

Università degli Studi di Pavia  
Dipartimento di Scienze del Farmaco

Dottorato di Ricerca in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche  
XXVII ciclo

**Sviluppo di sistemi terapeutici nanoparticellari a base di nuovi derivati  
dell'acido polilattico finalizzati al trattamento di patologie ossee**

**Dottoranda: Barbara Colzani**

**Tutore: prof.ssa Ida Genta**



<b>INDICE</b>	Pag.	1
<b>PREMESSA</b>		7
<b>INTRODUZIONE</b>		13
1. <u>Il poli-lattide (PLA): proprietà e limiti</u>		13
2. <u>I sistemi nanoparticellari applicati al <i>drug delivery</i></u>		21
2.1 Biodistribuzione: il concetto di <i>targeting</i> passivo e di <i>targeting</i> attivo		27
3. <u>Funzionalizzazione del poli-lattide e impiego in ambito farmaceutico</u>		38
3.1 Derivati del poli-lattide e loro impiego nella realizzazione di <i>drug delivery systems</i>		38
3.1.1 PCNL: derivato del poli-lattide ottenuto da fonti rinnovabili		40
3.2 Funzionalizzazione del poli-lattide con piccoli peptidi per ottenere <i>smart nanoparticles</i>		44
3.2.1 Nanoparticelle selettivamente vettorizzate a base di PLA		44
3.2.2 GE11 e EGFR targeting		46
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>		63
<b>MATERIALI</b>		69
<b>PARTE A – Nanoparticelle a base di derivati da fonti rinnovabili del poli-lattide</b>		79
<b>1. Metodi</b>		
<u>1.1 Test di citotossicità del polimero PCNL</u>		81
1.1.1 Effetto della sterilizzazione ai raggi gamma sulla citocompatibilità di film a base di PCNL		83
<u>1.2 Preparazione dei sistemi nanoparticellari</u>		84
1.2.1 Preparazione delle nanoparticelle di PLA mediante la tecnica della nanoprecipitazione		85
1.2.2 Preparazione delle nanoparticelle di PLA mediante la tecnica dell'emulsione semplice		87
1.2.3 Preparazione delle nanoparticelle con PCNL		89

<u>1.3 Valutazione del diametro delle nanoparticelle mediante <i>dynamic light scattering</i></u>	89
<b>2. Risultati</b>	
<u>2.1. Citocompatibilità del polimero PCNL</u>	91
<u>2.2 Realizzazione dei sistemi nanoparticellari</u>	93
2.2.1 Ottimizzazione del protocollo di preparazione delle nanoparticelle con il polimero PLA	93
2.2.2 Nanoparticelle a base del polimero PCNL	98
<b>PARTE B - <i>Smart nanoparticles</i></b>	101
<b>1. Metodi</b>	
<u>1.1 Sintesi del peptide GE11</u>	103
1.1.1 Sintesi del peptide GE11 fluorescente	109
<u>1.2 Realizzazione del coniugato GE11-PLGA</u>	111
<u>1.3 Caratterizzazione del peptide GE11 e del coniugato GE11-PLGA</u>	115
1.3.1 Determinazione della purezza e dell'identità del peptide	115
1.3.2 Determinazione del grado di funzionalizzazione del polimero con il peptide GE11	116
1.4.3 Caratterizzazione del comportamento termico del polimero GE11-PLGA	118
<u>1.4 Realizzazione delle nanoparticelle polimeriche</u>	119
1.4.1 Nanoparticelle con il polimero PEGilato (PLGA-PEG)	121
1.4.2 Nanoparticelle con il polimero non -PEGilato (PLGA)	123
1.4.3 Nanoparticelle funzionalizzate con il peptide modello	124
1.4.4 Nanoparticelle a base del coniugato GE11-PLGA	128
1.4.5 Nanoparticelle caricate con un farmaco modello	130
1.4.6 Nanoparticelle fluorescenti	131
<u>1.5 Caratterizzazione delle nanoparticelle</u>	133
1.5.1 Analisi dimensionale e potenziale zeta	133
1.5.2 Determinazione della resa di processo	134

1.5.3	Analisi morfologica mediante microscopio elettronico a trasmissione (TEM)	135
1.5.4	Caratterizzazione del comportamento termico delle nanoparticelle polimeriche	136
1.5.5	Test di stabilità <i>in vitro</i> a lungo termine dei sistemi nanoparticellari allestisti	136
1.5.6	Stabilità delle nanoparticelle nei fluidi biologici	137
1.5.7	Citotossicità delle nanoparticelle a base di GE11	142
1.5.8	<i>Uptake</i> cellulare	144
1.5.9	Caratterizzazione dei lotti caricati con il farmaco modello (DXM): determinazione del contenuto di farmaco	146
1.5.10	Test di rilascio <i>in vitro</i> del DXM dalle nanoparticelle	148
<b>2.</b>	<b>Risultati</b>	
2.1	<u>GE11: resa di processo, purezza e identità del peptide</u>	150
2.2	<u>GE11-PLGA: determinazione del grado di funzionalizzazione e comportamento termico</u>	151
2.2.1	Determinazione del grado di funzionalizzazione del polimero	151
2.2.2	Comportamento termico del coniugato GE11-PLGA	153
2.3	<u>Realizzazione delle nanoparticelle polimeriche</u>	157
2.3.1	Realizzazione di nanoparticelle di PEG-PLGA e ottimizzazione del protocollo di preparazione	157
2.3.2	Realizzazione delle nanoparticelle di PLGA	163
2.3.3	Realizzazione di nanoparticelle modello utilizzando il peptide FQPV	166
2.3.4	Realizzazione di <i>smart nanoparticles</i> a base del coniugato GE11-PLGA	174
2.4	<u>Caratterizzazione delle nanoparticelle polimeriche</u>	176
2.4.1	Caratterizzazione morfologica mediante microscopio elettronico a trasmissione	176
2.4.2	Caratterizzazione del comportamento termico delle nanoparticelle	178

2.4.3 Stabilità <i>in vitro</i> delle nanoparticelle	180
2.4.4 Stabilità delle nanoparticelle nei fluidi biologici	184
2.4.5 Test di citotossicità	199
2.4.6 Test di <i>uptake</i> cellulare	202
2.4.7 Nanoparticelle caricate con il principio attivo modello (DXM)	209
2.4.8 Rilascio <i>in vitro</i> dell'attivo incapsulato	212
<b>CONCLUSIONI</b>	219
<b>ANNEX I</b>	227
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	231

**Premessa**



## PREMESSA

Nell'ambito del *drug delivery*, il poli-lattide rappresenta uno dei principali polimeri utilizzati, grazie alla sua citocompatibilità e alla scarsa tossicità. Esso presenta però alcune limitazioni che sono correlate alla sua idrofobicità e alla elevata cristallinità. La possibilità di modificare chimicamente la matrice polimerica a base di poli-lattide permette di realizzare vettori nano- o microparticellari capaci di regolare il rilascio dell'attivo incapsulato, in base anche alle caratteristiche dell'attivo stesso. In particolare, modulando l'idro-lipofilia del sistema polimerico è possibile rendere più o meno veloce la cessione dell'attivo. Un altro aspetto fondamentale è il comportamento termico dei polimeri: catene polimeriche allo stato vetroso risultano essere più ordinate e compatte rispetto al polimero allo stato gommoso, tanto da ritardare e prolungare maggiormente la cessione dell'attivo in modo *sito* e tempo specifica. Il ritardo eccessivo del rilascio del farmaco non sempre corrisponde alle esigenze delle terapie.

Gli sforzi indirizzati verso la modificazione della natura chimica del polimero vanno in parallelo con la necessità di sviluppare i sistemi per il rilascio di molecole attive (*drug delivery systems*). Come è noto, l'incapsulazione di un farmaco all'interno di un sistema polimerico, sia esso nano- o microparticellare, ha l'obiettivo di aumentarne l'efficacia e ridurre gli effetti collaterali. Infatti, i sistemi terapeutici così realizzati hanno la capacità di rilasciare il farmaco solo in un determinato bersaglio, spinti ad esempio da variazioni di pH o dalla presenza di particolari recettori. Il

risultato è quello di una riduzione significativa degli effetti collaterali della molecola stessa, grazie alla possibilità di raggiungere solo il bersaglio specifico; da qui, ne risulta una riduzione delle dosi da somministrare al paziente. Infatti, il fine ultimo è sempre quello di migliorare la *compliance* del paziente.

I sistemi nanoparticellari (o nanoparticelle, NP) rientrano in questo ampio panorama e rappresentano una valida strategia formulativa adatta alla manipolazione di molecole poco solubili e molto tossiche. Rispetto alle microparticelle, i sistemi nanoparticellari vengono captati all'interno delle cellule, grazie alle loro dimensioni su scala nanometrica, favorendo così il rilascio della molecola veicolata a livello intra-cellulare. Quando si parla di una somministrazione sistemica delle nanoparticelle, ad esempio per via endovenosa, la distribuzione delle stesse nei tessuti corporei dipende dalla diffusione attraverso l'endotelio dei vasi. In base alle fenestrate presenti a livello dei vasi nei diversi distretti corporei, le nanoparticelle possono concentrarsi in maniera selettiva in un determinato tessuto. Ad esempio, la loro localizzazione a livello del fegato è dovuta all'endotelio particolarmente lasso che caratterizza i vasi vicino agli epatociti; mentre andranno a concentrarsi nei reni le nanoparticelle di dimensioni più piccole. Infatti, la distribuzione *in vivo* dei sistemi nanoparticellari è principalmente dettata dalle loro dimensioni. Questa teoria alla base della distribuzione *in vivo* delle nanoparticelle prende il nome di *targeting passivo*.

Quando i farmaci somministrati sono caratterizzati da un basso indice terapeutico, il *targeting passivo* spesso non è sufficiente a garantire una buona efficacia e a ridurre in maniera significativa gli effetti collaterali. In

questi casi è necessario progettare il sistema nanoparticellare in modo che riconosca in maniera specifica un bersaglio a livello del tessuto da trattare. In questo caso si parla di *targeting attivo* e si realizza andando a modificare chimicamente la matrice polimerica con un agente che riconosce selettivamente alcuni recettori/ proteine a livello del bersaglio. La presenza di un *agente di targeting attivo* non solo è vantaggiosa per una somministrazione sistemica ma anche per una somministrazione locale, poiché aumenta il tempo di permanenza delle nanoparticelle a livello del bersaglio, prolungandone l'effetto nel tempo.

In questa tesi verranno presi in considerazione diversi derivati del polilattide.

In primo luogo verrà indagata l'applicabilità di un nuovo derivato del polilattide, il poli-(1,5-ciclooctadiene-co-5-norbornene-2-metanolo-graft-DL-lattide) (PCNL), ottenuto da fonti rinnovabili, nella realizzazione di sistemi nanoparticellari adatti alla somministrazione sistemica e locale. L'altro derivato è invece un polimero bio-attivo, derivato dal PLA per funzionalizzazione con un peptide che, riconoscendo il recettore EGFR, funge da agente per il *targeting attivo*.

Il gruppo di ricerca in cui ho svolto il progetto di dottorato si occupa da anni del trattamento di patologie dell'osso, con particolare riferimento alla rigenerazione tissutale. Il progetto di questa tesi si colloca all'interno di questo filone di ricerca nel tentativo di sviluppare sistemi nanoparticellari adatti al trattamento di patologie ossee. Le patologie di nostro interesse sono sia patologie tumorali, come le metastasi alle ossa, che patologie infiammatorie, come l'artrite reumatoide. Nonostante le patologie

differenti, in entrambi i casi l'utilizzo di un sistema nanoparticellare potrebbe contribuire ad aumentare l'efficacia e a ridurre gli effetti collaterali dei farmaci comunemente utilizzati. Questo aspetto è importante non solo per i farmaci anti-tumorali ma anche per gli antiinfiammatori steroidei, molto utilizzati per via sistemica nel trattamento di patologie infiammatorie dell'osso e allo stesso modo caratterizzati da un'elevata tossicità. I sistemi nanoparticellari sono pensati sia per una somministrazione sistemica che per una somministrazione locale.

## **Introduzione**



## INTRODUZIONE

### 1. Il poli-lattide (PLA): proprietà e limiti

Il poli-lattide (PLA) è un polimero di sintesi che appartiene alla categoria dei poliesteri alifatici. Essi rappresentano una classe di polimeri idrofobici di sintesi, biocompatibili e biodegradabili, frequentemente utilizzati in ambito farmaceutico.

Oltre al PLA, appartengono a questa categoria anche il poli-glicolide (PGA), il poli- $\epsilon$ -caprolattone ( $\epsilon$ -PCL) e il poli- $\gamma$ -valerolattone (PVL) e i relativi copolimeri. Questi polimeri vengono sintetizzati a partire dagli  $\alpha$ -idrossiacidi corrispondenti (acido lattico, acido glicolico, ...) oppure dai relativi dimeri (lattide, glicolide, ...) (Fig. 1).

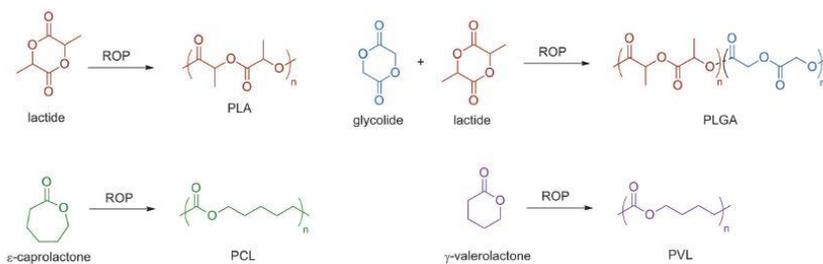


Figura 1: struttura dei principali poliesteri alifatici e relativo monomero di partenza.

Il PLA rappresenta uno dei polimeri biodegradabili più utilizzati in ambito medico-farmaceutico degli ultimi 20 anni. Esso infatti è stato utilizzato per la produzione di fili di sutura e di viti per chirurgia ortopedica per la realizzazione di impianti per l'ingegneria tissutale e per la rigenerazione ossea, ma anche per la realizzazione di film per la medicazione di ferite cutanee. Il PLA e il suo co-polimero con l'acido glicolico, il poli-lattide-co-

glicolide (PLGA), è stato approvato dall'FDA, dato il suo uso consolidato come componente dei fili di sutura, per la realizzazione di sistemi di rilascio dei farmaci per uso umano anche per somministrazione parenterale, sottoforma di microparticelle e di nanoparticelle destinate al *drug delivery*. In aggiunta, il PLA è utilizzato anche in agricoltura come fertilizzante e pesticida (Seyednejad, Ghassemi, et al., 2011) (Gupta and Kumar, 2007).

Il PLA è un polimero idrofobico: esso viene solubilizzato da solventi clorurati o da altri solventi organici come acetone, dimetilsolfossido, tetraidrofurano, diossano, etilacetato, dimetilformammide; sono non-solventi invece gli alcoli (etanolo, metanolo, glicerolo), gli idrocarburi non sostituiti (esano, eptano) e l'acqua. Esso presenta ad un'estremità della catena un gruppo carbossilico libero, anche se può essere modificato in base alle sue applicazioni.

La degradazione *in vivo* del PLA avviene per idrolisi dei legami esterei delle catene polimeriche, dando origine a residui non tossici poiché rientrano nei normali cicli metabolici cellulari, in particolare nel ciclo di Krebs (Dinarvand, Sepehri, et al., 2011) (Jain, 2000). Non sono necessari enzimi specifici per la sua metabolizzazione *in vivo*. La degradazione delle strutture polimeriche a base di PLA avviene per *erosione in bulk*: le molecole di acqua diffondono velocemente all'interno della matrice polimerica, provocando un fenomeno complesso che combina la degradazione per idrolisi delle catene polimeriche delle matrice all'erosione dei frammenti polimerici superficiali. La degradazione si conclude con la liberazione di monomeri che vengono definitivamente eliminati dall'organismo. Il processo di degradazione del PLA *in vivo* è un processo autocatalitico. L'idrolisi del legame estereo

indotta dalla presenza di acqua è responsabile della rottura della catena polimerica in numerosi oligomeri e/o monomeri, che presentano gruppi carbossilici liberi all'estremità delle catene. Sono questi gruppi acidi ad innescare e sostenere il processo di biodegradazione. La velocità con cui il PLA va incontro a degradazione *in vivo* è un aspetto fondamentale poiché ne determina la performance del prodotto. Sono numerosi gli aspetti che influenzano la velocità di erosione della matrice polimerica: essi dipendono sia da caratteristiche intrinseche del polimero (peso molecolare, temperatura di transizione vetrosa, composizione chimica, ...) che da proprietà del prodotto finito (dimensione, porosità, ...) (Fig. 2) (Anderson and Shive, 2012). Ad esempio, polimeri molto idrofobici come il PCL vanno incontro a una lenta degradazione nell'arco di anni per cui sono preferiti per la preparazione di dispositivi medici per l'ingegneria tissutale.

**Table 1**  
Factors affecting the hydrolytic degradation behaviour of biodegradable polyesters.

- 
- Water permeability and solubility (hydrophilicity/hydrophobicity)
  - Chemical composition
  - Mechanism of hydrolysis (noncatalytic, autocatalytic, enzymatic)
  - Additives (acidic, basic, monomers, solvents, drugs)
  - Morphology (crystalline, amorphous)
  - Device dimensions (size, shape, surface to volume ratio)
  - Porosity
  - Glass transition temperature (glassy, rubbery)
  - Molecular weight and molecular weight distribution
  - Physico-chemical factors (ion exchange, ionic strength, pH)
  - Sterilization
  - Site of implantation
- 

Figura 2: Principali fattori che sono alla base del processo di degradazione dei poliesteri alifatici e dei sistemi di drug delivery *in vivo* (Anderson and Shive, 2012).

