperate tramite solubilizzazione con 36 ml di una miscela di solventi organici costituita da $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (4:4:2 v/v/v). Le soluzioni ottenute sono state sonicate per qualche minuto, filtrate con filtri in PTFE $0.45\mu\text{m}$ (Millipore, Milan, Italy) e analizzate all'HPLC utilizzando la metodica sopra descritta.

5.2.12 Studi di rilascio della curcumina in plasma umano

Il rilascio di curcumina è stato effettuato, per ciascun sistema nanoparticellare, a sei intervalli di tempo prefissati. A tal proposito, sono state preparate sei sospensioni, ottenute disperdendo 5 mg di ogni singolo campione in 2 ml di plasma umano, e incubate a $37\text{ °C} \pm 0.1\text{ °C}$, sotto costante agitazione meccanica. Ad intervalli di tempo prestabiliti, ogni campione è stato centrifugato a 40,000 rpm per 15 minuti a 4 °C . Al precipitato è stato aggiunto THF (10 ml). Dopo filtrazione con $0.2\text{ }\mu\text{m}$ (PTFE membrane) il campione è stato analizzato all'HPLC per valutare la quantità di curcumina contenuta nelle nanoparticelle precipitate. Al surnatante, invece, è stato aggiunto acetonitrile (4 ml) e la sospensione così ottenuta è stata centrifugata nuovamente a 11,800 rpm per 15 minuti a 4 °C . Per determinare la quota di curcumina rilasciata il surnatante ottenuto è stato filtrato con filtri $0.2\text{ }\mu\text{m}$ (PTFE membrane) e analizzato all'HPLC. Anche il secondo precipitato ottenuto è stato trattato con THF, filtrato con filtri $0.2\text{ }\mu\text{m}$ e analizzato all'HPLC per stabilire la quota della curcumina rimasta legata alle proteine plasmatiche.

5.2.13 Preparazione dei complessi SLN-DNA ed elettroforesi

Le SLN cationiche sono state utilizzate in sospensione e diluite opportunamente al fine di ottenere i rapporti in peso SLN:DNA prefissati. I complessi SLN:DNA sono stati preparati incubando insieme a temperatura ambiente 5 μ l di soluzione di plasmide shNupr1 (conc. 5ng/ μ l) con 5 μ l di sospensione di SLN. Dopo 60 minuti di incubazione è stata effettuata l'elettroforesi in gel d'agarosio allo 0.8% utilizzando il TAE come tampone; il DNA è stato visualizzato utilizzando il Gelred come colorante.

5.2.14 Stabilità dei complessi SLN:DNA in presenza di albumina

La stabilità dei complessi SLN:DNA è stata valutata in presenza di siero albumina bovina (BSA), utilizzata come scambiatore elettrostatico polianionico. I complessi SLN:DNA sono stati ottenuti incubando 10 μ l di plasmide shNupr1 (5 ng/ μ l) con 10 μ l di dispersione acquosa di SLN per 1 ora a temperatura ambiente. Sono stati utilizzati diversi rapporti (p/p) SLN:DNA: 50:1, 100:1 e 200:1 per le SLN-Brij-MF; 100:1 e 200:1 per le SLN-Pluronic-MF. I complessi sono stati successivamente incubati con 5 μ l di una soluzione di BSA

(concentrazione finale 40 g/dl) per 2, 7 e 24 ore. Aliquote di 15 μ L sono state caricate su gel di agarosio allo 0.8% contenente Gelred.

5.2.15 Test emolitici

Eritrociti umani isolati da sangue fresco trattato con K_3 -EDTA sono stati ottenuti per centrifugazione a 2,200 rpm per 10 minuti a 4 °C. Il pellet è stato lavato otto volte con DPBS a pH 7.4 tramite centrifugazione e risospeso nello stesso tampone fino ad ottenere una concentrazione finale di eritrociti del 4%.

Successivamente 500 μ l di dispersione di:

- NLC vuote o cariche di sorafenib (conc. 5, 10 e 20 μ M);
- SLN cationiche, vuote o complessate con il DNA ad i rapporti in peso stabiliti

sono stati aggiunti a 500 μ l di sospensione di eritrociti e incubati per 1 ora a $37^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ sotto agitazione magnetica. Dopo la centrifugazione, la quantità di emoglobina è stata determinata tramite analisi spettrofotometrica del surnatante a 540 nm (UV-1800 UV-VIS spectrophotometer Shimadzu). Il controllo negativo (zero emolisi) e positivo (100% emolisi) consistevano di eritrociti trattati rispettivamente con DPBS e soluzione di Triton X-100 1% (v/v). Ogni

esperimento è stato eseguito in triplicato e ripetuto due volte. La percentuale di lisi degli eritrociti è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ Emolisi} = \frac{(\text{Abs}_{\text{campione}} - \text{Abs}_{0\% \text{ lisi}})}{(\text{Abs}_{100\% \text{ lisi}} - \text{Abs}_{0\% \text{ lisi}})} \times 100$$

5.2.16 Procedura utilizzata per effettuare la trasfezione e determinazione di Nupr1

Per la trasfezione, le cellule di epatocarcinoma del tipo Hep3B sono state seminate utilizzando piastre da 12 pozzetti, ad una concentrazione tale da raggiungere, dopo 24 ore, circa il 50-70% di confluenza in RPMI al 10% di siero bovino fetale (FBS) senza antibiotici ed incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in presenza di CO_2 al 5%. Il giorno successivo sono state trasfettate utilizzando i complessi SLN-Brij con i plasmidi (pControl ed shNupr1) al rapporto 100:1 p/p ed i complessi SLN-Pluronic con gli stessi plasmidi al rapporto 240:1 p/p.

Dopo 4 ore sono stati rimossi dai pozzetti il mezzo di coltura e i complessi utilizzati per la trasfezione e sostituiti con terreno completo al 10% di FCS. Dopo 24 ore di incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, in presenza

di CO₂ al 5%, è stata valutata l'espressione di Nupr1, rilevata utilizzando la PCR semi-quantitativa.

5.2.17 Saggio per la determinazione della degradazione da parte della DNasi I

Per valutare la sensibilità dei complessi SLN cationiche (SLN-Pluronic):DNA all'azione della DNasi I, i complessi già formati con un rapporto 240:1 di SLN:DNA (contenenti 2 µg di DNA) e il DNA nudo (2µg) sono stati trattati con 2 unità di DNasi I in un volume totale di 100 µl contenente Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 10mM, DTT 10mM e ATP 1mM.

Dopo averli lasciati ad una temperatura di 37 °C ± 1 °C per 30 minuti, i campioni sono stati estratti con uguali volumi di fenolo e fenolo/cloroformio, e il DNA, nella fase acquosa, è stato poi precipitato aggiungendo sodio acetato ed etanolo.

Il DNA è stato sospeso di nuovo in 20 µl di acqua bidistillata e 10 µl sono stati utilizzati per effettuare l'elettroforesi in gel d'agarosio allo 0.8% in modo da potere esaminare le dimensioni del DNA.

5.2.18 Saggi di vitalità cellulare (saggi MTS)- NLC sorafenib

Per i saggi di vitalità cellulare sono state utilizzate quattro linee cellulari: Hep3B, HepG2, Huh7 e PLC . Le caratteristiche specifiche di ognuna di esse sono riportate in Tabella 11.

Molecular characteristics of the human HCC cell lines used in this study					
Cell Line	Tumor Type	Origin	HBV	Cellular Products	Other Characteristics
HepG2	Human Caucasian hepatocytes carcinoma	Epithelial well-differentiated HCC	---	α -fetoprotein, albumin, α -1-antitrypsin	p53 wt, β -cat wt and β -cat mut, N-ras mut and COX-2 negative
Huh7	Human hepatocarcinoma	Epithelial well-differentiated HCC	---	α -fetoprotein, IL-8	p53 mut, β -cat wt, COX-2 positive, MMP2 neg.
Hep3B	Human Negroid hepatocyte carcinoma	Epithelial well-differentiated HCC	Integrated	α -fetoprotein, HBsAg, albumin, α -1-antitrypsin	Undetected Rb, p53 mut, β -cat wt
PLC/PRF/5	Human liver hepatoma cells	Epithelial well-differentiated HCC	Integrated	HBsAg	Rb wt, p53 mut, Axin mut

Tabella 11. Caratteristiche delle linee cellulari HepG2, Huh7, Hep3B e PLC di epatocarcinoma umano.

Ogni linea cellulare (5×10^3) è stata seminata in piastre da 96 pozzetti (100 μ l) con terreno RPMI contenente una soluzione di antibiotici quali penicillina/streptomicina (100 unità/ml), L-glutammina 2 mM, sodio piruvato 1 mM e siero bovino fetale (FBS) 10% (v/v). Dopo 24 ore il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno di coltura contenente 10 μ l di sospensione acquosa di sorafenib fino ad

una concentrazione finale in ogni singolo pozzetto compreso nel range 2.5-20 μM . Cellule incubate con terreno completo contenente sorafenib solubilizzato in DMSO sono state utilizzate come controllo negli esperimenti in cui il sorafenib veniva utilizzato in forma libera. Le cellule sono state poi incubate per 72 ore. È stata misurata la vitalità cellulare utilizzando il “CellTiter 96 Aqueous OneSolution Cell Proliferation Assay” (Promega Corporation). Successivamente sono stati aggiunti 16 μl /pozzetto di una soluzione contenente il sale giallo di tetrazolio (MTS) e fenazina etosulfonato (PES). Le deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali sono capaci di bio-ridurre l’MTS nel prodotto formazano, di colore porpora e solubile nel mezzo di coltura. La piastra è stata incubata a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in presenza di CO_2 5%, per favorire il metabolismo cellulare. Dopo 2 ore, la quantità di formazano rilasciata è stata rilevata misurando l’assorbanza a 490 nm, che risulta essere proporzionale al numero di cellule vitali presenti nel pozzetto. Per un’accurata esecuzione del saggio, il reagente MTS è stato aggiunto anche a pozzetti della piastra privi di cellule e contenenti solo terreno completo. Il valore di questa lettura viene sottratto a quella dei campioni (trattati e controllo), per limitare il rumore di fondo. Ogni trattamento è eseguito in triplicato.