Oltre alla biodegradabilità e alla biocompatibilità, il PLA viene preferito ad altri polimeri perché viene sintetizzato a partire da prodotti naturali,

riducendo il rischio di inquinamento ambientale; esso rappresenta un buon sostituto ai polimeri idrocarburici. Il PLA è un polimero termoplastico, e questa caratteristica lo rende adatto a lavorazioni industriali come estrusione, *injection moulding* o *blow moulding*. Inoltre, se si pensa ad una applicazione su larga scala, il PLA è un polimero versatile in quanto può essere modificato nella sua composizione e struttura chimica in funzione dell'applicazione a cui è destinato (Raquez, Habibi, et al., 2013).

Il PLA viene prodotto per polimerizzazione a partire dall'acido lattico. Quest'ultimo viene ricavato dall'amido o da altri polisaccaridi di origine naturale ricavati dallo zucchero, dalle patate e dal mais. L'acido lattico può essere prodotto attraverso procedimenti chimici, anche se il metodo preferito è la fermentazione utilizzando ceppi di *Lactobacilli*. Controllando la temperatura, il pH e la velocità di agitazione è possibile monitorare il processo migliorando il più possibile la purezza del prodotto finale. L'acido lattico (acido 2-idrossi-propanoico) è l' $\alpha$ -idrossi acido più semplice ad avere un centro chirale. Esso infatti si presenta con due diverse configurazioni, D e L. Entrambi gli enantiomeri possono essere ottenuti mediante fermentazione, per cui selezionando il ceppo opportuno di *Lactobacillus* è possibile ottenere miscele enantiomericamente pure. Al contrario, mediante processi di produzione chimici si ottengono generalmente delle miscele racemiche.

Esistono metodi differenti per la sintesi del PLA (Fig. 3) (Gupta and Kumar, 2007), (Seyednejad, Ghassemi, et al., 2011):

- i) Polimerizzazione per condensazione: questa metodica prevede la condensazione diretta di singole unità di acido lattico

utilizzando un opportuno catalizzatore. Attraverso questa via di sintesi è possibile ottenere solamente polimeri a basso peso molecolare, poche decine di kDa ( $< 30\text{kDa}$ ). Un altro svantaggio è rappresentato dal fatto che non è possibile regolare la configurazione dei centri chirali. Per cui è impossibile ottenere catene omogenee a discapito della resistenza meccanica del polimero finale. Utilizzando particolari reagenti, è possibile creare anche catene a più alto peso molecolare in seguito alla condensazione di catene a peso molecolare più basso.

- ii) Polimerizzazione per condensazione azeotropica: secondo questo metodo l'acido lattico è condensato direttamente in un polimero ad alto peso molecolare andando a modificare l'equilibrio tra il monomero e il polimero. Con questa metodica è possibile ottenere polimeri con un alto peso molecolare.
- iii) Polimerizzazione in fase solida: un polimero a basso peso molecolare viene pellettizzato a formare il substrato da cui si origina la reazione. La reazione di polimerizzazione avviene nella regione amorfa del polimero, caratterizzata da una maggiore mobilità delle catene. Per cui la reazione deve essere condotta ad una temperatura compresa tra la  $T_g$  del polimero e la sua  $T_m$ . Altro aspetto fondamentale è lavorare in atmosfera di gas inerte: il gas infatti serve da carrier per favorire l'eliminazione dei prodotti di scarto che si originano dalla superficie. Con questa metodica è possibile ottenere polimeri ad alto peso molecolare, anche se il tempo richiesto è molto. I

vantaggi di questa metodica sono quelli di non lavorare con solventi organici e di prevenire reazioni di ossidazione e altre forme di degradazione delle catene polimeriche.

- iv) *Ring opening polymerization (ROP)*: tecnica utilizzata per la prima volta nel 1932 ed è attualmente la tecnica più utilizzata perché è possibile controllare con accuratezza i prodotti della reazione. Infatti è adatto alla realizzazione di polimeri con un alto peso molecolare e in cui la configurazione dei centri chirali è ben definita. La sintesi del polilattide avviene a partire dal suo dimero ciclico (lattide), che si ottiene a partire da oligomeri di PLA ad elevate temperature e a bassa pressione, in presenza di un catalizzatore.
- v) Sintesi per via enzimatica nella quale enzimi specifici, soprattutto lipasi, vengono utilizzati come catalizzatori della sintesi del polimero. Il vantaggio di questa metodica è quello di non avere prodotti di scarto e contaminanti per l'ambiente; inoltre il catalizzatore può essere recuperato e riutilizzato. Con questa metodica è possibile ottenere polimeri con una elevata stereoselettività ed è possibile anche realizzare copolimeri a blocchi formati a partire da monomeri di natura diversa. Lo svantaggio principale è che non è possibile ottenere polimeri con un elevato peso molecolare.

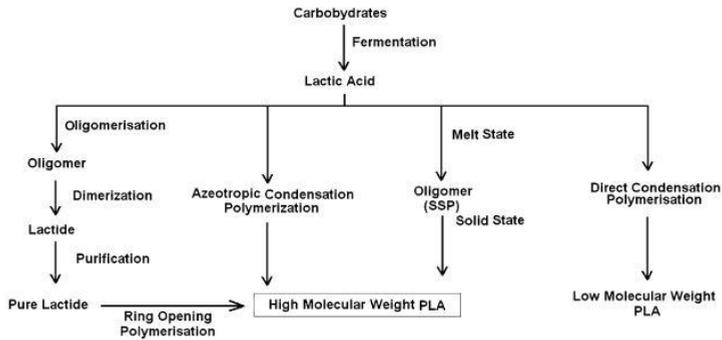


Figura 3: Schema riassuntivo delle principali metodiche di sintesi del polilattide (PLA) (Gupta 2007).

In base alla configurazione dei centri chirali delle unità di acido lattico, è possibile sintetizzare il poli-D-lattide (PDLA), il poli-L-lattide (PLLA) e la miscela di poli-D,L-lattide (PDLLA). La struttura cristallina o amorfa del PLA è influenzata dalla configurazione dei suoi centri chirali (tatticità). Infatti, il poli-L-lattide e il poli-D-lattide sono polimeri semi-cristallini ( $T_m \approx 180^\circ\text{C}$ ) che presentano un profilo di degradazione molto lento, mentre il poli-D,L-lattide è un polimero lineare amorfo ( $T_g \approx 60^\circ\text{C}$ ) e il suo profilo di degradazione è più rapido rispetto a poli-(L-lattide) e poli-(D-lattide): dati in letteratura dimostrano che, in seguito ad incubazione in tampone fosfato a pH 7,4 e alla temperatura di  $37^\circ\text{C}$ , il poli-D,L-lattide degrada raggiungendo il 50% del suo peso molecolare iniziale in circa 7-12 settimane, mentre il poli-L-lattide- e il poli-D-lattide in 53 settimane (Wanamaker, Tolman, et al., 2009) (Theryo, Jing, et al., 2010). Oltre al problema della tatticità, il PLA è anche un polimero fragile: alcune applicazioni particolari, come per esempio l'impiego in ambito di rigenerazione tissutale ossea, necessitano di polimeri che possano resistere a importanti stress meccanici, anche in

seguito alla degradazione. Tendenzialmente, il PLLA ha migliori proprietà meccaniche del PDLLA, grazie alla sua cristallinità che determina una migliore organizzazione delle catene polimeriche. Inoltre, è la porzione amorfa del polimero ad andare incontro più facilmente a degradazione.

Oltre alla configurazione dei centri chirali, l'altra caratteristica fondamentale del PLA è il peso molecolare. Come già anticipato, il peso molecolare del polimero influenza direttamente il profilo di degradazione del polimero stesso. Per questa ragione, si preferisce utilizzare PLA ad alto peso molecolare per la realizzazione di impianti poiché è possibile avere una maggiore resistenza meccanica, mentre PLA a più basso peso molecolare è preferito per la realizzazione di *drug delivery systems* (sistemi micro- e nano-particellari, ecc...) poiché il profilo di degradazione più veloce permette una miglior regolazione del rilascio dell'attivo ed una minore tossicità, per accumulo, dei sistemi di rilascio (*Gupta and Kumar, 2007*).

Nonostante le numerose proprietà che rendono il PLA un polimero di elezione in ambito farmaceutico, esso presenta comunque alcune limitazioni.

Innanzitutto, l'elevata cristallinità e idrofobicità del polimero rendono il profilo di degradazione *in vivo* molto lento. Quando il polimero è utilizzato per la realizzazione di *drug delivery systems*, questo aspetto si traduce in un profilo di rilascio del farmaco veicolato caratterizzato da un *burst release* iniziale e poi da un ritardo o da una incompleta cessione nel tempo. Inoltre, la liberazione di monomeri acidi in seguito a degradazione *in vivo* provoca una riduzione del pH del microambiente, che potrebbe degradare le molecole veicolate, come nel caso delle proteine. Considerando invece

l'applicazione per la realizzazione di scaffold per l'ingegneria tissutale, la fragilità del polimero non lo rende particolarmente adatto alle sollecitazioni meccaniche. Inoltre, l'elevata idrofobicità lo rende poco adatto alla crescita cellulare.

Per queste ragioni, sono stati eseguiti numerosi sforzi al fine di modificare la struttura del PLA e migliorarne le performance. A questo proposito, per migliorare il profilo di degradazione, il PLA viene co-polimerizzato con altri monomeri come polietilenglicole (PEG), PCL e PGA. In particolare, PEG e PCL fungono da plasticizzanti poiché contribuiscono ad abbassare la Tg del polimero: in questo modo aumenta la frazione amorfa del polimero rispetto a quella cristallina. La presenza del PGA contribuisce ad aumentare l'idrofilia delle catene polimeriche e quindi favorisce l'idrolisi delle catene stesse. Alcuni studi infatti hanno dimostrato come il profilo di degradazione del PLA venga notevolmente ridotto all'aggiunta del glicolide nella struttura polimerica, passando dal 60% di degradazione in 45 settimane per il PLA fino ad ottenere la completa degradazione del polimero in 10 settimane con il copolimero 50:50 PLA:PGA (*Anderson and Shive, 2012*). Ulteriori esempi di modificazione e funzionalizzazione del PLA verranno trattati in seguito.

## **2. I sistemi nanoparticellari applicati al *drug delivery***

I sistemi nanoparticellari vengono definiti come sistemi colloidali di natura polimerica caratterizzati da una dimensione compresa tra 1 e 1000 nm (*Nicolas, Mura, et al., 2013*). Essi possono essere costituiti da diversi materiali, come polimeri (naturali o di sintesi) o lipidi; la composizione delle

nanoparticelle ne influenza le proprietà morfologiche e di conseguenza la loro applicazione. Il National Institute of Health (NIH) definisce con il termine di “nanomedicina” l’applicazione delle nanotecnologie alla diagnosi, prevenzione e cura delle patologie (Moghimi, Hunter, et al., 2005). Infatti, le nanotecnologie comprendono un insieme di tecnologie caratterizzate dallo sviluppo in scala nanometrica di diversi prodotti, come chip per imaging, polimeri biomimetici come carbon nanotubes ecc...

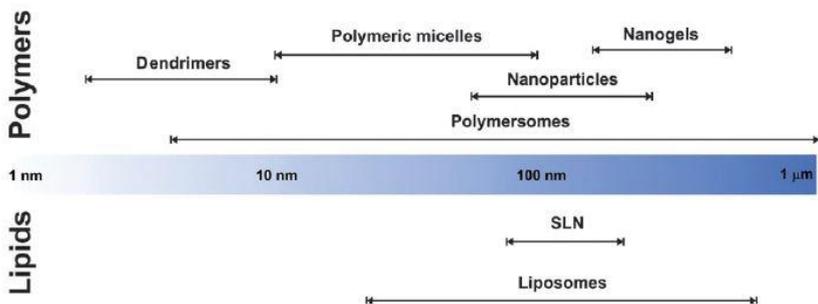


Figura 4: Esempi di sistemi nanoparticellari e relativo intervallo dimensionale (Nicolas, Mura, et al., 2013).

Tra i sistemi nanoparticellari polimerici utilizzabili in ambito medico-farmaceutico, possiamo distinguere 3 diverse strutture principali (Nicolas, Mura, et al., 2013):

- i) Micelle polimeriche: si tratta di nanosistemi che si formano spontaneamente per associazione di polimeri anfifilici. Si originano infatti a partire da polimeri a blocchi in cui la porzione idrofobica va a creare un core all’interno della nanoparticella, mentre la porzione più esterna è rappresentata dalla porzione idrofilica del polimero. Per questa ragione vengono anche

definite strutture *core-shell*. La presenza della porzione più idrofilica sulla superficie delle nanoparticelle rende i sistemi particolarmente adatti alla somministrazione endovenosa. Questi sistemi hanno solitamente una dimensione compresa tra 5 e 100 nm. Le micelle polimeriche sono caratterizzate da un concentrazione micellare critica (CMC) specifica, al di sotto della quale le nanoparticelle tendono a disaggregarsi. Le micelle polimeriche sono particolarmente adatte alla somministrazione di farmaci idrofobici e DNA e hanno il vantaggio di poter essere facilmente funzionalizzate.

- ii) Nanoparticelle polimeriche: sono quei sistemi nanoparticellari in cui il farmaco è disperso all'interno della matrice polimerica. Possono essere classificate in nanosfere quando si tratta di sistemi matriciali o nanocapsule quando si tratta di sistemi "a serbatoio" in cui una membrana esterna racchiude un core interno, acquoso o lipofilo, contenente il farmaco.
- iii) Polimerosomi: si tratta di sistemi polimerici *reservoir* in cui la membrana è costituita da polimeri anfifilici. In questo si distinguono dalle nanocapsule. Si tratta di sistemi biomimetici che hanno un comportamento simile ai fosfolipidi: essi tendono ad auto associarsi a formare una membrana a doppio strato, in cui le porzioni idrofobiche tendono ad associarsi tra loro, lasciando le porzioni più idrofile a contatto con lo spazio esterno e interno delle nanoparticelle. Il vantaggio dei

polimerosomi è quello di poter veicolare sia molecole idrofobiche che idrofiliche.

La scelta del metodo di preparazione dei sistemi nanoparticellari dipende dalle caratteristiche del polimero di interesse. In particolare, per i polimeri che vanno incontro ad auto-associazione le metodiche più comuni prevedono l'emulsione con evaporazione del solvente e la tecnica della nanoprecipitazione. Il PLA e derivati appartengono a questa categoria di polimeri e le nanoparticelle polimeriche a base di PLA vengono realizzate seguendo una di queste metodiche. Nel primo caso (emulsione con evaporazione del solvente, Fig. 5), il polimero e il farmaco idrofobico sono solubilizzati in un solvente organico; la soluzione viene poi emulsionata con una soluzione acquosa contenente un tensioattivo. Le goccioline di fase organica che si vengono a formare sono il punto da cui si originano le particelle solide. Questa tecnica è particolarmente adatta alla realizzazione di nanoparticelle veicolanti un farmaco idrofobico, poiché l'incapsulazione di molecole idrofile è piuttosto ridotta. Infatti, si preferisce una doppia emulsione nel caso della realizzazione di nanoparticelle caricate con un farmaco idrofilo.

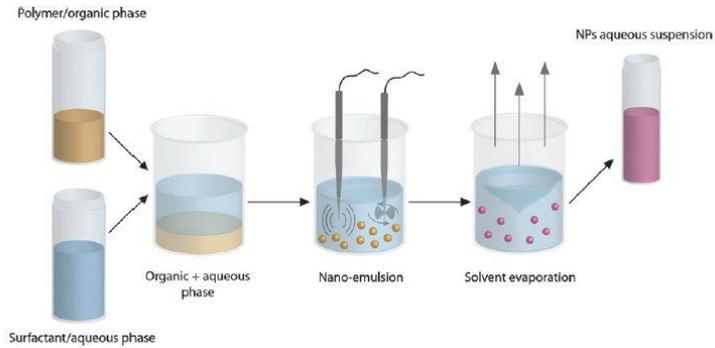


Figura 5: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione di nanoparticelle mediante la tecnica dell'emulsificazione con eliminazione (evaporazione) del solvente (Nicolas, Mura, et al., 2013).

Nel caso della tecnica della nanoprecipitazione (Fig. 6) è necessario che il solvente in cui si solubilizza il polimero sia miscibile nella fase esterna. Farmaco e polimero devono essere solubili nel solvente organico selezionato, ma non devono essere solubili nella fase esterna. Le nanoparticelle si formano nel momento in cui la soluzione polimerica entra in contatto con la fase esterna, grazie alla rapida diffusione del solvente.

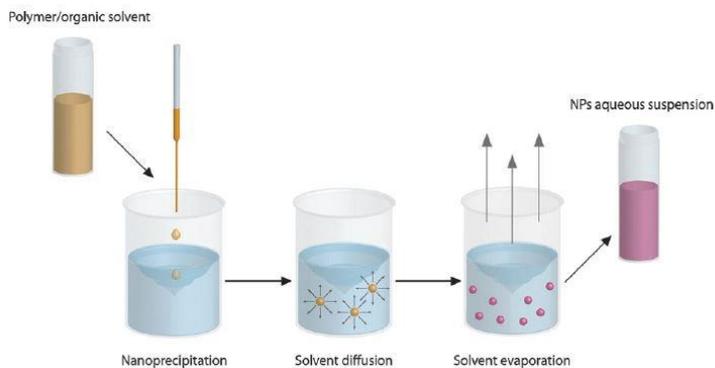


Figura 6: Schema rappresentativo delle fasi di realizzazione di sistemi nanoparticellari secondo la tecnica della nanoprecipitazione (Nicolas, Mura, et al., 2013).

I sistemi nanoparticellari polimerici possono essere utilizzati sia come agenti di *imaging* che come veicoli per la somministrazione di farmaci. Particelle di ferro sono state infatti utilizzate come agenti di contrasto nella risonanza magnetica per la diagnosi di patologie come cancro, infiammazione del sistema nervoso centrale, artrite e aterosclerosi (Moghimi, Hunter, et al., 2005). Oggetto di questo progetto di ricerca sono però le nanoparticelle applicate al *drug delivery*.

Le nanoparticelle polimeriche infatti rappresentano un veicolo per diverse molecole che possono essere incapsulate, adsorbite o legate covalentemente alla matrice polimerica delle nanoparticelle stesse. I vantaggi sono evidenti soprattutto nel caso di molecole lipofile: la veicolazione e formulazione in sistemi nanoparticellari aiuta a risolvere il problema della scarsa solubilità associata a molte delle nuove molecole che hanno dimostrato un potenziale farmacologico (Moghimi, Hunter, et al., 2005). Inoltre, i sistemi terapeutici nanoparticellari possono essere progettati in modo da poter essere indirizzati ad un determinato tessuto bersaglio, a livello del quale viene rilasciata la molecola attiva veicolata. Sistemi nanoparticellari di questo tipo vengono ottenuti in seguito a modificazione chimica della matrice polimerica. Esistono infatti nanoparticelle responsive agli stimoli, come alla variazione di pH, al calore esterno o a un campo elettromagnetico; o ancora nanoparticelle che riconoscono particolari bersagli a livello cellulare, come recettori o proteine di membrana (Motornov 2010). Il vantaggio è quello di aumentare l'efficacia e ridurre gli effetti collaterali.

### 2.1 Biodistribuzione: il concetto di *targeting* passivo e di *targeting* attivo

L'efficacia di un sistema terapeutico nanoparticellare si basa sulla capacità del sistema stesso di raggiungere il bersaglio. Il comportamento di un sistema nanoparticellare *in vivo* dipende da alcune caratteristiche intrinseche, ovvero dalla composizione chimica, dalla morfologia e dalla dimensione (Moghimi, Hunter, et al., 2005).

In seguito a somministrazione parenterale, i sistemi nanoparticellari innescano una risposta immunitaria aspecifica mediata dai macrofagi del sistema reticolo-endoteliale (RES), soprattutto da parte dei macrofagi che si trovano a livello del fegato e della milza. Questo riconoscimento aspecifico è innescato spesso dal fenomeno della *opsonizzazione* che consiste nella deposizione sulla superficie delle nanoparticelle di proteine del sangue, come fibronectina, immunoglobuline e proteine del sistema del complemento. Queste proteine creano un rivestimento sulla superficie delle nanoparticelle che contribuisce a favorire il riconoscimento da parte dei macrofagi. Il fenomeno della *opsonizzazione* dipende in primo luogo dalla dimensione delle nanoparticelle: infatti, nanoparticelle con dimensione superiore a 200 nm attivano più facilmente il sistema del complemento e di conseguenza il meccanismo di *clearance* mediato dai macrofagi. Oltre alle dimensioni, anche alcune proprietà di superficie, come la presenza di particolari gruppi chimici o la carica superficiale, possono contribuire a favorire questo processo.

Un altro aspetto da considerare parlando di sistemi nanoparticellari è la loro stabilità *in vivo*. Infatti, piccole dimensioni corrispondono ad una più elevata area superficiale. Questa caratteristica intrinseca dei sistemi

nanoparticellari è responsabile della loro instabilità. L'aumento dell'area superficiale infatti aumenta la possibilità che le nanoparticelle interagiscano tra loro a formare aggregati di dimensioni maggiori. Come spiegato in precedenza, l'aumento delle dimensioni è il principale fattore ad influenzare la *clearance* delle nanoparticelle. È evidente quindi l'importanza della dimensione delle nanoparticelle per la loro efficacia *in vivo*.

Numerose strategie sono state prese in considerazione al fine di aumentare la stabilità delle nanoparticelle, tra cui quella più importante è la modificazione delle caratteristiche di superficie derivatizzando opportunamente il polimero costituente. Uno degli approcci più utilizzati è quello di legare covalentemente al polimero catene di poli-etilenglicole (PEG). Il PEG è un polimero idrofilo che viene utilizzato per aumentare l'idrofilia non solo di sistemi nanoparticellari ma anche di proteine prima della loro somministrazione (*Essa 2011*) (*Jokerst 2011*) (*Otsuka 2012*) (*Roberts 2002*). Nell'ambito dei sistemi nanoparticellari, la presenza di PEG sulla superficie delle nanoparticelle conferisce alle stesse un carattere *stealth*: le catene di PEG libere creano infatti una corona idrofila sulla superficie delle nanoparticelle prevenendo sia l'adsorbimento delle proteine coinvolte nel processo della opsonizzazione che l'aggregazione delle stesse. Per cui le nanoparticelle PEGilate riescono più facilmente ad evitare il riconoscimento da parte dei macrofagi.

La mancata captazione da parte del RES contribuisce ad aumentare il tempo di permanenza in circolo delle nanoparticelle (*long circulating nanoparticles*) favorendone in questo modo una migliore distribuzione nei

diversi distretti dell'organismo, oltre che a permettere una cessione più prolungata della molecola attiva veicolata.

In alcune situazioni patologiche, si vengono a creare delle modificazioni nei tessuti, tali da poter essere sfruttate per realizzare sistemi di rilascio sensibili a queste alterazioni. Esempi riportati in letteratura sono rappresentati da sistemi terapeutici nanoparticellari che rispondono alle variazioni di pH che si verificano in particolari condizioni fisio-patologiche (*Liu 2009*) oppure da quelle nanoparticelle che si distribuiscono nei vari distretti in base alla dimensione delle fenestrate dei vasi. Infatti, è ben noto che le nanoparticelle fuoriescono dal torrente circolatorio diffondendo attraverso l'endotelio dei capillari e si concentrano nella matrice extracellulare da dove esplicano la loro funzione (Fig. 7). Questo avviene solo nei tessuti in cui l'endotelio è caratterizzato da fenestrate abbastanza ampie da fare passare le nanoparticelle. Ad esempio, l'endotelio a livello degli epatociti è caratterizzato da fenestrate di 150 nm, mentre a livello di tessuti infiammatori o tumorali le dimensioni delle fenestrate possono raggiungere anche i 700 nm. Al contrario invece, solo le particelle più piccole (< 10 nm) vengono captate nella circolazione linfatica oppure nel midollo osseo (*Moghimi, Hunter, et al., 2001*) (*Gaumet, Vargas, et al., 2008*).

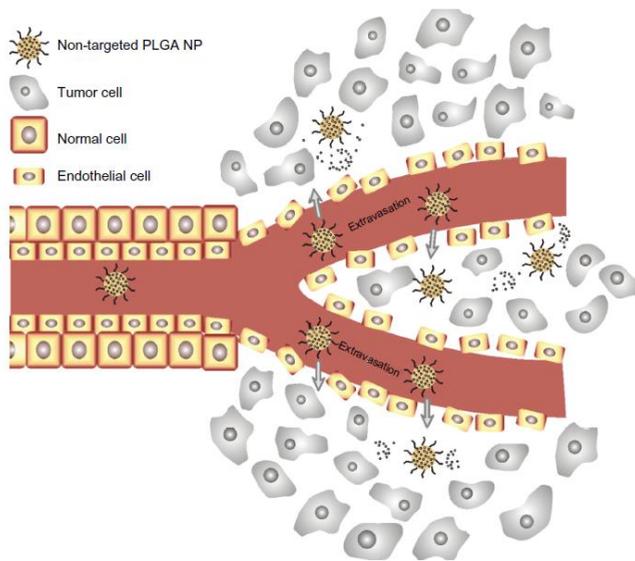


Figura 7: Rappresentazione schematica del fenomeno di targeting passivo e EPR effect (Dinarvand, Sepehri, et al., 2011).

Si parla di direzionamento passivo (*passive targeting*) quando il sistema nanoparticellare viene indirizzato nei diversi tessuti corporei in base alle differenze fisiopatologiche, come le differenze nell'endotelio dei vasi o differenze di pH, precedentemente descritte. Questo fenomeno spiega il motivo per cui le nanoparticelle PEGilate sono caratterizzate da un selettivo accumulo nei tessuti tumorali, secondo quello che viene definito *Enhanced Permeation and Retention Effect* (EPR) (Dinarvand, Sepehri, et al., 2011): la presenza del PEG infatti è responsabile dell'aumento del tempo di permanenza in circolo e quindi favorisce il raggiungimento dei tessuti in cui la captazione è favorita dalla presenza di fenestrature più ampie nell'endotelio dei capillari presenti. Soprattutto per il trattamento dei tumori, dove gli agenti chemioterapeutici utilizzati sono caratterizzati da

una finestra terapeutica molto ristretta, queste anomalie nella struttura dei vasi possono essere sfruttate per indirizzare le nanoparticelle e il farmaco in esse veicolato in un determinato tessuto, riducendone così la tossicità e gli effetti avversi. Nel 1995 per la prima volta sono stati approvati dalla FDA liposomi PEGilati veicolanti Doxorubicina per il trattamento dei tumori (DOXIL®) (Gabizon 1994). Nel 2007 sono stati approvati i primi sistemi nanoparticellari polimerici a base di poli-lattide PEGilato contenenti Paclitaxel (GENEXOL®) (Kim 2004). Questa strategia però non è sempre sufficiente: alcuni tumori solidi, come il tumore al pancreas o al cervello, sono caratterizzati da fenestrate molto ristrette. Inoltre, ripetute somministrazioni di sistemi nanoparticellari PEGilati sono responsabili di quello che viene definito *Accelerated blood clearance phenomenon* dovuto allo sviluppo di anticorpi IgM rivolti contro il PEG (Nicolas, Mura, et al., 2013). Inoltre, l'irregolarità dei vasi che si formano per neoangiogenesi nei tessuti tumorali determina una differenziale irrorazione del tessuto stesso, per cui un diverso apporto di ossigeno, di nutrienti e anche dei carrier nanoparticellari somministrati per via endovenosa. Il rischio è quindi quello di un non omogeneo trattamento del tumore. Per queste ragioni, il *targeting* passivo non può essere l'unica strategia per indirizzare selettivamente le nanoparticelle in un bersaglio.

Risulta quindi necessario ricorrere spesso al *targeting attivo*: i sistemi nanoparticellari vengono funzionalizzati con ligandi capaci di riconoscere particolari bersagli a livello del tessuto da trattare.

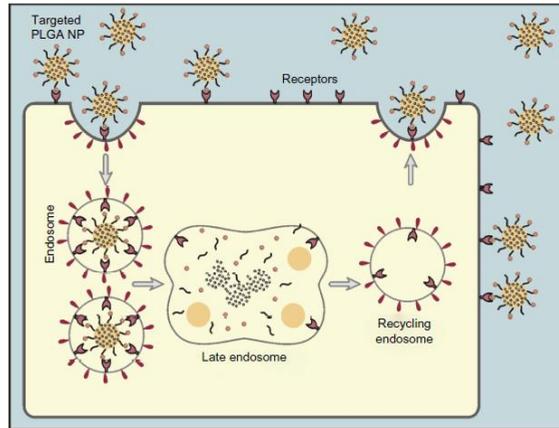


Figura 8: Schema esemplificativo del meccanismo di azione di nanoparticelle targettizzate secondo il fenomeno del targeting attivo (Dinarvand, Sepehri, et al., 2011).

Il concetto di *active drug targeting* prende origine da quando Paul Ehrlich, premio Nobel per la medicina nel 1908, parlò per la prima volta di *magic bullet* riferendosi a un farmaco che fosse capace di “colpire” solo le cellule malate senza colpire le cellule sane, evitando numerosi effetti collaterali. Questo aspetto è di particolare importanza soprattutto quando si parla di terapia antitumorale (Nicolas, Mura, et al., 2013).

E' possibile ottenere sistemi nanoparticellari targettizzati essenzialmente mediante due strategie: sfruttare particolari condizioni del tessuto da colpire (pH, temperatura, ecc...) e/o stimoli esterni come campi magnetici e creare polimeri responsivi a tali stimoli oppure sfruttare la capacità del polimero, opportunamente modificato, di interagire con strutture (es. a livello della membrana cellulare) specifiche presenti nel tessuto/organo da curare.

In quest'ultimo caso è necessario legare sulla superficie della nanoparticella un agente capace di riconoscere in maniera specifica alcuni bersagli sovra-

espressi nel tessuto di interesse. Il riconoscimento può avvenire per interazione ligando-recettore, antigene-anticorpo o per mezzo di un aptamero<sup>1</sup>.

In generale, gli agenti di *targeting* possono essere aggiunti alle nanoparticelle prima della realizzazione delle stesse, previa modificazione del polimero di partenza, oppure dopo la realizzazione delle nanoparticelle. Tendenzialmente, nel caso di agenti di direzionamento di grandi dimensioni, come proteine o polisaccaridi, si preferisce la seconda strategia, anche perché i solventi organici utilizzati nella realizzazione delle nanoparticelle potrebbero alterare la struttura terziaria della proteina. Nel caso di agenti di *targeting* di piccole dimensioni (piccoli peptidi o piccole molecole) entrambe le vie di funzionalizzazione possono essere percorse. La modificazione del polimero prima della realizzazione delle nanoparticelle permette di accertare l'effettiva funzionalizzazione del polimero e controllare anche la densità di funzionalizzazione (ad esempio attraverso tecniche NMR). Il problema è che la modificazione del polimero porta ad una alterazione delle proprietà chimico-fisiche del polimero stesso, come ad esempio la sua solubilità, perciò il metodo di preparazione delle nanoparticelle deve essere opportunamente adattato e modificato. La modificazione dopo produzione delle nanoparticelle ha come limitazioni quello di non poter purificare adeguatamente le nanoparticelle dall'agente di *targeting* non legato, poiché filtrazione e centrifugazione potrebbero comunque influenzare la stabilità e la morfologia delle nanoparticelle. Allo

---

<sup>1</sup> Acidi nucleici artificiali capaci di legarsi a una molecola o a una proteina.

stesso tempo, sono necessarie tecniche più sofisticate per caratterizzare il sistema (XPS<sup>2</sup>, Tof-SIMS<sup>3</sup>, SPR<sup>4</sup>), anche se si tratta di metodiche che non sempre permettono di distinguere se l'agente di target è legato covalentemente alla superficie della nanoparticella o è semplicemente adsorbito.

I ligandi utilizzati in ambito farmaceutico appartengono alle seguenti categorie:

- Piccole molecole: molto utilizzate perché relativamente poco costose, facilmente modificabili e caratterizzabili. Tra queste riconosciamo l'acido folico (vitamina B9) e la biotina (vitamina B7), entrambe utilizzate come agenti di targeting per il direccionamento specifico verso i tessuti tumorali, poiché essi sono caratterizzati da una sovraespressione dei rispettivi recettori (*Low, Henne, et al., 2008*) (*Russell-Jones, McTavish, et al., 2004*). Altro esempio è la cobalamina (vitamina B12): utilizzata in una formulazione orale a base di insulina al fine di promuoverne l'assorbimento intestinale grazie alla sua attività come promotore dell'assorbimento (*Russelljones, Westwood, et al., 1995*). Il problema dell'uso di queste molecole è la scarsa selettività della loro azione.

---

<sup>2</sup> X-Ray Photoelectron Spectroscopy: tecnica spettroscopica che permette di caratterizzare la superficie di un materiale, ad esempio riconoscere gli elementi chimici che la compongono e definirne anche lo stato di legame.

<sup>3</sup> Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: tecnica di spettroscopia di massa in cui un fascio di ioni primario viene utilizzato per de-adsorbire e ionizzare gli ioni dalla superficie di un materiale, che vengono successivamente accelerati in uno spettrometro di massa. La massa degli ioni è valutata in base al tempo di volo.

<sup>4</sup> Surface plasmon resonance: tecnica che prevede l'eccitazione di molecole sulla superficie di un materiale quando colpite da un fascio di luce.

- Carboidrati: anche in questo caso si tratta di molecole a basso costo, di facile modificazione e caratterizzazione. Inoltre, possono anche conferire proprietà *stealth* alle nanoparticelle. Tra questi, ricordiamo ad esempio il trimetilchitosano che grazie alle sue cariche positive è stato utilizzato come strategia per promuovere il passaggio della Barriera Emato-Encefalica (BEE). Galattosio, mannosio e lattosio riconoscono in maniera selettiva il recettore delle asialoglicoproteine<sup>5</sup>, quindi utilizzati come agenti di targeting per il trattamento dei tumori al fegato (*Han, Oh, et al., 1999*) (*Dwek, 1996*) (*White, Rades, et al., 2006*).
- Peptidi e proteine. Per quanto riguarda i peptidi, essi presentano dei costi di produzione relativamente bassi e presentano una buona attività per unità di massa, possono essere modificati nella loro struttura e sono stabili, per cui facilmente stoccabili e maneggiabili senza alterazioni. Inoltre, le loro piccole dimensioni non innescano la risposta immunitaria e tendenzialmente non modificano le proprietà chimico-fisiche dei carrier nanoparticellari su cui si trovano. Esempi possono essere octreotide, octapeptide analogo della somatostatina, usato per il direccionamento verso i tumori (*De Jong, Breeman, et al., 2009*). Un altro esempio è rappresentato dalla sequenza Arg-Gly-Asp, conosciuta come sequenza RGD (*Kumar, 2003*). Si tratta di una sequenza di amminoacidi che riconosce in maniera selettiva i recettori  $\alpha_v\beta_3$  integrinici che

---

<sup>5</sup> Lecitine che si trovano sulla membrana plasmatica delle cellule epatiche, riconoscono asialoglicoproteine cioè proteine in cui un residuo di acido sialico viene sostituito da un residuo di galattosio, rimuovendole dal circolo.

risultano essere sovraespressi sulla membrana delle cellule maligne e dei vasi di neo-formazione nei tumori, mentre non risultano espressi sull'endotelio dei tessuti sani. Di questi peptidi esistono forme diverse che si differenziano per una diversa affinità al bersaglio. In questo ambito ha svolto un grande ruolo la metodica del *phage display* che ha permesso di riconoscere diversi piccoli peptidi dotati di elevata affinità per diversi bersagli biologici. Ad esempio, il peptide EGF1 utilizzato che interagisce con i tessuti coinvolti nella coagulazione e nella formazione del trombo (*Eigenbrot, 2002*). Molti peptidi vengono anche utilizzati in quanto favoriscono il passaggio della BEE (transferrina, lattoferrina, peptidi oppiodi-simili, apolipoproteine). Appartengono a questa categoria anche frammenti di proteine come il frammento C della tossina tetanica che riconosce il recettore gangliosidico<sup>6</sup> neuronale (*Benn, Ay, et al., 2005*).