5.2.19 Saggi di vitalità cellulare con rimozione del mezzo di coltura – NLC-sorafenib

Considerato che il sorafenib viene rilasciato lentamente dalle nanoparticelle, al fine di valutare se le cellule avessero inglobato maggiormente il farmaco veicolato rispetto a quello libero, sono stati condotti dei saggi di vitalità cellulare con rimozione del mezzo di coltura dopo 6 ore in un caso e dopo 24 nell'altro.

In entrambi i casi la rimozione del farmaco libero e di quello veicolato tramite NLC è stata effettuata tramite lavaggio di ciascun pozzetto per due volte con PBS a pH 7.4. È stata calcolata infine la percentuale media di vitalità delle cellule trattate rispetto alle cellule controllo. L'esperimento è stato ripetuto due volte.

5.2.20 Studi di citotossicità (saggi MTS)- complessi SLN-DNA

Per i saggi di vitalità cellulare è stata utilizzata la linea cellulare di epatocarcinoma Hep3B. Le cellule (7.5×10^3) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (100 μ l) con terreno RPMI contenente L-glutammina 2 mM, sodio piruvato 1 mM e siero bovino fetale (FBS) 10% (v/v). Dopo 24 ore il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno di coltura contenente 10 μ l di sospensione acquosa di complesso SLN-

Pluronic:shNupr1 al rapporto 240:1. Le cellule sono state incubate per 4 ore, dopo le quali è stato rimosso il mezzo di coltura ed è stato aggiunto mezzo di coltura fresco. Le cellule sono state incubate per altre 24 ore a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in presenza di CO_2 5%. È stata misurata la vitalità cellulare utilizzando il “CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay” (Promega Corporation) dopo aver aggiunto 16 μl /pozzetto di una soluzione contenente il sale giallo di tetrazolio (MTS) e fenazina etosulfonato (PES) e utilizzando lo stesso procedimento descritto nel paragrafo 5.2.18.

5.2.21 Studi di citotossicità (saggi MTS) – SLN curcumina

Per i saggi di vitalità cellulare sono state utilizzate le linee cellulari di carcinoma ovarico A2780S e A2780CP. Le cellule (5.0×10^3) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (100 μl) con terreno RPMI contenente L-glutammina 2 mM, sodio piruvato 1 mM e siero bovino fetale (FBS) 10% (v/v). Dopo 24 ore il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno di coltura contenente diverse concentrazioni di curcumina (libera o veicolata dalle SLN-Compritol), o SLN vuote. Le cellule sono state incubate per 4 ore, dopo le quali è stato rimosso il mezzo di coltura ed è stato aggiunto mezzo di coltura fresco. Le cellule

sono state incubate per altre 72 ore a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in presenza di CO_2 5%. È stata misurata la vitalità cellulare utilizzando il “CellTiter 96 Aqueous OneSolution Cell Proliferation Assay” (Promega Corporation), dopo aver aggiunto 16 μl /pozzetto di una soluzione contenente il sale giallo di tetrazolio (MTS) e fenazina etosulfonato (PES) e utilizzando lo stesso procedimento descritto nel paragrafo 5.2.18.

5.2.22 Saggio clonogenico – NLC-sorafenib

La capacità del Sorafenib, nella forma libera o veicolata tramite NLC, di inibire la crescita cellulare è stata studiata anche mediante saggio clonogenico. Eventuali riduzioni nel numero delle colonie di cellule possono derivare sia dal blocco della proliferazione che dall'induzione della morte cellulare.

Cellule di carcinoma epatocellulare umano del tipo HepG2 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (200 cellule/pozzetto) con terreno RPMI completo. Successivamente le cellule sono state trattate con dosi crescenti di sorafenib (0-20 μM) in forma libera, veicolata tramite NLC e anche con NLC vuote utilizzando concentrazioni equivalenti a quelle

cariche di farmaco. Le stesse cellule trattate con dimetilsolfossido (DMSO) sono state utilizzate come controllo.

Dopo 6 ore le cellule sono state lavate con mezzo di coltura (RPMI) e cresciute per 14 giorni. Successivamente le colonie sono state fissate con etanolo al 70 % a freddo (10 minuti a -20°C), colorate con violetto di genziana 0.1 % in acqua per 5 minuti e contate al microscopio ottico dopo ripetuti lavaggi per allontanare il colorante in eccesso. Variazioni nel numero di colonie tra i campioni trattati con sorafenib libero, veicolato dalle NLC e nanoparticelle vuote sono state espresse in percentuale rispetto al controllo (DMSO).

Il saggio è stato condotto in duplicato ed eseguito due volte.