- Anticorpi: sono stati il primo esempio di agenti di direccionamento utilizzati per riconoscere selettivamente il tessuto tumorale. Rappresentano l'agente di direccionamento più selettivo in quanto riconoscono con elevata selettività una porzione specifica del recettore. Gli anticorpi sono proteine ad elevato peso molecolare ( $\approx 150$  kDa), caratterizzate da due catene pesanti e due catene leggere, unite tra loro a dare la tipica forma a Y. Nonostante le somiglianze strutturali, gli anticorpi differiscono per una piccola porzione, responsabile del riconoscimento dell'antigene con elevata

---

<sup>6</sup> Glicolipidi particolarmente abbondanti nel cervello, costituiscono alcuni recettori fondamentali per la trasmissione del segnale.

affinità ( $k_d \approx 0,1$  nM). Molti *carrier* nanoparticellari sono stati realizzati utilizzando anticorpi come agenti di direzionamento, non solo per il trattamento dei tumori (anti Her 2 Mab - Trastuzumab) (Nahta and Esteve, 2006) ma anche nel trattamento di malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer (anti-A $\beta_{1-42}$  MAb) (Serrano-Pozo, William, et al., 2010) e delle malattie autoimmuni (anti CD4<sup>+</sup>) (Horneff, Burmester, et al., 1991). Il problema dell'uso degli anticorpi sono gli elevati costi di produzione. Per questa ragione, spesso vengono utilizzati anche frammenti degli anticorpi stessi (es. *Antigen Binding Fragments*, FAB) che risultano essere comunque selettivi ma più sicuri dopo somministrazione rispetto agli anticorpi (Allen, 2002).

- Aptameri. Si tratta di piccole catene di DNA o RNA che vengono selezionate in seguito allo *screening* di vaste librerie in base alla loro affinità per il bersaglio. Esistono diversi aptameri che riconoscono recettori intracellulari, recettori transmembrana, ecc. .... Un esempio è A10RNA usato per riconoscere l'antigene prostatico di membrana (PSMA) (Lupold, Hicke, et al., 2002). Gli aptameri sono degli ottimi candidati come agenti di targeting attivo grazie alla loro elevata affinità e alla scarsa immunogenicità dovuta alle piccole dimensioni. Il problema è la loro instabilità dopo somministrazione sistemica a causa della presenza di enzimi specifici che degradano DNA e RNA.

### 3. Funzionalizzazione del poli-lattide e impiego in ambito farmaceutico

#### 3.1 Derivati del poli-lattide e loro impiego nella realizzazione di *drug delivery systems*

Numerosi sforzi sono stati condotti al fine di migliorare le proprietà del PLA e degli altri poliesteri alifatici favorendone la loro applicazione in ambito medico-farmaceutico. Come già descritto in precedenza, il PLA è un polimero idrofobico caratterizzato da un lento profilo di degradazione *in vivo* che rende difficoltoso il controllo della cessione dell'attivo veicolato in sistemi micro- e nanoparticellari a base di PLA. Per questa e per altre ragioni descritte precedentemente, il PLA viene spesso modificato chimicamente per ottenere polimeri più adatti all'applicazione come *drug delivery*. Riporto di seguito alcuni risultati recenti in merito alla funzionalizzazione del polimero.

Ghassemi et al. (*Ghassemi, van Steenbergen, et al., 2009*) sono riusciti ad aumentare il profilo di degradazione del PLA in seguito alla sua modificazione con idrossi-metil glicolide (copolimero poli-lattide-co-idrossimetilglicolide) che si manifesta in una più veloce cessione dell'attivo incapsulato. Infatti, microparticelle a base del copolimero hanno dimostrato una cessione del lisozima incapsulato pari al 90% in 14 giorni, rispetto al PLGA con il quale si raggiunge il 65% in 65 giorni. Inoltre, l'enzima rilasciato mantiene la propria struttura ed attività a dimostrazione che la degradazione del polimero non ha effetti sulla proteina veicolata. La sostituzione del L-lattide con il D,L-lattide contribuisce a favorire la

completa degradazione della matrice polimerica, senza lasciare residui cristallini insolubili che impediscono il completo rilascio dell'attivo veicolato (*Ghassemi, van Steenbergen, et al., 2010*).

*Seyednejad et al. (Seyednejad, Vermonden, et al., 2009) (Seyednejad, Ghassemi, et al., 2011)* hanno dimostrato che la funzionalizzazione del policaprolattone (PCL) con idrossimetilglicolide non solo migliora le proprietà meccaniche del polimero ma ne migliora anche l'idrofilia, rendendo il polimero più adatto alla adesione, crescita e differenziazione cellulare e quindi più idoneo alla realizzazione di impianti per la rigenerazione tissutale.

In altri casi ancora, il PLA è stato copolimerizzato con residui di acido poli- $\alpha$ -amminobutil-L-glicolico ottenendo un polimero con cariche positive e pertanto adatto alla formazione di *polyplexes* con il DNA in maniera più efficace e sicura rispetto alla poli-lisina normalmente utilizzata come vettore (*Lim 2000*).

La modificazione della catena polimerica può essere sfruttata anche per funzionalizzare il polimero con molecole capaci di dare un particolare comportamento biologico. *Noga et al. (Noga, Petrie, et al., 2008)* hanno modificato il PLA con anidride succinica al fine di ottenere gruppi carbossilici liberi sulla catena di base. I gruppi carbossilici sono stati sfruttati per la funzionalizzazione del polimero con proteine aventi una sequenza RGD attraverso la chimica della carbodiimmide. Film polimerici ottenuti a partire dal polimero funzionalizzato hanno effettivamente dimostrato una maggiore affinità e adesione cellulare rispetto ai film ottenuti dai polimeri non funzionalizzati.

### 3.1.1 PCNL: derivato del poli-lattide ottenuto da fonti rinnovabili

Nell'ambito di un accordo di collaborazione con l'Università del Minnesota, in particolare con il laboratorio del professor Marc Hillmyer direttore del "Center for Sustainable Polymers (CSP)", si è pensato di valutare l'applicabilità in ambito medico-farmaceutico di nuovi polimeri derivati dal PLA, ottenuti da fonti rinnovabili e da materiali non tossici.

Il polimero candidato è stato il poli(1,5-ciclooctadiene-co-norbornene-2-metanolo-graft-DL-lattide) (PCNL) (Theryo, Jing, et al., 2010). Si tratta di un polimero ottenuto inserendo catene omopolimeriche di polilattide su di una catena di poli(1,5-ciclooctadiene-co-norbornene-2-metanolo) (PCN), polimero allo stato gommoso a temperatura ambiente. Il co-polimero è caratterizzato quindi dalla presenza di catene omopolimeriche di PLA e da catene di PCN (Fig. 9)

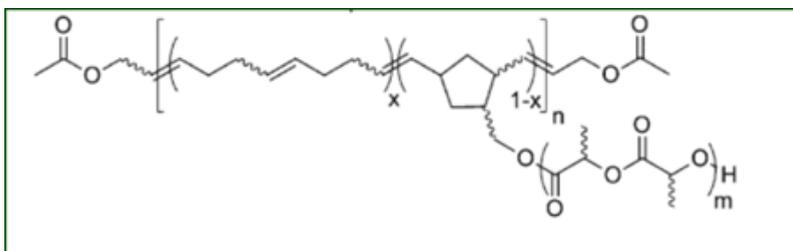


Figura 9: Struttura chimica del polimero PCNL.

L'interesse del gruppo di ricerca del prof. Hillmyer è stato quello di migliorare la duttilità del PLA per aggiunta di monomeri caratterizzati da una Tg più bassa rispetto al PLA stesso. In letteratura sono molti gli esempi

in cui il poli-lattide viene copolimerizzato con altri monomeri caratterizzati da una Tg più bassa (*Wanamaker, Tolman, et al., 2009*); (*Frick, Zalusky, et al., 2003*). Nella maggior parte degli studi presi in considerazione, la percentuale di poli-lattide nel copolimero non era inferiore al 50%. Di conseguenza, una così elevata presenza della porzione gommosa rischia di modificare significativamente altre proprietà meccaniche del polimero, come il modulo elastico. Per cui l'obiettivo del lavoro di ricerca del gruppo del prof. Hillmeyer è stato quello di individuare la componente gommosa adatta a migliorare la duttilità del polimero quando aggiunta in basse percentuali rispetto al peso complessivo del polimero (*Theryo, Jing, et al., 2010*).

La componente gommosa aggiunta al PLA è il 1,5-ciclooctadiene-co-5-norbornene-2-metanolo, composto da unità di norbornene polimerizzato con ciclooctadiene (Fig. 10).

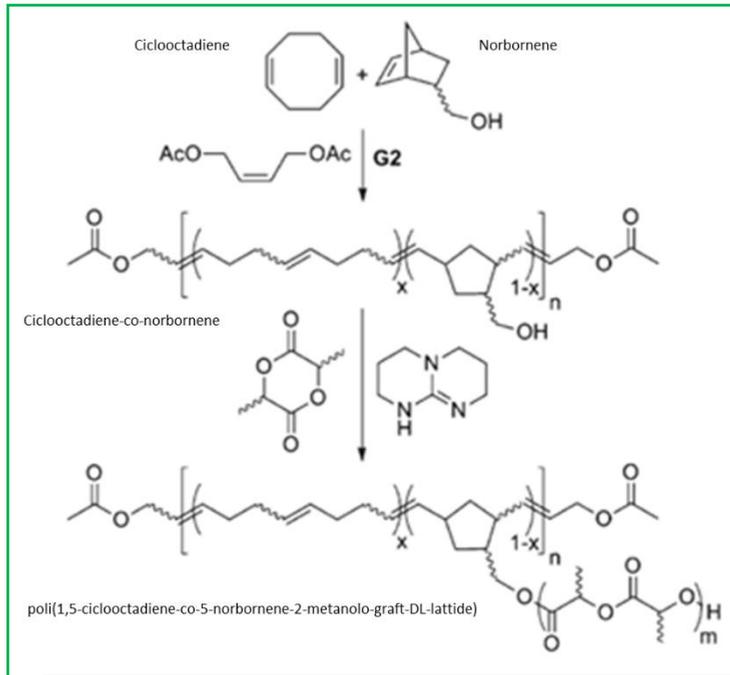


Figura 10: Schema di sintesi del PCNL.

È bene sottolineare che il norbornene rappresenta un derivato del lattide, per cui viene mantenuta la scelta di fonti rinnovabili per la sintesi del copolimero.

La Tg del segmento gommoso è -80°C. La percentuale di PLA è il 95% rispetto al peso del polimero. Il peso molecolare del polimero (Mn) è pari a 659 kg/mol; il Mn del polilattide contenuto nel polimero, sia ramificato con la componente gommosa sia in forma lineare, è pari a 57 kg/mol per ciascuna catena. Il test di trazione condotto sul copolimero sintetizzato per valutarne le proprietà meccaniche, utilizzando PLA di simile peso molecolare come riferimento, mostra come il PCNL raggiunga il 238±43 % di allungamento rispetto al PLA che manifesta solo il 13±4 % di allungamento,

mentre il modulo elastico e la “yield strength” rimangono invariate. Questo dimostra il miglioramento effettivo delle proprietà meccaniche rispetto al PLA nonostante la porzione gommosa sia presente solo al 5 % molare del *co*-polimero.

Considerate le ottime proprietà meccaniche, tale polimero è stato utilizzato dal gruppo di ricerca in cui ho svolto il progetto di dottorato per la preparazione di scaffold tridimensionali destinati alla rigenerazione tissutale. Oltre al miglioramento delle proprietà meccaniche, la presenza di domini polimerici gommosi e quindi la riduzione della cristallinità del polimero nel suo complesso può modificarne significativamente la cinetica di degradazione nonché la permeabilità ai fluidi. Questo aspetto può essere sfruttato per la preparazione di sistemi polimerici nanoparticellari che garantiscano una degradazione del polimero più veloce rispetto all'omopolimero PLA ed un profilo di rilascio dell'attivo più regolare. Nanoparticelle con queste caratteristiche di degradazione potrebbero essere adatte ad esempio ad una somministrazione intra-articolare in quanto la permanenza delle nanoparticelle all'interno dell'articolazione non deve essere troppo prolungata nel tempo per evitare il peggioramento delle condizioni di infiammazione del tessuto. Allo stesso tempo, la presenza di un maggior numero di domini amorfi, anche chimicamente differenti dall'omopolimero PLA, potrebbe consentire una maggiore permeabilità ai fluidi biologici permettendo di tamponare l'acidificazione del microambiente determinata dalla degradazione del PLA, come spiegato precedentemente.

In una prima parte del progetto di ricerca, il PCNL è stato oggetto di studio ed è stato sfruttato per la realizzazione di sistemi nanoparticellari.

### 3.2 Funzionalizzazione del poli-lattide con piccoli peptidi per ottenere *smart nanoparticles*

#### 3.2.1 Nanoparticelle selettivamente vettorizzate a base di PLA

La realizzazione di sistemi nanoparticellari selettivamente vettorizzati o dall'inglese "targettizzati" basati sul PLA sono realizzati andando a legare l'agente di direzionamento attivo all'estremità della catena polimerica. In alcuni casi, l'agente di targeting stesso può creare un guscio idrofilico che favorisce la stabilità della nanoparticella in base alla natura della molecola stessa. In altri casi, si preferisce invece usare degli spaziatori, come catene di PEG, che favoriscono l'espressione dell'agente di targeting sulla superficie e il conseguente riconoscimento del bersaglio (*Nicolas, Mura, et al., 2013*).

Esistono numerose strategie che possono essere sfruttate per la funzionalizzazione del PLA (*Nicolas, Mura, et al., 2013*):

- Chimica della carbodiimide: viene utilizzata soprattutto per la funzionalizzazione del polimero o dei sistemi nanoparticellari con piccole molecole e peptidi. I vantaggi principali sono la semplicità della reazione e la disponibilità dei gruppi coinvolti nella reazione (gruppi carbossilici e amminici) in quasi tutte le molecole/ peptidi /polimeri di interesse. Non è quindi necessario apportare ulteriori

modifiche al polimero o all'agente di targeting, evitando così di alterare la funzione biologica. Lo svantaggio è che la frequenza con cui si trovano i gruppi coinvolti in questa chimica rende difficoltoso il legame sito specifico dell'agente di targeting sul polimero.

- Addizione di Michael è la seconda strategia più frequentemente utilizzata. Questa prevede la reazione tra un gruppo maleimidico e un gruppo tiolico: questa reazione è caratterizzata da un'elevata affinità tra i due gruppi coinvolti e avviene in ambiente neutro. Gli intermedi di reazione sono più stabili di quanto si possa ottenere con la chimica della carbodiimmide. I gruppi tiolici non sono sempre presenti nelle molecole utilizzate come agenti di targeting. In questo caso si può procedere riducendo i ponti disolfuro delle proteine (con il rischio di modificare la struttura terziaria e di conseguenza l'attività) oppure modificando preventivamente la molecola con un linker eterofunzionale. In questo modo, molti problemi correlati alla funzionalizzazione sito specifica potrebbero essere risolti.
- Reazioni catalizzate dal rame stanno acquistando una grande importanza grazie alla elevata selettività, alle condizioni di lavorazione non tossiche e al ridotto numero di prodotti di scarto. Viene spesso descritta come *click chemistry* e avviene tra un azide e un alchino. Uno dei problemi principali è la necessità di allontanare il rame al termine della reazione.
- Strategia Biotina-(Strept)Avidina è una delle strategie più seguite poiché il legame che si viene a formare è uno dei legami non

covalenti più forti. Inoltre le tecniche di funzionalizzazione di anticorpi con biotina e (strept)avidina sono ben note.

### 3.2.2 GE11 e EGFR targeting

Molti tumori solidi sono caratterizzati da una incontrollata trasduzione del segnale innescata da alcuni recettori correlati alla crescita cellulare. Una delle famiglie di recettori più coinvolti è la famiglia del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR) (Yarden, 2001); (Zhang, Berezov, et al., 2007); (Rocha-Lima, Soares, et al., 2007).

Il ruolo dei recettori della famiglia EGFR è stato scoperto da Drebin (1984) che osservò la presenza di un antigene tumorale sulla superficie di cellule che esprimevano un determinato oncogene (*neu*). Questo antigene tumorale è una proteina di 185 kDa appartenente alla famiglia dei recettori EGFR chiamato Erb2, HER2 o p<sup>185her2/neu</sup>. L'espressione di questa forma di recettore è stata riscontrata in tumori primari della mammella caratterizzati da una prognosi infausta (Zhang, Berezov, et al., 2007). Ulteriori mutazioni a carico di un altro recettore appartenente alla stessa famiglia, il recettore EGFR, sono evidenti nel tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC, *non-small cell lung cancer*). Le alterazioni genetiche a carico di questa famiglia di recettori sono responsabili della sovraespressione del recettore, dell'alterazione della porzione enzimatica intracellulare del recettore e della espressione contemporanea del recettore e dei suoi ligandi (Hynes and MacDonald, 2009); tutti questi casi determinano l'attivazione dei *pathway*

intracellulari correlati al recettore. In Figura 11, sono riportati alcuni esempi di tumori e la relativa percentuale di casi in cui si è osservato un aumento dell'espressione del recettore EGFR.

Tumor Type	Percentage of Tumors Expressing EGFR
Head and neck	80 – 100
Renal	50 – 90
Lung	40 – 80
Breast	14 – 91
Colon	25 – 77
Ovarian	35 – 70
Prostate	39 – 47
Glioma	40 – 63
Pancreas	30 – 50
Bladder	31 – 48

Adapted from Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*. 2002;94:1593-1611. Copyright © 2002 American Cancer Society. Reprinted by permission of Wiley-Liss, Inc, a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.

Figura 11: Elenco di diverse forme tumorali e la relativa percentuale di casi che hanno manifestato una sovraespressione di EGFR (Rocha Lima 2007).

I recettori della famiglia EGFR sono recettori ad attività tirosinchinasica e sono fondamentali per la crescita, la proliferazione, la migrazione, la sopravvivenza e la differenziazione cellulare (Yarden, 2001). L'attivazione incontrollata di questi recettori è responsabile della formazione di cellule tumorali. Appartengono a questa famiglia diverse forme di recettore, EGFR/ Erb1, HER2/ Erb2, HER3/ Erb3 e HER4/ Erb4 (Fig. 12).

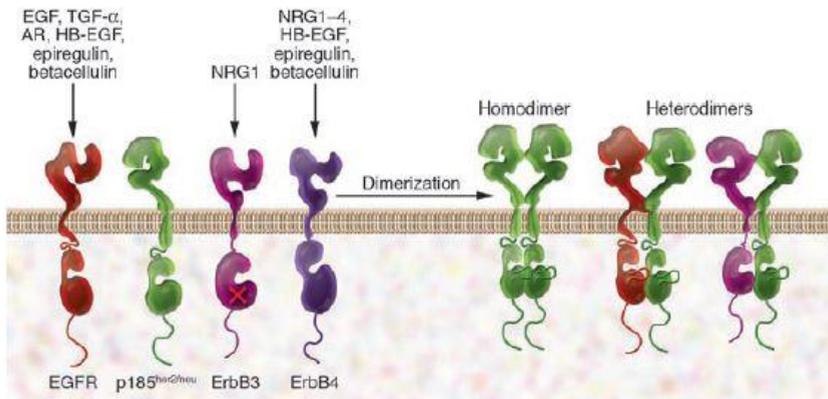


Figura 12: Famiglia dei recettori EGFR e elenco dei ligandi specifici per ciascun recettore (Zhang 2008).

I recettori della famiglia EGFR sono recettori transmembrana caratterizzati da una porzione extracellulare che riconosce ligandi specifici (EGF, molecole EGF-simili, neoregoline) ed una porzione intracellulare che invece è dotata di attività enzimatica, tirosinchinasica. I recettori sono nella loro forma inattiva quando si trovano isolati, in forma di monomeri: il legame di ligandi specifici alla porzione extracellulare del recettore provoca la dimerizzazione dei recettori stessi, a formare sia omodimeri che eterodimeri. È infatti la forma dimerica ad innescare l'attività enzimatica del recettore. In seguito ad attivazione, avviene la fosforilazione dei residui di tirosina della porzione C terminale intracellulare del recettore che a loro volta sono responsabili dell'attivazione di vie di trasmissione del segnale intracellulari. MAPK<sup>7</sup> e PI3K-AKT<sup>8</sup> sono le più importanti. L'effetto di questi pathway intracellulari è sempre una stimolazione della trascrizione di geni responsabili della crescita cellulare (Zhang, Berezov, et al., 2007). Le forme tumorali del

<sup>7</sup> Mitogen-Activated Protein Kinase

<sup>8</sup> Phosphoinositide 3-Kinase / protein kinase B

recettore, come Erb2, però possono andare incontro a dimerizzazione e quindi ad attivazione anche in assenza di ligandi esogeni: questo è dovuto alla particolare conformazione del recettore che si trova sempre nella sua forma *estesa* che è quella assunta dai recettori dopo attivazione ligando-mediata. È stato riscontrato che è sufficiente una leggera sovraespressione di Erb2 e EGFR per innescare una eterodimerizzazione responsabile di una aberrante trasduzione del segnale.

La trasduzione del segnale è interrotta in seguito ad endocitosi del complesso recettore-ligando, che può essere successivamente degradato oppure espresso nuovamente sulla membrana cellulare (Fig. 13)

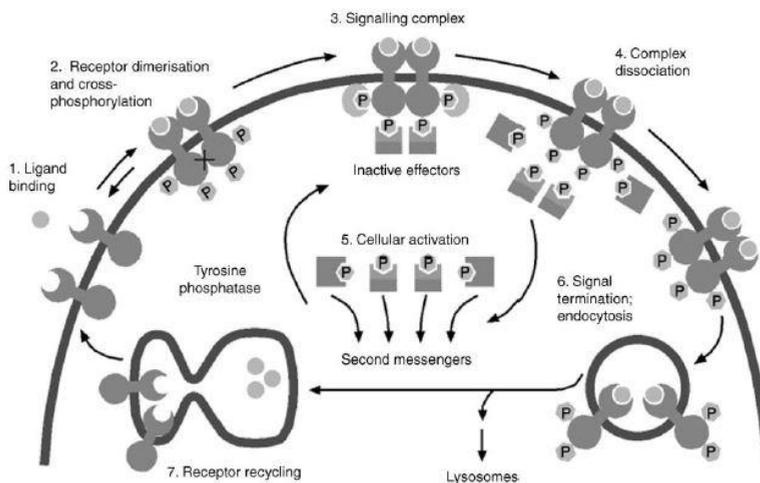


Figura 13: Descrizione del processo di attivazione/inattivazione dei recettori della famiglia EGFR (Yarden 2001).

Vista l'importanza che questi recettori hanno nello sviluppo di forme tumorali, essi rappresentano il bersaglio di numerose strategie terapeutiche, che si pongono come alternativa alla chemioterapia

tradizionale, soprattutto per quelle forme tumorali che si sono dimostrate refrattarie ad essa (*Rocha-Lima, Soares, et al., 2007*). Ad esempio anticorpi monoclonali umanizzati come Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, approvato da FDA nel 1998) riconoscono in maniera selettiva la porzione extracellulare del recettore Erb2 determinandone una *downregulation*. Esso è stato approvato nella pratica clinica in associazione con agenti chemioterapeutici di prima linea nel trattamento del tumore metastatico alla mammella, caratterizzato da una sovraespressione di Erb2. Inoltre, il trattamento con Trastuzumab si è dimostrato efficace nell'evitare recidive.

Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) invece è un anticorpo chimerico che funge da antagonista del ligando endogeno del recettore EGFR, inibendo così la trasduzione del segnale. Esso presenta anche attività inibitorie della angiogenesi e della mitosi cellulare in modo dose-dipendente. Cetuximab sembra essere coinvolto nella inibizione di una importante chinasi a livello nucleare (DNA-PK), responsabile della riparazione del danno a livello del DNA, per cui aumenta la sensibilità delle cellule tumorali ad altri agenti chemioterapeutici. Cetuximab è approvato per il trattamento del tumore al colon-retto e del carcinoma a cellule squamose localmente avanzato della testa e del collo.

Il problema dell'uso degli anticorpi monoclonali nel trattamento dei tumori è dovuto alla loro scarsa penetrazione nei tumori solidi e agli elevati costi di produzione. Per queste ragioni, frammenti di anticorpi monoclonali sono stati introdotti in terapia anche se il limite in questo caso è la ridotta affinità verso il recettore e la ridotta emivita; si preferisce usare questi frammenti

come agenti di *imaging* o di direzionamento di *drug delivery systems* piuttosto che come agenti terapeutici.

Un altro approccio terapeutico consiste nella inibizione dell'attività tirosinchinasica della porzione C terminale del recettore EGFR utilizzando molecole di piccola dimensione. Esistono due diversi approcci, quello di una inibizione reversibile esplicita da molecole che fungono da antagonisti dell'ATP nella fosforilazione dei residui di tirosina oppure una inibizione irreversibile dovuta alla alchilazione dei residui di tirosina. Uno dei vantaggi principali è la capacità di questi agenti terapeutici di riconoscere indistintamente i diversi recettori appartenenti alla famiglia EGFR, e di non agire selettivamente solo su una forma specifica del recettore. Erlotinib (Tarceva®) e Gefitinib (Iressa®) sono esempi di inibitori reversibili utilizzati nella pratica clinica. Ad esempio, Erlotinib è stato approvato in monoterapia per il trattamento del tumore al polmone non a piccole cellule. Essi agiscono inibendo la proliferazione cellulare e la neoangiogenesi e favorendo meccanismi di apoptosi. Il problema dell'uso degli inibitori reversibili dell'attività tirosinchinasica è lo sviluppo di forme resistenti del recettore causate da particolari mutazioni genetiche, per cui si osserva la perdita di efficacia del farmaco dopo un certo intervallo di tempo dal trattamento (ad esempio, la mutazione T790M; (Godin-Heymann, Lilkus, et al., 2008)). Per questi casi, è preferibile utilizzare gli inibitori irreversibili del recettore: nel 2013 la molecola Afatinib (Giotrif®) è stata approvata da FDA ed EMA per il trattamento in monoterapia del carcinoma polmonare non a

piccole cellule, per i pazienti naive<sup>9</sup> alla terapia con inibitori reversibili della tirosinchinasi (*EMA, FDA*).

Studi recenti dimostrano che EGFR svolge un ruolo anche in altre patologie non tumorali, comunque caratterizzate da una aberrante crescita cellulare. È il caso dell'artrite reumatoide.

L'artrite reumatoide è una patologia autoimmune caratterizzata dall'ispessimento del liquido sinoviale (formazione del pannus) e dalla distruzione della cartilagine e delle ossa a livello delle articolazioni (*Scott, Wolfe, et al., 2010*). Essa è mediata dall'infiltrazione di cellule del sistema immunitario all'interno della articolazione (cellule T, cellule B, cellule dendritiche e macrofagi), che innescano la produzione di citochine e auto-anticorpi. Per questo motivo, le pratiche cliniche attualmente si basano sull'utilizzo di molecole che agiscono inibendo la risposta del sistema immunitario (inibitori del TNF, rituximab e tocilizumab). Il problema di questo tipo di trattamento sono le complicazioni dovute ad una riduzione delle difese immunitarie, come l'insorgenza di infezioni (ad esempio, la tubercolosi). Oltre alle cellule del sistema immunitario, anche altri tipi di cellule (fibroblasti sinoviali, osteoclasti e cellule endoteliali) sembrano svolgere un ruolo fondamentale nella patogenesi di questa malattia. Infatti, la proliferazione dei fibroblasti sinoviali è responsabile della formazione del pannus e della produzione di chemochine che richiamano le cellule immunitarie all'interno dell'articolazione; gli osteoclasti determinano la degenerazione del tessuto osseo; le cellule endoteliali determinano la neo-angiogenesi che sostiene la crescita del pannus. Recentemente, si è

---

<sup>9</sup> Pazienti mai trattati con inibitori della tirosin chinasi

osservato che pazienti trattati con Cetuximab per il tumore alla testa e al collo hanno dimostrato una significativa riduzione dei sintomi associati all'artrite reumatoide (*Sullivan, Benjamin, et al., 2010*). Altri ancora, hanno dimostrato che l'utilizzo di un ligando che inibisce l'attività dei recettori EGFR porta ad una riduzione della patologia in topi con un modello di artrite reumatoide (*Gompels, Malik, et al., 2011*). In effetti, il pannus ha le tipiche caratteristiche di un tessuto tumorale: è caratterizzato da una rapida crescita, è invasivo ed esprime EGFR.

Nello specifico, Swanson et. al. (*Swanson, Akama-Garren, et al., 2012*) hanno dimostrato che EGFR è sovraespresso sia sui fibroblasti sinoviali che sulle cellule endoteliali, sia in pazienti affetti da artrite reumatoide che nel modello di patologia indotto del topo; inoltre, hanno osservato un aumento della concentrazione del ligando fisiologico EGF rispetto ai soggetti sani. Il trattamento dei topi con Erlotinib alle stesse dosi utilizzate nella pratica clinica hanno effettivamente determinato la riduzione della crescita del pannus, oltre alla riduzione della degradazione della cartilagine e dell'osso. Questo effetto è dovuto alla riduzione della proliferazione cellulare e alla riduzione della sintesi di citochine proinfiammatorie (VEGF, IL-8, ...) da parte dei fibroblasti sinoviali e alla riduzione del numero e della dimensione degli osteoclasti, secondo meccanismi differenti. Erlotinib determina anche la riduzione della proliferazione delle cellule endoteliali mediata da EGF, riducendo la neo-angiogenesi, e dell'espressione dell'enzima COX-2 sulle cellule endoteliali stesse.

Da questo studio si può intuire come i farmaci selettivi nei confronti del recettore EGFR possano essere utilizzati per il trattamento dell'artrite

reumatoide come sostituti dei farmaci immunosoppressori. In alternativa, l'elevata espressione di EGFR può essere sfruttata anche in questo caso, come bersaglio per indirizzare in maniera selettiva la cessione di molecole attive veicolate all'interno di *drug delivery systems*. In particolare, potrebbe rappresentare una buona strategia per la somministrazione sia locale che sistemica di farmaci antinfiammatori steroidei, al fine di ridurre gli effetti collaterali e aumentarne la permanenza *in situ* (Larsen, Ostergaard, et al., 2008).

La definizione di un bersaglio cellulare così specifico come è il recettore EGFR per molte forme di tumore solido e per l'artrite reumatoide, rappresenta il target di nanoparticelle intelligenti (*smart nanoparticles*) che, come già discusso, hanno l'obiettivo di migliorare il profilo terapeutico dei farmaci veicolati combinando un direccionamento passivo e un direccionamento attivo. L'obiettivo è quello di realizzare alternative terapeutiche più sicure ed efficaci rispetto alla classica chemioterapia.

In questo intento, gli anticorpi monoclonali, o frammenti di essi, sono stati utilizzati come agenti di direccionamento attivo di sistemi nanoparticellari veicolanti agenti chemioterapeutici (Liu, Li, et al., 2010), dimostrando un incremento nella captazione del farmaco a livello delle cellule tumorali e una persistenza dell'azione rispetto alle nanoparticelle non targettizzate, per le quali l'accumulo è dovuto solo al direccionamento passivo.

I peptidi rappresentano una valida alternativa agli anticorpi monoclonali come agenti di direccionamento attivo per la funzionalizzazione di *drug delivery systems*. Essi infatti presentano scarse proprietà immunogeniche,

hanno un'elevata penetrazione nel tessuto tumorale e possono essere facilmente sintetizzati e coniugati a diversi polimeri (Ruoslahti, 2012). Nonostante la ridotta affinità rispetto agli anticorpi monoclonali, l'elevata presenza dei peptidi sulla superficie delle nanoparticelle garantisce comunque un'elevata affinità al bersaglio. In generale, i peptidi vengono preferiti al ligando endogeno: EGF infatti viene difficilmente utilizzato come agente di direccionamento attivo poiché oltre a riconoscere il recettore ne stimola l'attivazione, innescando sia la crescita che la proliferazione cellulare, opponendosi e contrastando la terapia anti-tumorale. Per questa ragione, sono state prese in considerazione diverse strategie per individuare peptidi di piccola dimensione, caratterizzati da una buona affinità per EGFR.

GE11 (YHWYGYTPQNVI, PM 1540 g/mol, PI 7,67) è un dodecapeptide che ha manifestato un'ottima affinità nei confronti del recettore EGFR (Li, Zhao, et al., 2005), (Fig. 14).

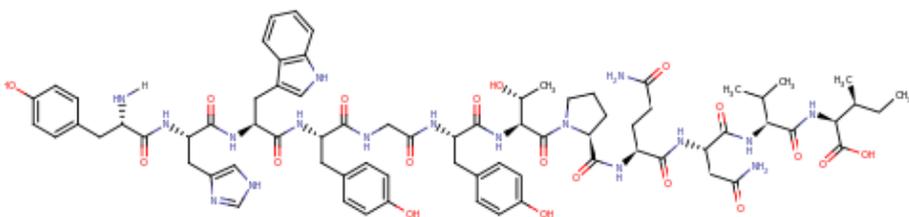


Figura 14: Struttura primaria del GE11.

Esso è stato scoperto da Li et al. mediante tecniche di *phage display*<sup>10</sup>. Il GE11 in effetti ha dimostrato un'affinità significativamente maggiore per il recettore EGFR (Kd= 22 nM) rispetto all'affinità nei confronti della BSA (Bovin Serum Albumin), utilizzata come controllo; all'aggiunta del ligando fisiologico EGF, si osserva uno spiazzamento del GE11 dal recettore, ulteriore conferma del *binding* selettivo del peptide al recettore. Grazie a questi studi è stato possibile intuire che il sito di legame del GE11 corrisponde ad una porzione all'interno del sito di legame del EGF. L'affinità del GE11 è inferiore rispetto all'affinità del ligando fisiologico EGF (Kd=1-2 nM) ma il GE11 non ha mostrato attività mitogeniche. Inoltre, le capacità di penetrazione di sistemi nanoparticellari funzionalizzati con GE11 all'interno di cellule con una sovraespressione di EGFR sono state confermate, anche in presenza di GE11 libero.

Dati in letteratura confermano che il GE11 rappresenta un ottimo agente di direccionamento attivo per il trattamento di forme tumorali quando utilizzato per la funzionalizzazione di sistemi nanoparticellari.