5.2.23 Saggio clonogenico – SLN-curcumina

Lo stesso saggio è stato effettuato per valutare la capacità della curcumina, nella forma libera o veicolata tramite SLN, di inibire la crescita cellulare.

Cellule di carcinoma ovarico del tipo A2780S e A2780CP sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (200 cellule/pozzetto) con terreno RPMI completo. Successivamente le cellule sono state trattate con dosi crescenti di curcumina (1.25-5 μ M) in forma libera, veicolata tramite

SLN e anche con SLN vuote utilizzando concentrazioni equivalenti a quelle cariche di farmaco. Le stesse cellule trattate con DMSO sono state utilizzate come controllo.

Dopo 6 ore le cellule sono state lavate con mezzo di coltura (RPMI) e cresciute per 7 giorni. Successivamente le colonie sono state fissate con etanolo al 70 % a freddo (10 minuti a -20°C), colorate con violetto di genziana 0.1 % in acqua per 5 minuti e contate al microscopio ottico dopo ripetuti lavaggi per allontanare il colorante in eccesso. Variazioni nel numero di colonie tra i campioni trattati con curcumina libera, veicolata dalle SLN e nanoparticelle vuote sono state espresse in percentuale rispetto al controllo (DMSO).

Il saggio è stato condotto in duplicato ed eseguito due volte.

5.2.24 Microscopia a fluorescenza

5×10^3 cellule A2780S e A2780CP sono state distribuite in ciascun pozzetto di vetrini chamber slides (Nunc, Milano, Italia). Dopo 24 ore le cellule sono state trattate con 100 μ l di DMSO (controllo), curcumina (30 μ M) libera o veicolata dalle SLN, ed SLN vuote per 24 ore. Il mezzo di coltura è stato rimosso dai pozzetti e le cellule sono state lavate per tre volte con PBS. Successivamente, le cellule sono state

fissate con una soluzione di paraformaldeide al 3% in PBS per 20 minuti, e lavate tre volte con PBS. I vetrini sono stati coperti con coprioggetto e le cellule sono state osservate con microscopio a fluorescenza Axio Scope 2 Microscope (Zeiss, Genova, Italia).

5.2.25 Saggio di colorazione con Hoechst 33258

2×10^4 cellule A2780S e A2780CP sono state distribuite in ciascun pozzetto di vetrini chamber slides (Nunc, Milano, Italy). Dopo 24 ore le cellule sono state trattate con curcumina ($30 \mu\text{M}$) libera o veicolata dalle SLN, ed SLN vuote per 24 ore. Il mezzo di coltura è stato rimosso dai pozzetti e le cellule sono state lavate per due volte con PBS. Successivamente, le cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide al 3% in PBS per 20 minuti. Al passaggio successivo sono stati effettuati 3 lavaggi in Triton X-100 (v/v in PBS), quindi, le cellule sono state nuovamente lavate per tre volte con PBS e dopo tali lavaggi sono state incubate per 30 minuti a 37°C con una soluzione di Hoechst 33258 alla concentrazione di $2.5 \mu\text{g/ml}$ in PBS. Infine, dopo altri due lavaggi in PBS i vetrini sono stati montati con glicerolo:PBS (1:1) e osservati con un microscopio a fluorescenza.

5.2.26 Western blot

I lisati cellulari delle cellule A2780S e A2780CP sono stati ottenuti utilizzando il Ripa Buffer (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA). Le cellule sono state lisate in ghiaccio per 20 minuti. Il lisato è stato successivamente centrifugato a 10,000 rpm per 20 minuti a 4°C. Il supernatante è stato utilizzato per la determinazione delle proteine usando il kit “Protein Assay” della Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Srl, Milano, Italy) ed usando come proteina standard la siero albumina bovina (BSA). Dopo la quantizzazione, uguali quantità di estratti proteici sono stati denaturati per 5 minuti a 100°C e separati su un gel di SDS-poliacrilammide al 10% in condizioni denaturanti. Le proteine sono state successivamente trasferite su membrana di nitrocellulosa (LI-COR Biosciences) utilizzando un sistema trans-blot (Bio-Rad Laboratories Srl, Milano, Italia). Dopo il trasferimento le membrane sono state bloccate con una soluzione di Blocking Buffer (Licor Odissey) 1:1 con TBS (tris-saline buffer) overnight. Il giorno successivo le membrane sono state incubate con i vari anticorpi primari diluiti in una soluzione di blocking buffer 1:1 con TBST (TBS 0.2% Tween 20) per 1 ora a T ambiente. L’anticorpo anti- β -actina è stato diluito 1:25000 mentre tutti gli altri sono stati diluiti 1:1000.

Successivamente, sono stati effettuati tre lavaggi in TBST 0.1% per 10 minuti a T ambiente in agitazione. Infine, le membrane sono state incubate con gli anticorpi secondari per 1 ora a T ambiente. Dopo l'incubazione, sono stati effettuati tre lavaggi in TBST 0.1% per 10 minuti in agitazione e le membrane sono state sviluppate con il sistema di rilevazione a infrarossi Odyssey.