Master A. et al. (*Master, Qi, et al., 2012*) hanno realizzato micelle polimeriche a base di PEG-PCL veicolanti PC4, agente fotosensibile utilizzato per il trattamento dei tumori mediante terapia fotodinamica<sup>11</sup>; il GE11, modificato con una cisteina all'azoto terminale, è stato legato alle catene di PEG per ottenere micelle targettizzate capaci di riconoscere tumori caratterizzati da una sovraespressione di EGFR. Studi di uptake *in vitro* su

---

<sup>10</sup> Tecnica utilizzata per determinare l'interazione tra peptidi-peptidi, peptidi-DNA, ecc. Essa si basa sull'utilizzo di virus batteriofagi modificati geneticamente in modo a esprimere determinati peptide di cui si vuole indagare la affinità con un bersaglio.

<sup>11</sup> I tumori vengono trattati con agenti che colpiti da una luce nel vicino infrarosso liberano specie reattive dell'ossigeno che esplicano un effetto citotossico.

linee cellulari tumorali caratterizzate da una sovraespressione di EGFR dimostrano che le micelle polimeriche targettizzate con GE11 vengono captate più velocemente (già dopo 10 minuti) rispetto alle micelle non targettizzate poiché la presenza del peptide innesca un meccanismo di *uptake* attivo che coinvolge endocitosi mediata da ligando. Le nanoparticelle non targettizzate invece vengono captate secondo diffusione passiva, cioè con un meccanismo tempo dipendente: dopo 24 ore di incubazione infatti, il livello di *uptake* è del tutto simile per le micelle targettizzate e per quelle non targettizzate. Studi *in vivo* confermano il rapido *uptake* delle nanoparticelle targettizzate con GE11 rispetto alle nanoparticelle non targettizzate e dimostrano anche un effetto più prolungato nel tempo (fino a 5 giorni) (Master, Malamas, et al., 2013).

Milane L. et al. hanno utilizzato il GE11 per la funzionalizzazione di PEG-PLGA ottenendo così il coniugato GE11-PEG-PLGA. In questo caso, il peptide è stato modificato al C-terminale con una sequenza GGGGC, a sottolineare che le estremità del peptide non sono necessarie per esplicare la sua funzione. Il coniugato è stato utilizzato in miscela con il PCL per ottenere micelle polimeriche aventi un core idrofobico e un guscio esterno idrofilo costituito da PEG e GE11. Questi sistemi nanoparticellari caricati con lonidamina<sup>12</sup> e paclitaxel<sup>13</sup> hanno manifestato una buona selettività nei confronti di diverse linee cellulari caratterizzate da una sovraespressione di EGFR, dimostrando un rapido *uptake* soprattutto nei primi tempi di incubazione (15/ 30 minuti) rispetto alle nanoparticelle non targettizzate (Milane, Duan, et al., 2011). La stessa formulazione è stata somministrata a

---

<sup>12</sup> Inibitore della esochinasi mitocondriale 2 e manifesta attività pro-apoptotica e anti-glicolitica.

<sup>13</sup> Inibitore della mitosi per azione al livello della polimerizzazione/depimerizzazione dei microtubuli.

topi esprimenti un tumore caratterizzato da una sovraespressione di EGFR. Dal confronto dell'uptake delle nanoparticelle non targettizzate e di quelle targettizzate non si osserva una significativa differenza in termini di velocità di captazione e di persistenza dell'effetto (*Milane, Duan, et al., 2011*), (*Milane, Duan, et al., 2011*). Il problema potrebbe essere dovuto ad una scarsa presenza del GE11 sulla superficie delle nanoparticelle (20% delle formulazione); inoltre, le cellule utilizzate nel lavoro in questione non sono state caratterizzate per l'entità di sovraespressione di EGFR prima di condurre gli esperimenti. L'espressione di EGFR nelle diverse forme tumorali varia notevolmente in base al genotipo, rappresentando un'ulteriore elemento di variabilità per la captazione delle nanoparticelle. Resta comunque evidente come l'incapsulazione dell'attivo in sistemi nanoparticellari contribuisca a migliorare l'effetto terapeutico del farmaco e che la presenza di sistemi nanoparticellari targettizzati riduca la captazione nei tessuti non bersaglio.

Considerando lo stato dell'arte, è evidente come sia importante indagare in maniera più approfondita gli effetti di un direzionamento attivo rispetto ad un direzionamento passivo, che come sappiamo si basa sulla distribuzione delle nanoparticelle in base alla loro dimensione e stabilità nei fluidi biologici. Inoltre, un altro aspetto fondamentale è l'effettiva disponibilità del GE11 sulla superficie delle nanoparticelle.

A partire da questi risultati in letteratura, l'oggetto di questo progetto di ricerca è la realizzazione di sistemi nanoparticellari, costituiti prevalentemente da derivati del PLGA, e selettivi per EGFR. In particolare, le

nanoparticelle sono costituite da una miscela di PLGA funzionalizzato con GE11 con un polimero PEGilato (PEG-PLGA). Il PLGA è stato funzionalizzato al gruppo carbossilico terminale di ogni catena polimerica con il peptide GE11: l'obiettivo è quello di realizzare sistemi nanoparticellari con un'elevata presenza di GE11 in superficie. I sistemi così realizzati sono quindi caratterizzati da un core idrofobico all'interno del quale viene caricato l'attivo e un guscio esterno idrofilo rappresentato dal GE11 stesso e dalla presenza di PEG. Inoltre, si è indagato anche l'effetto del peptide idrofilo sulla superficie delle nanoparticelle come agente stabilizzante le nanoparticelle in sostituzione al PEG (*Romberg, Metselaar, et al., 2007*).



**Scopo del Lavoro**



## SCOPO DEL LAVORO

Il progetto di ricerca è volto alla realizzazione di sistemi nanoparticellari a base di derivati del PLA destinati al trattamento di patologie dell'osso. Le nanoparticelle sono pensate sia per una somministrazione sistemica per via endovenosa che per una somministrazione locale per via intra-articolare. Per quanto riguarda la somministrazione sistemica, le nanoparticelle realizzate devono raggiungere il bersaglio in maniera selettiva e rilasciare l'attivo principalmente nel tessuto di interesse. Le dimensioni devono essere opportune per non innescare la risposta immunitaria e favorire la clearance delle nanoparticelle prima di esplicare la loro funzione terapeutica. Le proprietà di un sistema per via intra-articolare sono differenti: le dimensioni possono essere maggiori ed è anche possibile ottenere delle forme di depot che garantiscano un rilascio prolungato e manifestino una stabilità per diversi giorni. Pertanto, durante il lavoro sperimentale le proprietà morfologiche e funzionali delle nanoparticelle sono state accuratamente definite, valutando e considerando i diversi requisiti delle due vie di somministrazione.

I materiali polimerici utilizzati per la realizzazione delle nanoparticelle sono stati un derivato sintetico del PLA (PCNL) e una forma bio-attiva del PLGA (GE11-PLGA).

Infatti, il progetto di ricerca è stato diviso in due parti.

Nella prima parte del lavoro (*Parte A – nanoparticelle a base di derivati da fonti rinnovabili del poli-lattide*) è stata indagata l'applicabilità del polimero PCNL nella realizzazione di sistemi nanoparticellari. Come già ampiamente

descritto, il polimero in esame è un polimero con un elevato peso molecolare, funzionalizzato con un segmento caratterizzato da una bassa Tg. Esso era già stato utilizzato nel gruppo di ricerca dove ho svolto il dottorato per la realizzazione di impianti per la rigenerazione ossea, grazie alle ottime proprietà meccaniche. L'obiettivo è quello di indagare l'efficacia del polimero anche nella realizzazione di sistemi nanoparticellari veicolanti farmaci modello. L'utilizzo di questo polimero potrebbe garantire una cessione più controllata e prolungata nel tempo grazie alla presenza del segmento a Tg sub-ambiente. Per cui, dopo avere definito le proprietà di citocompatibilità, fondamentali per l'applicazione parenterale, il polimero è stato utilizzato per realizzare nanoparticelle con diverse metodiche, successivamente caratterizzate in termini di morfologia (dimensione).

Nella seconda parte del lavoro il PLGA è stato funzionalizzato con un dodecapeptide (GE11) capace di riconoscere selettivamente il recettore EGFR (*Parte B – smart nanoparticles*). I sistemi nanoparticellari realizzati a partire da questo polimero funzionalizzato (GE11-PLGA) possono favorire il raggiungimento del bersaglio quando somministrati per via sistemica associando al *targeting* passivo un *targeting* attivo; invece, quando somministrati per via intra-articolare possono contribuire ad aumentare la permanenza *in situ* del farmaco veicolato, riducendo il numero di somministrazioni necessarie ad ottenere l'effetto terapeutico. Anche in questo caso, il polimero è stato sfruttato per realizzare nanoparticelle, anche in associazione ad un polimero PEGilato. La caratterizzazione morfologica è stata accompagnata ad una accurata caratterizzazione funzionale *in vitro* ed *ex-vivo*, soffermandosi sia sulla definizione della

stabilità in diverse condizioni sperimentali che sulle capacità di penetrare in cellule bersaglio. Infine, sono stati condotti studi di rilascio *in vitro* con un farmaco modello (Desametasone).



**Materiali**



## **MATERIALI**

Poli-(1,5-ciclooctadiene-co-5-norbornene-2-metanolo-*graft*-DL-lattide  
(PCNL)

Mw 659 kDa (PLA Mn 57kDa)

Rapporto ponderale: 95% D,L-Lattide; 5% 1,5-ciclooctadiene-co-5-norbornene-2-metanolo

Sintetizzato presso il laboratorio del prof. Hillmayer

Poli-lattide 100 DL7E (PLA)

Mw 124 kDa, Mn 77-80 kDa

Lakeshore Biomaterials – Surmodics Pharmaceuticals, Birmingham, AL

Poli-(D,L-lattide-co-glicolide) (PLGA) 7525 DLG 3A

Mw 35 kDa

Rapporto ponderale: D,L-Lattide 75 mole %; Glicolide 25 mole %

Lakeshore Biomaterials – Surmodics Pharmaceuticals, Birmingham, AL

Poli-(lattide-co-glicolide)-*block*-poli(etileneglicole)-*block*-poli(lattide-co-glicolide) (PEG-PLGA) 7G525 DLG 3C PEG 6000

Mw 36 kDa

Rapporto ponderale: D,L-Lattide 28 mole %; Glicolide 12 mole %;

Polietilenglicole 60 mole %

Lakeshore Biomaterials – Surmodics Pharmaceuticals, Birmingham, AL

GE11 sintetizzato a partire da tirosina, istidina, triptofano, tirosina, glicina, tirosina, treonina, prolina, glutammina, asparagina, valina, isoleucina secondo la sequenza primaria. Tutti gli amminoacidi sono protetti mediante strategia Fmoc/ tBu (Fluka Analytical, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

FQPV (peptide modello)

Fenilalanina-glutamina-prolina-valina

Sintetizzato nel laboratorio della prof.ssa Giovanna Speranza, dipartimento di Chimica, Università di Milano.

Desametasone (DXM)

Mw 392,46 g/mol

Fluka Analytical, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Colture primarie di Fibroblasti Umani adulti del derma

International PBI, Milano (Italia)

Colture primarie di cellule dell'endotelio della vena ombelicale umana (HUVEC)

International PBI, Milano (Italia)

Colture primarie di carcinoma polmonare umano (A549)

International PBI, Milano (Italia)

Colture primarie di carcinoma renale umano (Caki-1)

International PBI , Milano (Italia)

Culture primarie di monociti umani (Jaws II)

International PBI, Milano (Italia)

Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM)

pH7,4

Lonza (Italia)

Fetal Bovine Serum (FBS)

EuroClone (Italia)

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)

Gibco, Life Technologies, USA

FACS buffer (PBS, 1% FBS, 0,09%  $\text{NaN}_3$ )

Gibco, Life Technologies, USA

Bromuro di (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolo (MTT)

PM 414,33

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio (MTS)

CellTiter 96, Aqueous One solution, cell proliferation assay

Promega, USA

Anticorpo anti-EGFR, marcato con FITC

Ab11400

Abcam, UK

Paraformaldeide (PFA)

PM 30.03

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

HOECHST stain solution

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Resina 2-clorotetil cloruro

100-200 Mesh

1% DVB Divinil benzene

Grado di sostituzione 1,5 mmol/g

N,N-Diisopropiletilenammina (DIPEA)

Mw 129,24 g/mol

Fluka Analytical, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Idrossibenzotriazolo (HBOt)

Mw 132,12 g/mol

O-Benzotriazolo-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-esafluoro-fosfato (HBTU)

Mw 379,4 g/mol

Fluka Analytical, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimmide HCl (EDC)

Mw 155,24 g/mol

Fluka Analytical, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

N-I-drossisuccinimide (NHS)

$C_4H_5NO_3$

Mw 115,09 g/mol

Fluka Analytical, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

N, N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC)

PM 206,33

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

4- (dimetilamino)piridina (DMAP)

PM 122.17

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Acido ε amminocaproico

PM 131.17

Sigma Aldrich

Polivinil alcool (PVA)



87-89% idrolizzato

Mw 85000 - 120000 Da

Aldrich Chemistry, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Sodio cloruro (NaCl)

Carlo Erba Reagents, Milano, Italia

5,6-carbossifluoresceina

PM 376,32

$\lambda_{\text{ex}}$  492 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  517 nm

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Rodamina B

PM 479,01

$\lambda_{\text{ex}}$  554 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  627 nm

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Soluzione tampone pH 7,4 (FU Europea 8.0)

0,6 g potassio diidrogeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

6,4 g disodio idrogeno fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

5,85 g sodio cloruro (NaCl)

In 100 ml acqua bidistillata filtrata 0,22  $\mu\text{m}$

pH finale = 7,58

Soluzione tampone pH 5,0 (FU Europea 8.0)

13,6 g sodio acetato ( $C_2H_3NaO_2$ )

6 ml acido acetico glaciale ( $CH_3COOH$ )

In 100 ml acqua bidistillata e filtrata 0,22  $\mu m$

pH finale = 5,0

HEPES BUFFER

2,38 g HEPES in 100 ml acqua bidistillata e filtrata 0,22  $\mu m$ , pH 7,5

2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES)

PM 238,2

Intervallo di pH: 6,8-8,2

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

MES Buffer

97.6 g MES in 800 mL di acqua bidistillata e filtrata 0,22  $\mu m$

2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, 4-Morpholineethanesulfonic acid

PM 195,24

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Miscela costituita da TFA/Anisolo/ $H_2O$ /Tips (89/5/5/1)

Acetone

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Acetonitrile (ACN) per HPLC

Carlo Erba Reagents, Milano, Italia

Diclorometano

Carlo Erba Reagents, Milano, Italia

N,N-dimetilformamide (DMF)

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Dimetilsolfossido (DMSO)

Carlo Erba Reagents, Milano, Italia

Etanolo (EtOH)

Carlo Erba Reagents, Milano, Italia

Etilacetato

Carlo Erba Reagents, Milano, Italia

Metanolo (MeOH) per HPLC

Carlo Erba Reagents, Milano, Italia

TFA

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Acqua bidistillata e filtrata su filtro 0,22  $\mu\text{m}$

Filtro 0,22  $\mu\text{m}$  Millipore Membrane Filters, Millipore Corporation, Massachusset, USA

I campioni di Plasma Umano sono stati prelevati da volontari sani mentre i campioni di Liquido Sinoviale Umano sono stati prelevati da pazienti affetti da artrite indifferenziata; i campioni sono stati raccolti all'ospedale universitario di Gent (Belgio).

Dove non specificato, tutti i reagenti e solventi sono di grado analitico.



**Parte A**

**Nanoparticelle a base di derivati da fonti rinnovabili del Poli-lattide**



## 1 METODI

### 1.1. Test di citotossicità del polimero PCNL

Il polimero PCNL, sintetizzato presso il laboratorio del prof. Hillmyer, è stato inizialmente sottoposto ad un test di vitalità cellulare al fine di valutare la potenziale citotossicità del polimero, caratteristica fondamentale affinché possa essere utilizzato in campo biomedico come matrice per la realizzazione di *drug delivery systems*.

Il test utilizzato è l'MTT test, scelto comunemente per valutare *in vitro* il numero di cellule metabolicamente attive. Infatti si tratta di un test colorimetrico standard che valuta l'attività di enzimi mitocondriali (deidrogenasi) che riducono i sali di tetrazolio, come l'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro), a formazano: con questa reazione si verifica il passaggio dalla colorazione gialla del MTT in soluzione acquosa ad una colorazione viola intensa dovuta ai cristalli di formazano, insolubili in acqua. I depositi di formazano all'interno dei mitocondri vengono estratti e solubilizzati con un opportuno solvente: l'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi indice della vitalità cellulare.

Il test di vitalità cellulare è stato condotto su diversi campioni: sia sul polimero come tale, sospeso nel mezzo di coltura a diverse concentrazioni (da 0,01875 a 0,6 mg/ 100 µl), sia su film polimerici (corrispondenti ad una quantità di polimero compresa tra 0,84 e 3,18 mg/ 100 µl di mezzo di coltura).

I film sono stati scelti come esempio di “formulazione semplice” per la cui realizzazione, attraverso la tecnica di *solvent casting* (Morales and McConville, 2011), si prevedeva comunque la solubilizzazione del polimero in solvente organico e la sua successiva evaporazione: essi sono stati utilizzati come controllo, rispetto al polimero come tale, per verificare in che modo il processo produttivo per la realizzazione di *drug delivery systems* polimerici potesse influenzare la citocompatibilità del sistema polimerico stesso.

Secondo il protocollo per la preparazione dei film, il polimero PCNL è stato solubilizzato in cloruro di metilene ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), fino ad ottenere una soluzione pari a 3,125% p/v. La soluzione polimerica è stata poi distribuita sulla superficie di dischi di teflon; i film polimerici omogenei sono stati ottenuti per evaporazione del solvente (12 h a 25°C).

Il test di vitalità cellulare è stato condotto su colture cellulari di fibroblasti umani. In particolare, 10000 cellule per ciascun pozzetto di una multiwell sono state incubate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionato di siero fetale bovino (FBS) per 24 h a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Successivamente il mezzo di ciascun pozzetto è stato sostituito da 100  $\mu\text{l}$  di sospensione polimerica o di film in DMEM. Dopo 48 h, 25  $\mu\text{l}$  della soluzione di MTT (5mg/ml) sono stati aggiunti per ogni pozzetto. Le cellule sono state incubate per 2 h per permettere la reazione tra MTT e le deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali. A questo punto, il mezzo di coltura contenente i campioni da analizzare è stato rimosso e i cristalli di formazano sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO). Si sono ottenute così delle soluzioni viola la cui intensità è stata letta mediante

spettrofotometro a 595 nm. Come controllo positivo, un pozzetto con la medesima quantità di cellule è stato trattato come descritto per gli altri pozzetti ma senza aggiungere il campione da analizzare (polimero in sospensione o film). La percentuale di cellule vitali per ogni pozzetto è stata calcolata come percentuale rispetto alla quantità di cellule del controllo.

### 1.1.1 Effetto della Sterilizzazione ai raggi gamma sulla citocompatibilità dei film a base del polimero PCNL

Considerando che i sistemi nanoparticellari obiettivo del lavoro di ricerca sono destinati ad una somministrazione parenterale, è necessario valutare anche il comportamento del polimero alla sterilizzazione. Per questo motivo, film polimerici a base di PCNL sono stati sottoposti a sterilizzazione mediante raggi gamma al fine di valutare il comportamento del polimero a questo tipo di trattamento.

La sterilizzazione mediante raggi gamma viene utilizzata come metodo di sterilizzazione terminale per quei prodotti finiti che risultano essere sensibili al calore e al vapore saturo, per cui non possono essere sterilizzati mediante autoclave (*Gogolewski and MainilVarlet, 1997*). Il poli-lattide e i suoi derivati rappresentano un esempio di polimeri la cui struttura viene danneggiata dalla sterilizzazione con vapore saturo, poiché le condizioni di umidità e temperatura catalizzano l'idrolisi del legame estereo e quindi la rottura della catena polimerica (*Fernandez-Carballido, Puebla, et al., 2006*); (*Montanari, Cilurzo, et al., 2002*).

I film polimerici (utilizzati come modello di formulazione semplice da realizzare) sono stati sottoposti a sterilizzazione mediante raggi gamma usando come sorgente  $^{60}\text{Co}$ , ad una velocità di irraggiamento di 1,3 kGy/ h fino a 25 kGy, dose raccomandata dalla Farmacopea (*capitolo 5.1.1. Metodi di preparazione di prodotti sterili, Farmacopea Ufficiale Italiana XXII edizione*). I campioni sono stati sterilizzati all'interno di vial di vetro ambrati sotto vuoto, per evitare che la luce e la presenza di ossigeno potessero stimolare la formazione di radicali dell'ossigeno e di conseguenza portare alla rottura delle catene polimeriche.

I sistemi polimerici sterilizzati sono stati sottoposti successivamente a MTT test per valutarne la citocompatibilità, seguendo il protocollo descritto per i film non irraggiati.

## **1.2 Preparazione dei sistemi nanoparticellari**

In una fase successiva, il polimero PCNL è stato utilizzato per la realizzazione di sistemi nanoparticellari. L'obiettivo della ricerca è quello di realizzare nanoparticelle destinate sia ad una somministrazione sistemica che ad una somministrazione all'interno dell'articolazione per il trattamento di patologie ossee di diversa natura. Per quanto riguarda la somministrazione intra-articolare, le dimensioni delle nanoparticelle devono essere tali da evitare la fuoriuscita delle nanoparticelle stesse dalla capsula sinoviale e da minimizzare fenomeni infiammatori dovuti all'accumulo di nanoparticelle di dimensioni troppo elevate (*Laroui, Grossin, et al., 2007*); (*Zille, Paquet, et al., 2010*); (*Horisawa, Hirota, et al., 2002*). Per

queste ragioni, l'ottimizzazione del protocollo di preparazione si è basata sulla caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle stesse e si è posta come obiettivo un massimo di 250 nm di diametro per la somministrazione sistemica e 300-700 nm di diametro per la somministrazione intra-articolare.

L'ottimizzazione del protocollo di preparazione delle nanoparticelle è stato condotto sul poli-lattide 100 DL7E (Mw 124 kDa, Mn 77-80 kDa, Lakeshore Biomaterials – Surmodics Pharmaceuticals, Birmingham, AL) utilizzato come modello dato il peso molecolare paragonabile al PLA utilizzato nel polimero funzionalizzato.

Sono stati utilizzati due diversi metodi per la realizzazione delle nanoparticelle: la tecnica della nanoprecipitazione (*Bilati, Allemann, et al., 2005*) e la tecnica dell'emulsione singola (tecnica dell'evaporazione/estrazione del solvente) (*Javadzadeh, Ahadi, et al., 2010*).

### 1.2.1 Preparazione delle nanoparticelle di PLA mediante tecnica della nanoprecipitazione

Secondo la tecnica della nanoprecipitazione, le nanoparticelle vengono preparate gocciolando la soluzione polimerica all'interno di un non-solvente, ovvero un solvente in cui il polimero non è solubile. Solvente e non-solvente devono essere miscibili tra loro in modo che, non appena la soluzione polimerica entra in contatto con il non-solvente, il solvente

diffonde attraverso la matrice polimerica facendo precipitare le nanoparticelle.

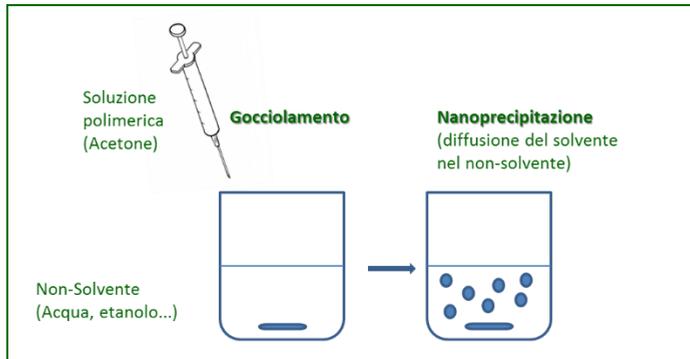


Figura 15: Schema esplicativo delle fasi di realizzazione delle nanoparticelle attraverso la tecnica della nanoprécipitazione.

Per la realizzazione delle nanoparticelle, il polimero è stato solubilizzato in acetone ottenendo soluzioni a diversa concentrazione (5 o 10 mg/ml). La soluzione polimerica è stata gocciolata sotto agitazione all'interno del non-solvente, costituito da acqua con un tensioattivo opportuno (PVA) oppure da etanolo. Le nanoparticelle così formate sono state lasciate sotto agitazione per 4 ore (*curing*) per poi essere recuperate mediante centrifugazione a 5°C per 20 minuti a 16400 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Amburgo, Germania). Le nanoparticelle sono state successivamente lavate con acqua bidistillata per eliminare il PVA in eccesso e liofilizzate per eliminare i residui di solventi organici.

I parametri di processo che sono stati presi in considerazione ed ottimizzati sono stati:

- la concentrazione polimerica (5 mg/ml; 10 mg/ml);

- la scelta del non-solvente opportuno (acqua e PVA; etanolo);
- la concentrazione di PVA (0.5%; 1%);
- la velocità di agitazione durante il gocciolamento (6500 rpm; 9500 rpm).

Sono stati preparati differenti lotti di nanoparticelle andando a variare i parametri di processo elencati. Le dimensioni delle nanoparticelle sono state valutate mediante Dynamic Light Scattering (Zeta Potential/ Particle Sizer NICOMP 380 ZLS, PSS Nicomp Particle Sizing Systems, Santa Barbara, California, USA) al termine del tempo di *curing*.

I parametri di processo ottimali sono stati selezionati in base ai risultati dell'analisi dimensionale.

### 1.2.2 Preparazione delle nanoparticelle di PLA mediante la tecnica dell'emulsione semplice

Secondo la tecnica dell'emulsione semplice, il polimero viene solubilizzato in opportuno solvente e successivamente gocciolato all'interno di un solvente immiscibile con il solvente della soluzione polimerica. Si viene a formare così un'emulsione semplice. Le nanoparticelle vengono a formarsi per allontanamento del solvente per evaporazione o per estrazione in seguito all'aggiunta di un solvente miscibile ad esso.

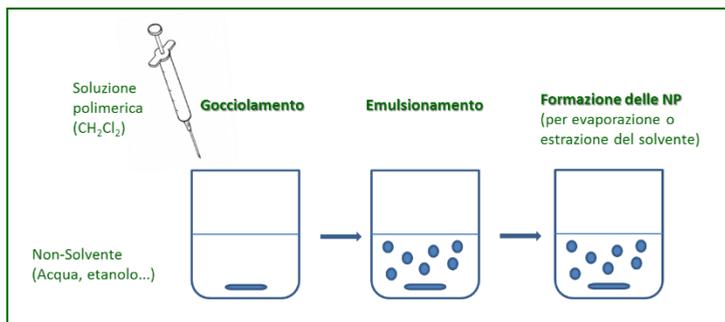


Figura 16: Schema esplicativo delle fasi di realizzazione delle nanoparticelle secondo la tecnica dell'emulsione.

In questo caso specifico, il polimero è stato solubilizzato in una miscela di cloruro di metilene ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e acetone, in rapporto 1:1, per ottenere la soluzione polimerica con la concentrazione desiderata. La miscelazione di questi due solventi rende la metodica “ibrida” piuttosto che una semplice evaporazione. La soluzione polimerica è stata successivamente gocciolata all'interno di una soluzione acquosa di PVA, 1% p/v. L'emulsione è stata mantenuta sotto agitazione mediante omogenizzatore ad elevata velocità (Ultra-turrax) per tutto il tempo del gocciolamento. L'emulsione così ottenuta è stata lasciata a temperatura ambiente per tutta la notte per permettere l'evaporazione del solvente organico. Le nanoparticelle sono state recuperate mediante centrifugazione a 16400 rpm, 5°C, per 20 minuti e lavate con acqua bidistillata per eliminare i residui di PVA. Infine le nanoparticelle sono state liofilizzate.

### 1.2.3 Preparazione delle nanoparticelle con PCNL

I lotti con il polimero PCNL sono stati realizzati seguendo le condizioni di processo selezionate con il polimero PLA non funzionalizzato, come spiegato in seguito (paragrafo 2.2.2, Risultati, Parte A).

### **1.3 Valutazione del diametro della nanoparticelle mediante *dynamic light scattering***

Il diametro delle nanoparticelle rappresenta la principale caratteristica da definire per poter considerare un lotto di nanoparticelle adatto o no agli obiettivi di somministrazione previsti.

Le dimensioni delle nanoparticelle sono state analizzate grazie all'apparecchiatura NICOMP 380 ZLS (Particle Sizing Systems, CA, USA), uno strumento che caratterizza la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle in sospensione, il cui principio di funzionamento si basa sulla diffusione dinamica della luce (DLS "Dinamic Light Scattering"). La luce proveniente da un laser converge su una cuvette in plastica contenente la sospensione di nanoparticelle: ciascuna particella, colpita dal laser incidente, determina una diffusione della luce. La luce incidente può essere pensata come costituita da un campo elettrico oscillante molto rapido. L'arrivo di questo campo in prossimità di una particella genera un'oscillazione di pari frequenza in tutti gli elettroni liberi di essere influenzati (elettroni polarizzabili). Tali elettroni promuovono, a loro volta, un campo elettrico oscillante che irraggia in ogni direzione, creando

un'onda di luce diffusa (DLS). Le particelle più piccole mostrano un'intensità di segnale più rapida delle particelle di dimensioni maggiori, la cui diffusione e variazione di intensità è più lenta. Quindi, l'intensità della luce emessa da ogni singola particella dipende dal corrispondente peso molecolare, dalle dimensioni, dalla forma e dalla differenza dell'indice di rifrazione rispetto al solvente circostante. L'intensità della luce diffusa viene convertita in dimensione dallo strumento, in base anche alla viscosità del mezzo in cui viene effettuata la misura.

Le analisi sulle nanoparticelle sono state effettuate risospingendole in acqua bidistillata e filtrata.

## 2. RISULTATI

### 2.1. Citocompatibilità del polimero PCNL

Come possiamo osservare dall'istogramma in Figura 17, il polimero dimostra un'ottima citocompatibilità e scarsa citotossicità, in quanto i valori di crescita cellulare superano l' $88,53 \pm 8,24\%$  per tutte le concentrazioni testate, rispetto al controllo, rappresentato del primo blocco a sinistra.

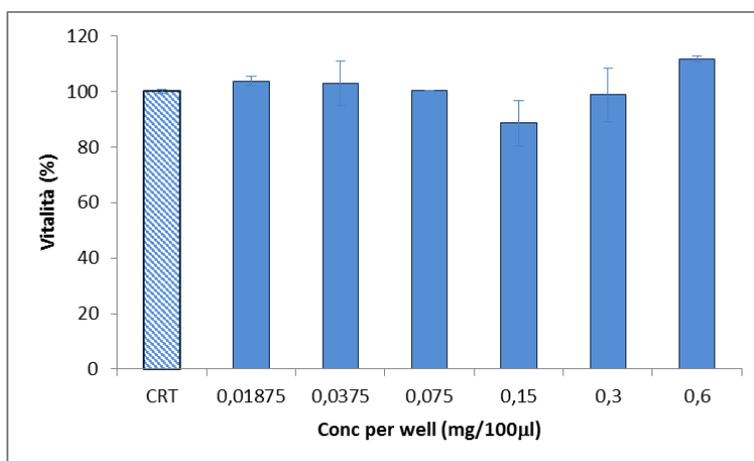


Figura 17: Risultati del test di vitalità cellulare condotti sulla sospensione di polimero in DMEM senza siero, incubati per 48 h.

Risultati analoghi si verificano nel caso del polimero formulato sotto forma di film (Fig. 18) dove la crescita cellulare supera sempre il  $75,31 \pm 7,07\%$  rispetto al controllo, per tutte le concentrazioni considerate.

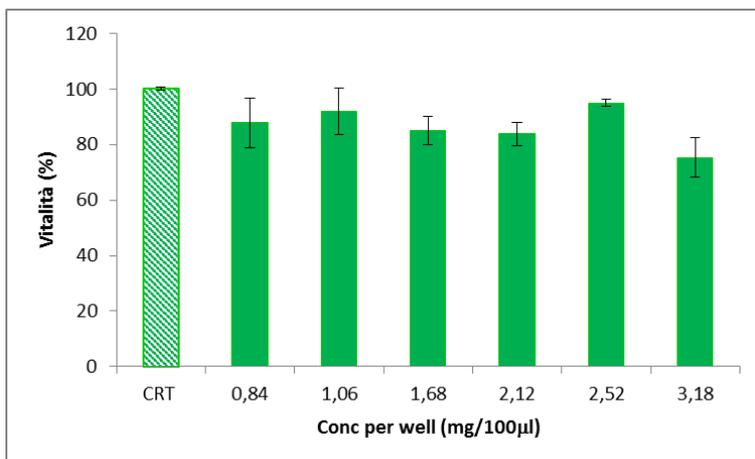


Figura 18: Risultati del test di vitalità cellulare condotti su film polimerici idratati con DMEM s/S, incubati per 48 h.

Il test di vitalità cellulare è stato ripetuto anche su campioni di film polimerici sottoposti a sterilizzazione mediante raggi gamma.

In Figura 19, è possibile osservare come la sterilizzazione del film polimerico abbia aumentato significativamente la crescita cellulare, come se il film sterilizzato si comportasse da substrato migliore per la crescita e la proliferazione delle cellule. Alla luce di questi risultati, il polimero PCNL può essere considerato come un polimero citocompatibile e quindi potenzialmente utile per la realizzazione di nanoparticelle da impiegare in ambito medico.

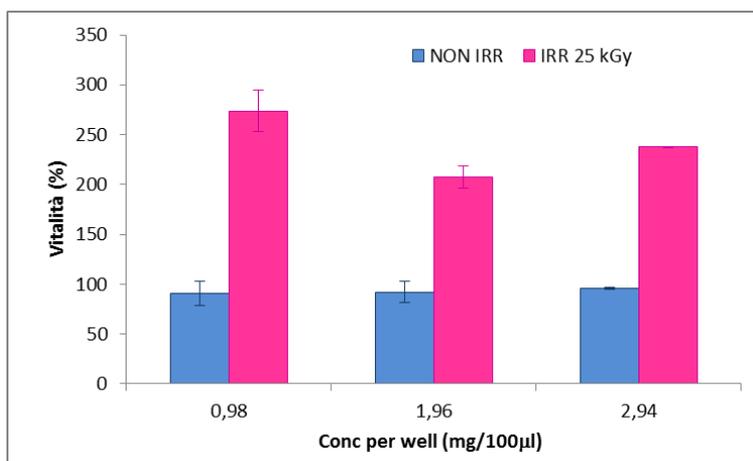


Figura 19: Confronto dei risultati del test di vitalità cellulare ottenuti con il film polimerico non irradiati (blu) e irradiati (rosa) mediante raggi gamma.

## 2.2. Realizzazione dei sistemi nanoparticellari

### 2.2.1 Ottimizzazione del protocollo di preparazione delle nanoparticelle con il polimero PLA

#### Tecnica della nanoprecipitazione

Come descritto in precedenza, la tecnica della nanoprecipitazione prevede la solubilizzazione del polimero in un solvente miscibile con il solvente utilizzato come fase esterna al momento del gocciolamento della soluzione polimerica. I risultati delle analisi dimensionali condotte al termine del tempo di *curing* (4 ore) sui lotti più significativi sono riportati in Tabella I.