6. BIBLIOGRAFIA

- AIRC, 2014, <http://www.airc.it/tumori/tumore-all-ovaio.asp>.
- Amer M.H.. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Molecular and Cellular Therapies*, 2014, 2:27-45.
- Bataller R., Brenner DA.. Liver Fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115: 209-218.
- Beloqui A., Solinìs M.A., Rodríguez-Gascòn A., Almeida A.J., Preat V.. Nanostructured Lipid Carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015, in press, doi: 10.1016/j.nano.2015.09.004.
- Bondì M.L., Craparo E.F., Picone P., Di Carlo M., Di Gesù R., Capuano G., Giammona G.. Curcumin entrapped into lipid nanosystems inhibits neuroblastoma cancer cell growth and activates Hsp70 Protein. *Current Nanoscience*, 2010, 6: 439-445.

- Brigger I., Dubernet C., Couvreur P.. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54: 631–651.

- Çağdaş M., Sezer A.D., Bucak S.. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery in Nanotechnology and Nanomaterials, "Application of Nanotechnology in Drug Delivery", book edited by Ali Demir Sezer, 2014, ISBN 978-953-51-1628-8.

- Cano C., Hamidi T., Sandi M.J., Iovanna J.. Role of the Stress Protein P8 in Tumor Progression and Development of Metastasis. *Pathologie Biologie*, 2011, 59: 303–308.

- Carrillo C., Sánchez-Hernández N., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé-Negre J.M., Ticó J.R., Suñé C., Miñarro M.. DNA Delivery via Cationic Solid Lipid Nanoparticles (SLNs). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 49: 157–165.

- Catalanotti F., Reyes G., Jesenberger V., Galabova-Kovacs G., De Matos Simoes R., Carugo O., Baccarini M.. A Mek1-Mek2

Heterodimer Determines the Strength and Duration of the Erk Signal. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2009, 16: 294-303.

- Cervello M., Giannitrapani L., Emma M.R., Augello G., Cusimano A., Balasus D., Azzolina A., Soresi M., Montalto G.. Emerging Use of Nanotechnology for the Treatment of Liver Diseases in Bondi M.L., Botto C., Amore E. eds., *Frontiers in Nanomedicine*, 2015, pp.47-83.
- Cortesi R., Campioni M., Ravani L., Drechsler M., Pinotti M., Esposito E.. Cationic Lipid Nanosystems as Carriers for Nucleic Acids. *New Biotechnology*, 2014, 31: 44-54.
- Cross D., Burmester J.K.. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research*, 2006, 4: 218-227.

- Das S., Chaudhury A.. Recent Advances in: Lipid Nanoparticles Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 2011.
- De Jesus M.B., Zuhorn I.S.. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms. *Journal of Controlled Release*, 2015, 201: 1–13.
- Del Pozo-Rodríguez A., Delgado D., Solinís M.A., Pedraz J.L., Echevarría E., Rodríguez J.M., Gascón A.R.. Solid Lipid Nanoparticles as Potential Tools for Gene Therapy: In Vivo Protein Expression after Intravenous Administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 385: 157–162.
- Doktorovova S., Shegokar R., Rakovsky E., Gonzalez-Mira E., Lopes C.M., Silva A.M., Martins-Lopes P., Muller R.H., Souto E.B.. Cationic solid lipid nanoparticles (cSLN): Structure, stability and DNA binding capacity correlation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 420:341– 349.

- Fàbregas A., Sánchez-Hernández N., Ticó J.R., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé-Negre J.M., Hernández-Munain C., Suñé C., Miñarro M.. A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 473:270–279.

- Farazi P.A. e DePinho R.A.. Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: from Genes to Environment. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 674-687.

- Garner R.C., Miller E.C., Miller J.A.. Liver Microsomal Metabolism of Aflatoxin B, to a Reactive Derivative Toxic to Salmonella Typhimurium TA 15301. *Cancer Research*, 1972, 32: 2058-2066.

- Gorodnova T.V., Sokolenko A.P., Ivantsov A.O., Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Aleksakhina S.N., Yanus G.A., Togo A.V., Maximov S.Y., Imyanitov E.N.. High Response Rates to Neoadjuvant Platinum-based Therapy in Ovarian Cancer Patients

Carrying Germ-line BRCA Mutation. *Cancer Letters*, 2015, 369: 363–367

- Holvoet T., Raevens S., Vandewynckel Y.P., Van Biesen W., Geboes K., Hans Van Vlierberghe H.. Systematic review of guidelines for management of intermediate hepatocellular carcinoma using the Appraisal of Guidelines Research and Evaluation II instrument. *Digestive and Liver Disease*, 2015, 47: 877–883.
- Hull L.C, Farrell D., Grodzinski P.. Highlights of recent developments and trends in cancer nanotechnology research—View from NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer. *Biotechnology Advances*, 2014, 32:666–678.
- IARC, Hepatitis Viruses. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 1994, 59.

- Huynh H.. Molecularly Targeted Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80: 550-560.

- Jawahar N., Meyyanathan S.N., Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 2012, 1:217-223.

- Jelovac D., Armstrong D.K.. Recent Progress in the Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61:183-203.

- Jiang Z., Sun C., Yin Z., Zhou F., Ge L., Liu X., Kong F.. Comparison of Two Kinds of Nanomedicine for Targeted Gene Therapy: Premodified or Postmodified Gene Delivery Systems. *International Journal Nanomed*, 2012, 7: 2019–2031.

- Joshi M.D., Muller R.H.. Lipid Nanoparticles for Parenteral Delivery of Actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 71: 161-172.

- Jun H., Shi-Wen Z.. New Research on Development of Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Medical College of PLA*, 2007, 22: 385-390.

- Karp G. *Biologia Cellulare e Molecolare*. II edizione EDISES, 2003, 15: 698-702.

- Kim P.S., Djazayeri S., Zeineldin R.. Novel nanotechnology approaches to diagnosis and therapy of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 2011, 120: 393–403.

- Knudsen K.B., Northeved H., Pramod Kumar P., Permin A., Gjetting T., Andresen T.L., Steen Larsen S., Wegener K.W., Lykkesfeldt J., Jantzen K., Loft S., Møller P., Roursgaard M.. In Vivo Toxicity of Cationic Micelles and Liposomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2015, 11: 467–477.

- Lakshmi P., Kumar G.A.. Nanosuspension Technology: A Review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2010, 2: 35–40.

- Leung M. H. M., Kee T. W.. Effective Stabilization of Curcumin by Association to Plasma Proteins: Human Serum Albumin and Fibrinogen. *Langmuir*, 2009, 25: 5773-5777.
- Liu L., Cao Y., Chen C., Zhang X., McNabola A., Wilkie D., Wilhelm S., Lynch M., Carter C.. Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, 2006, 66: 11851-11858.
- Mehnert W., Mader K.. Solid Lipid Nanoparticles. Production, Characterization and Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 47: 165-196.
- Mitri K., Shegokar R., Gohla S., Anselmi C., Müller R.H.. Lipid Nanocarriers for Dermal Delivery of Lutein: Preparation, Characterization, Stability and Performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 414: 267–275.

- Momoda T.S., Schwindt A.R., Feist G.W., Gerwick L., Bayne C.J., Schreck C.B.. Gene Expression in the Liver of Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*, During the Stress Response. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, 2: 303–315.

- Muller R.H., Keck C.M.. Challenges and Solutions for the Delivery of Biotech Drugs – a Review of Drug Nanocrystal Technology and Lipid Nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 2004, 113: 151-170.

- Muller R.H., Mader K., Gohla S.. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery – a Review of the State of the Art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50: 161-177.

- Muller R.H., Radtke M., Wissing S.A.. Nanostructured Lipid Matrices for Improved Microencapsulation of Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242: 121-128.

- Ou D.L., Shen Y.C., Chen K.F., Yeh P.Y., Fan H.H., Feng W.C., Wang C.T., Lin L.I., Hsu C., Cheng A.L.. Induction of DNA

Damage-inducible Gene GADD45beta Contributes to Sorafenib-induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 2010, 70 (22): 9309-9318.

- Poma P., Notarbartolo M., Labbozzatta M., Sanguedolce R., Alaimo A., Carina V., Maurici A., Cusimano A., Cervello M., D'Alessandro N.. Antitumoral Effects of the Novel NF-kb inhibitor Dehydroxymethylepoxyquinomicin on Human Hepatic Cancer Cells: Analysis of Synergy with Cisplatin and of Possible Correlation with Inhibition of Pro-survival Genes and IL-6 Production. *International Journal of Oncology*, 2006, 28: 923-930.
- Ramalingam P., Ko Y.T.. A validated LC-MS/MS method for quantitative analysis of curcumin in mouse plasma and brain tissue and its application in pharmacokinetic and brain distribution studies. *Journal of Chromatography B*, 2014, 969: 101–108.
- Raza A., Sood G.K.. Hepatocellular Carcinoma Review: Current Treatment, and Evidence-based Medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(15): 4115-4127.

- Reimer L., Kohl H., editors. Transmission Electron Microscopy. *Physics of Image Formation*. Springer, 2008.

- Semela D., Dufour, J.-F. Angiogenesis and Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, 2004, 41: 864-880.

- Severino P., Szymanski M., Favaro M., Azzoni A.R., Chaud M.V., Santana M.H.A., Silva A.M., Souto E.B.. Development and Characterization of a Cationic Lipid Nanocarrier as Non-viral Vector for Gene Therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 66: 78–82.

- Schmidt C.M., McKillop I.H., Cahill P.A., Sitzmann J.V.. Increased MAPK Expression and Activity in Primary Human Hepatocellular Carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 236: 54-58.

- Su H., Mo Koo J., Cui H.. One-Component Nanomedicine. *Journal of Controlled Release*, 2015, in press, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.056.

- Sun N., Liu Z., Huang W., Tian A., Hu S.. The Research of Nanoparticles as Gene Vector for Tumor Gene Therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2014, 89: 352–357.

- Tabatt K., Sameti M., Olbrich C., Muller R.H., Lehr C.M. Effect of Cationic Lipid and Matrix Lipid Composition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, 57:155–162.

- Tamjidi F., Shahedi M., Varshosaz J., Nasirpour A.. Nanostructured lipid carriers (NLC): A Potential Delivery System for Bioactive Food Molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013, 19: 29–43.

- Thakor A.S., Gambhir S.S.. Nanooncology: the Future of Cancer Diagnosis and Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2013, 63:395–418.

- Villarroel M.C., Pratz K.W., Wright J.J., Smith B.D., Rudek M.A.. Plasma protein binding of sorafenib, a multi kinase inhibitor: in vitro

- and in cancer patients. *Investigational New Drugs*, 2012, 30: 2096-2102.
- Vincent A.J., Ren S., Harris L.G., Devine D.J., Samant R.S., Fodstad O., Shevde L.A.. Cytoplasmic Translocation of p21 Mediates NUPR1-Induced Chemoresistance NUPR1 and p21 in Chemoresistance. *FEBS Letters*, 2012, 586: 3429–3434.
 - Vitale S.G., Marilli I., Lodato M., Tropea A., Cianci A.. The Role of Cyto-reductive Surgery in Advanced-stage Ovarian Cancer: a Systematic Review. *Updates Surgery*, 2013, 65:265–270.
 - Wahl H., Tan L., Griffith K., Choi M., Liu J.R.. Curcumin Enhances Apo2L/TRAIL-induced Apoptosis in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Gynecologic Oncology*, 2007, 105: 104-112.
 - Weis S., Bielow T., Sommerer I., Iovanna J., Malicet C., Mössner J., Hoffmeister A.. P8 Deficiency Increases Cellular ROS and Induces HO-1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 565: 89–94.

- Westesen K., Bunjes H., Koch M.H.J.. Physicochemical Characterization of Lipid Nanoparticles and Evaluation of their Drug Loading Capacity and Sustained Release Potential. *Journal of Controlled Release*, 1997, 48: 223-236.
- Wilhelm S.M., Chien D.S.. BAY 43-9006. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8: 2255-2257.
- Wissing S.A., Kayser O., Muller R.H.. Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56: 1257-1272.
- Wong H.L., Bendayan R., Rauth A.M., Li Y., Wu X.Y.. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59:491–504.
- Worns M., Galle P.R.. Future Perspectives in Hepatocellular Carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 2010, 42S: S302-S309.

- Wu J., Sheng H., Saxena R., Skill N.J., Bhat-nakshatri P., Yu M., Nakshatri H., Maluccio M.A.. NF-kb Inhibition in Human Hepatocellular Carcinoma and its Potential as Adjunct to Sorafenib Based Therapy. *Cancer letters*, 2009, 2: 476-483.
- Yamaguchi R., Yano H., Nakashima Y., Ogasawara S., Higaki K., Akiba J., Hicklin D.J., Kojiro M.. Expression and Localization of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Human Hepatocellular Carcinoma and non-HCC Tissues. *Oncology Reports*, 2000, 7 :725-729.
- Zang Z., Zhou X., Shen H., Wang D., Wang Y.. Phosphorylated ERK Is a Potential Predictor of Sensitivity to Sorafenib when Treating Hepatocellular Carcinoma: Evidence from an in vitro Study. *BMC Medicine*, 2009, doi:10.1186/1741-7015-7-41.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Nanoparticelle lipidiche solide.....	5
1.2 Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC).....	7
1.3 Tecniche di preparazione.....	10
1.3.1 Omogeneizzazione ad alta pressione (a caldo e a freddo).....	11
1.3.2 Microemulsione.....	12
1.3.3 Emulsificazione-evaporazione del solvente.....	13
1.3.4 Precipitazione-diffusione del solvente.....	13
1.4 Caratterizzazione chimico-fisica.....	14
1.4.1 Dimensione e indice di polidispersità (PDI).....	15
1.4.2 Potenziale zeta.....	16
1.4.3 Morfologia.....	17
1.4.4 Grado di cristallinità e modifiche nella struttura cristallina del lipide.....	19
1.5 Caratterizzazione tecnologico-farmaceutica.....	22
1.5.1 Drug loading.....	22
1.5.2 Cinetiche di rilascio.....	23
1.6 Nanoparticelle nella terapia del cancro.....	25
1.6.1 Chemioterapia.....	25
1.6.2 Nanoparticelle in terapia genica.....	30
1.7 Vie di somministrazione delle nanoparticelle nella terapia del cancro.....	37
1.7.1 Somministrazione sistemica.....	37
1.7.2 Somministrazione locale.....	38
2. SCOPO DELLA TESI.....	40
2.1 Il carcinoma epatocellulare (HCC).....	40
2.2 Il carcinoma ovarico.....	44
2.3 Sorafenib: meccanismo d'azione.....	50

2.4 Ruolo della Nuclear Protein 1 (Nupr1) nel cancro.....	58
2.5 Curcumina: meccanismo d'azione.....	60
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	64
3.1 Nanoparticelle lipidiche contenenti sorafenib.....	64
3.1.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta.....	66
3.1.2 Studi di stabilità.....	67
3.1.3 Analisi SEM.....	70
3.1.4 Loading capacity (LC%) ed efficienza di intrappolamento (EE%)....	72
3.1.5 Studi di stabilità del Sorafenib in plasma umano.....	73
3.1.6 Studi di rilascio del Sorafenib in plasma umano.....	74
3.1.7 Test emolitici.....	77
3.1.8 Studi di vitalità cellulare.....	79
3.1.9 Saggio clonogenico.....	84
3.2 Nanoparticelle lipidiche per la veicolazione del plasmide shNupr1.....	86
3.2.1 SLN cationiche preparate mediante omogeneizzazione con UltraTurrax.....	87
3.2.1.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta.....	87
3.2.1.2. Capacità delle SLN cationiche di complessare il plasmide shNupr1.....	88
3.2.1.3 Studi di vitalità cellulare.....	92
3.2.1.4 Valutazione dell'efficienza di trasfezione.....	93
3.2.1.5 Saggio della degradazione ad opera della DNasi I.....	95
3.2.2 SLN cationiche preparate mediante omogeneizzazione con Microfluidizer LM-10.....	97
3.2.2.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta.....	97
3.2.2.2 Capacità delle SLN cationiche di complessare il plasmide shNupr1.....	98
3.2.2.3 Analisi dimensionale dei complessi SLN:shNupr1.....	101
3.2.2.4 Stabilità dei complessi SLN:shNupr1 in presenza di albumina.....	104
3.2.2.5 Test emolitici.....	106
3.2.2.6 Studi di vitalità cellulare.....	107
3.3 Nanoparticelle lipidiche contenenti curcumina.....	110
3.3.1 Analisi delle dimensioni e potenziale zeta.....	111
3.3.2 Loading capacity (LC%).....	113

3.3.3 Cinetiche di rilascio in plasma umano.....	113
3.3.4 Studi di vitalità cellulare.....	115
3.3.5 Studio del meccanismo molecolare della curcumina libera e veicolata da SLN.....	118
3.3.6 Uptake cellulare.....	119
3.3.7 Effetti della curcumina libera e veicolata da SLN sull'apoptosi cellulare.....	121
3.3.8 Saggio clonogenico.....	122
4. CONCLUSIONI.....	124
5. MATERIALI E METODI.....	130
5.1 Materiali.....	130
5.2 Metodi.....	132
5.2.1 Preparazione dei carrier lipidici nanostrutturati contenenti sorafenib.....	131
5.2.2 Preparazione delle nanoparticelle lipidiche cationiche.....	132
5.2.3 Preparazione delle nanoparticelle lipidiche contenenti curcumina.....	133
5.2.4 Determinazione delle dimensioni delle nanoparticelle.....	134
5.2.5 Misure di potenziale zeta.....	135
5.2.6 Analisi SEM.....	135
5.2.7 Analisi cromatografica del Sorafenib.....	136
5.2.8 Analisi cromatografica della curcumina.....	137
5.2.9 Determinazione della loading capacity (sorafenib e curcumina).....	138
5.2.10 Studi di stabilità del sorafenib in plasma umano.....	139
5.2.11 Studi di rilascio del sorafenib in plasma umano.....	140
5.2.12 Studi di rilascio della curcumina in plasma umano.....	142
5.2.13 Preparazione dei complessi SLN-DNA ed elettroforesi.....	143
5.2.14 Stabilità dei complessi SLN:DNA in presenza di albumina.....	143
5.2.15 Test emolitici.....	144
5.2.16 Procedura utilizzata per effettuare la trasfezione e determinazione di Nupr1.....	145
5.2.17 Saggio per la determinazione della degradazione da parte della DNasi I.....	146
5.2.18 Saggi di vitalità cellulare (saggi MTS)- NLC sorafenib.....	147
5.2.19 Saggi di vitalità cellulare con rimozione del mezzo di coltura – NLC-sorafenib.....	149

5.2.20 Studi di citotossicità (saggi MTS)- complessi SLN-DNA.....	149
5.2.21 Studi di citotossicità (saggi MTS) – SLN curcumina.....	150
5.2.22 Saggio clonogenico – NLC-sorafenib.....	151
5.2.23 Saggio clonogenico – SLN-curcumina.....	152
5.2.24 Microscopia a fluorescenza.....	153
5.2.25 Saggio di colorazione con Hoechst 33258.....	154
5.2.26 Western blot.....	155
6. BIBLIOGRAFIA.....	157

Ringrazio il gruppo di lavoro del Dott. Melchiorre Cervello, in particolare la dott.ssa Maria Rita Emma e la dott.ssa Giuseppina Augello dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare (IBIM) "A. Monroy" del CNR di Palermo per aver supportato il lavoro di tesi con gli studi biologici.