Tabella I: Analisi dimensionale dei lotti di nanoparticelle ottenuti mediante nanoprecipitazione e relativi parametri di processo.

#	Conc. Polim. (mg/ml)	Solv.	Non-Solvente	Conc. PVA (% w/v)	Velocità di agitazione (rpm)	Dim.* (nm±ds)
1	5	Acetone	Acqua + PVA	0.5	6500	524,4±41,0
2	5	Acetone	Acqua + PVA	0.5	9500	771,7±129,0
3	5	Acetone	Acqua + PVA	1	9500	1620,1±94,2
4	5	Acetone	Acqua + PVA	1	9500	490,4±71,9
5	5	Acetone	Acqua + PVA	1	9500	1602,3±105,5
6	5	Acetone	Acqua + PVA	1	6500	495,2±105,4
7	5	Acetone	Acqua + PVA	1	6500	476,1±41,3
8	5	Acetone	Acqua + PVA	1	6500	407,1±50,9
9	10	Acetone	Acqua + PVA	1	6500	876,5±40,9
10	10	Acetone	Acqua + PVA	1	9500	609,1±48,8
11	5	Acetone	Etanolo	-	9500	1054,5±178,4
12	5	Acetone	Etanolo	-	6500	625,4±40,7

\* Nicomp

I lotti sono stati preparati inizialmente utilizzando una soluzione di polimero in acetone pari a 5 mg/ml e gocciolati all'interno della soluzione di PVA allo 0,5% p/v in acqua (lotti #1 e #2). Il rapporto tra la soluzione polimerica e la soluzione di PVA è stato mantenuto a 1:25 v:v.

Sono state considerate due diverse velocità del sistema di agitazione (Ultraturrax T10, Ika, Germania), 6500 e 9500 rpm rispettivamente per il lotto #1

e per il lotto #2: come possiamo osservare dai risultati riportati in Tabella I, l'aumento della velocità di agitazione ha causato un aumento delle dimensioni delle nanoparticelle e una maggiore disomogeneità nel lotto #2 rispetto al lotto #1, come evidenziato dai valori di deviazione standard. L'elevata distribuzione dimensionale, correlata ad un elevato indice di polidispersità ( $PI > 1$ ), è tale per cui i lotti di nanoparticelle non possono essere descritti con accuratezza da una distribuzione gaussiana, ma è necessario ricorrere all'algoritmo NICOMP, tipico dello strumento utilizzato. Tutti i lotti descritti sono caratterizzati secondo questa metodica.

Per stabilizzare maggiormente le nanoparticelle e ridurre la distribuzione dimensionale, si è deciso di aumentare la concentrazione del tensioattivo, fino all'1% p/v di PVA: elevate velocità di agitazione causano comunque una maggiore disomogeneità nei lotti di nanoparticelle (lotti #3, #4 e #5) e una scarsa riproducibilità. Mantenendo la velocità di agitazione a valori più bassi (6500 rpm) è possibile ottenere nanoparticelle con dimensioni migliori e una buona riproducibilità (lotti #6, #7 e #8).

Come possiamo osservare per i lotti #9 e #10, l'aumento della concentrazione della soluzione polimerica non contribuisce a migliorare la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle.

I lotti #11 e #12 sono stati preparati utilizzando come non-solvente l'etanolo al posto della soluzione acquosa di PVA. Come possiamo osservare dai dati in Tabella I, la presenza di etanolo come fase esterna conferma i risultati ottenuti con acqua e PVA, senza apportare significativi miglioramenti nelle dimensioni delle nanoparticelle.

Per cui i risultati migliori si sono ottenuti utilizzando una soluzione polimerica con una concentrazione di 5 mg/ml, utilizzando una soluzione di PVA al 1% come fase esterna e una velocità di 6500 rpm durante la fase di gocciolamento.

Di seguito un riassunto delle fasi di processo ottimizzate con la tecnica della nanoprecipitazione:

- *Solubilizzare il polimero in 1 ml di acetone alla concentrazione di 5 mg/ml;*
- *Gocciolare la soluzione polimerica in 25 ml di PVA 1% p/v, mantenendo il sistema sotto agitazione con ultraturrax per 10 minuti a 6500 rpm;*
- *Trasferire le nanoparticelle in sospensione in un becher e lasciarle sotto agitazione magnetica a 700 rpm per stabilizzarsi per 4 ore.*

#### Tecnica dell'emulsione semplice

La tecnica dell'emulsione semplice invece utilizza come solvente per il polimero un solvente non miscibile nella fase esterna utilizzata; nel nostro caso il solvente selezionato è il  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La tecnica qui presentata prevede anche l'uso di un ulteriore solvente (acetone) per ridurre le dimensioni delle nanoparticelle, realizzando così una metodica ibrida.

Tabella II: Analisi dimensionale dei lotti di nanoparticelle ottenuti mediante la tecnica dell'emulsione semplice e relativi parametri di processo.

#	Conc. Polim. (mg/ml)	Conc PVA (% w/v)	Solv.	Agitazione		Ago	Dim.* (nm±ds)
				Velocità (rpm)	Strumento		
13	5	1	Acetone: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6500	Ultra-turrax	cannula	1606,5±103,0
14	5	1	Acetone: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6500	Ultra-turrax	25 G	887,6±29,7
15	5	1	Acetone: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6500	Ultra-turrax	30 G	1343,6±102,7
16	5	1	Acetone: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5000	Silverson	25 G	742,8±40,2
17	5	1	Acetone: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2500	Silverson	25 G	625,4±40,7

\* Nicomp

Come possiamo osservare dai risultati riportati in Tabella II, il primo lotto è stato preparato utilizzando la concentrazione polimerica (5 mg/ml), la velocità di agitazione (6500 rpm) con ultra-turrax e la concentrazione di PVA settati con il metodo precedente. Ma con questa metodica i risultati non sono stati molto incoraggianti, come possiamo osservare dalle dimensioni del lotto #13. L'ottimizzazione del processo produttivo ha

riguardato il controllo della fase di gocciolamento sostituendo la cannula con aghi di dimensioni inferiori e utilizzando un altro strumento di agitazione (Silverson modello SL2T, Silverson Machines Inc., Waterside, Chesham, Inghilterra).

I risultati migliori si sono ottenuti con il lotto #17 realizzato con un ago da 25 G e la velocità di agitazione inferiore (2500 rpm) utilizzando il sistema di agitazione Silverson. Però, con la metodica della emulsione semplice non si è riusciti ad ottenere le nanoparticelle di dimensioni inferiori rispetto alla metodica descritta precedentemente (nanoprecipitazione). Per questo motivo, la tecnica è stata scartata.

#### 2.2.2. Nanoparticelle a base del polimero PCNL

I lotti di nano particelle a base del polimero PCNL sono stati realizzati inizialmente mediante la tecnica della nanoprecipitazione, utilizzando le condizioni di processo settate per i lotti realizzati con il poli-lattide (capitolo 2.2.1, Risultati, Parte A). In particolare le condizioni di processo sono state:

- Concentrazione polimerica: 5 mg/ml;
- Solvente: acetone;
- Non-solvente: soluzione acquosa 1% di PVA;
- Velocità di agitazione: 6500 rpm (Ultra-Turrax).

In Tabella III sono riportati i risultati dell'analisi dimensionale condotta sui lotti di nanoparticelle realizzati con PCNL.

Tabella III: Analisi dimensionale dei lotti di nanoparticelle realizzate con il polimero PCNL.

#	Conc. Polim. (mg/ml)	Solvente	Non-Solvente	Conc. PVA (% w/v)	Velocità di agitazione (rpm)	Dim. (nm±ds)
18	5	Acetone	Acqua + PVA	1	6500	598,5±678,1
19	5	Acetone	Acqua + PVA	1	9500	685,5±763,2
20	5	Acetone	Acqua + PVA	1	13500	693,1±563,8
21	10	Acetone	Acqua + PVA	1	6500	443,9±631,7

Come possiamo osservare dai risultati in Tabella III, le condizioni di processo settate per i lotti di poli-lattide non si sono dimostrate adatte alla realizzazione di nanoparticelle con PCNL delle dimensioni desiderate (lotto #18).

Altre condizioni di processo sono state prese in considerazione per migliorare la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle: sono state utilizzate diverse velocità di agitazione (9500 e 13500 rpm) e diverse concentrazioni della soluzione polimerica di partenza (5 e 10 mg/ml). I risultati non sono stati ottimali: l'aumento della velocità di agitazione ha contribuito all'aumento della dimensione delle nanoparticelle (lotti #19 e #20), mentre l'utilizzo di una concentrazione polimerica maggiore (10 mg/ml) ha ridotto la dimensione dei lotti ma non in maniera significativa. Le nanoparticelle ottenute hanno dimostrato una dimensione elevata e un'ampia distribuzione dimensionale tale per cui non è possibile utilizzarle per gli obiettivi proposti, ovvero per la somministrazione intra articolare e

sistemica. Il problema potrebbe essere dovuto all'elevato peso molecolare del copolimero e della porzione gommosa con cui è stato funzionalizzato il poli-lattide.

La tecnica dell'emulsione semplice con evaporazione del solvente non è stata considerata a causa dell'elevata dimensione delle nanoparticelle ottenuta già con i lotti di solo PLA.

La messa a punto del metodo di preparazione per le nanoparticelle a base di PCNL richiederebbe la disponibilità di quantità elevate di polimero con caratteristiche riproducibili da lotto a lotto; l'impossibilità di ottenere una materia prima con queste caratteristiche mi ha indotto, nonostante le ottime caratteristiche di citocompatibilità del materiale, ad eliminarlo per il momento dallo studio.

**Parte B**

***Smart Nanoparticles***



## 1. METODI

### 1.1. Sintesi del peptide GE11

La sintesi del peptide GE11 è stata condotta in fase solida (SPPS, *Solid Phase Peptide Synthesis*) (Amblard, Fehrentz, et al., 2006): secondo questa teoria, i peptidi di piccole dimensioni possono essere sintetizzati in maniera sequenziale a partire da una resina, cioè da un materiale insolubile nei comuni solventi organici utilizzati per la sintesi. Il peptide infatti non è in soluzione nel solvente utilizzato per la sintesi ma è legato covalentemente alla resina insolubile. Da qui il nome di “sintesi in fase solida”. La sintesi peptidica è di tipo sequenziale: al primo amminoacido, che viene legato alla resina, viene aggiunto un amminoacido alla volta in base alla struttura primaria del peptide che si vuole comporre. Si tratta quindi di un processo di sintesi in cui la reazione di *coupling* di due amminoacidi consecutivi viene ripetuta fino ad ottenere la sequenza desiderata e solo alla fine della sintesi il peptide viene staccato, liberato dalla resina. In questo modo, sono rese più semplici le fasi di purificazione del peptide alla fine della sintesi.

In Figura 19 è descritto in modo schematico il processo di sintesi di peptidi in fase solida. Il primo passaggio della sintesi in fase solida prevede la scelta della resina opportuna in base ai gruppi attivi che la caratterizzano e dalla stabilità del legame resina/ amminoacido ai solventi che vengono utilizzati durante la sintesi del peptide. Successivamente, si procede all’attacco del primo amminoacido (Fig.20, *step 1*). Il primo amminoacido ad essere legato alla resina è l’amminoacido C-terminale e la reazione prosegue in direzione

C-terminale N-terminale; per questa ragione la sintesi in fase solida viene definita *retrograda*. Gli amminoacidi utilizzati per la sintesi in fase solida sono sempre *bloccati* ovvero presentano dei gruppi chimici che mascherano sia la funzione reattiva NH<sub>2</sub>- terminale che i gruppi reattivi che si trovano nella catena laterale, lasciando libero solo il C- terminale (*Albericio 2000*). In questo modo la reazione può avvenire in una sola direzione, evitando così la formazione di sottoprodotti indesiderati. Esistono diverse strategie di blocco, tBoc/Bzl (tert-butossicarbonile/ benzile) e Fmoc/tBu (9-fluorenilmetossicarbonile/ tert-butile) sono le più comuni. Esse si differenziano in base alle diverse condizioni necessarie per lo sblocco dei gruppi reattivi: nel primo caso (tBoc/Bzl) si utilizzano soluzioni di acidi ad acidità diversa, nel secondo caso (Fmoc/tBu) con solventi di natura chimica diversa. Per questa ragione la strategia Fmoc/tBu viene definita protezione ortogonale e garantisce una maggiore selettività nella formazione del legame peptidico. Dopo l'attacco di ogni singolo amminoacido avviene quindi lo sblocco dell'N- terminale (Fig.20, *step 2*) necessario per la formazione del legame peptidico con il C- terminale dell'amminoacido successivo (Fig.20, *step 3*): l'operazione viene ripetuta per ogni amminoacido aggiunto.

L'ultima operazione della sintesi peptidica prevede lo sblocco dei gruppi funzionali delle catene laterali e la liberazione del peptide dalla resina (Fig.20, *step 4*).

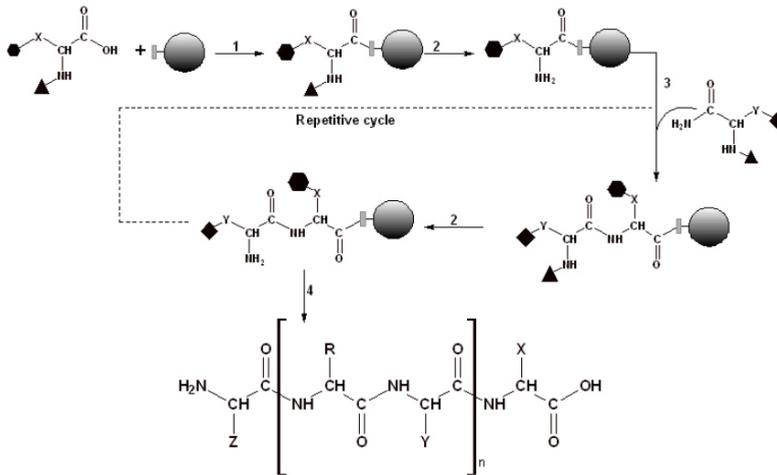


Figura 20: Schema della sintesi in fase solida (Guzman, Barberis, et al., 2007).

In Figura 21 è riportata la struttura primaria del peptide GE11.

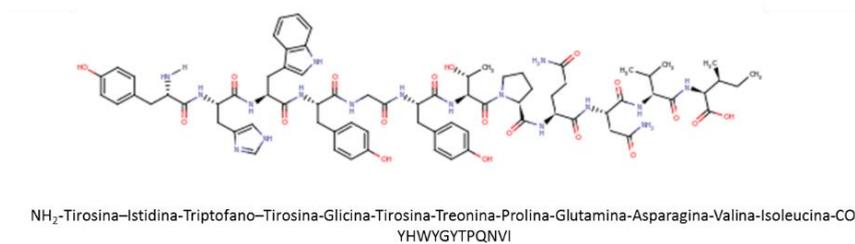


Figura 21: Struttura primaria del peptide GE11.

Di seguito, sono schematizzate le fasi della sintesi del peptide GE11, condotta utilizzando uno strumento a microonde (Biotage Initiator SP Wave Synthesizer).

- Scelta e preparazione della resina.

La resina che è stata scelta per la sintesi del GE11 è la 2-chlorotrytil chloride resin (100-200 mesh; 1% DVB; grado di sostituzione: 1,5 mmol/g) (Fig. 22).

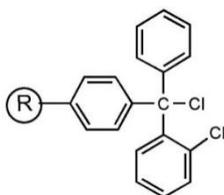


Figura 22: Struttura chimica della resina 2-chlorotrytil chloride resin.

La quantità pesata di resina è stata posta all'interno di una siringa con setto poroso e lasciata rigonfiare con 4 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sotto agitazione orbitalica per 30 minuti.

- Attacco del primo amminoacido.

Il primo amminoacido che è stato legato alla resina è Isoleucina (Fmoc-Ile-OH; 353,43 g/mol) che corrisponde al C- terminale del peptide. L'amminoacido è stato aggiunto in eccesso di 2 volte rispetto alla quantità da caricare sulla resina (0,2 mmol). La reazione è stata condotta in ambiente debolmente basico per la presenza di DIPEA (N, N – diisopropiletilammina; 129,24 g/mol; d: 0,742 g/ml), in eccesso di 2 volte rispetto al primo amminoacido (0,4 mmol), e utilizzando come solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Il legame del primo amminoacido avviene in assenza di agenti coupling: la resina presenta un Cl che si comporta come buon gruppo uscente per cui si procede con un attacco diretto dell'amminoacido alla resina.

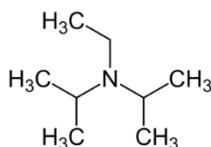


Figura 23: Struttura chimica della DIPEA.

Al termine del *coupling* del primo amminoacido, la resina è stata lavata con una miscela di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$  17/2/1 e successivamente con DMF, per eliminare i prodotti non reagiti.

- Sintesi della sequenza peptidica.

Come descritto precedentemente, l'attacco dei successivi amminoacidi avviene in seguito allo sblocco della funzione N-terminale dell'amminoacido già legato alla resina, che si rende disponibile per la formazione del legame peptidico con il  $-\text{COOH}$  dell'amminoacido entrante. Secondo la strategia di blocco (Fmoc/ tBu), lo sblocco dell'N-terminale è avvenuto utilizzando una soluzione di piperidina al 30% in DMF per 40 minuti.

Nel frattempo, il secondo amminoacido della sequenza è stato solubilizzato in 3 ml di DMF con l'aggiunta di DIPEA, insieme agli agenti di coupling HOBt (idrossibenzotriazolo) e HBTU (O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphate) (Fig. 24) in rapporto 1:1 molare rispetto alle moli di amminoacido. L'utilizzo di due agenti di coupling contemporaneamente è fondamentale per attivare il gruppo carbossilico ed evitare la formazione di prodotti di racemizzazione. La soluzione dell'amminoacido è stata trasferita all'interno della siringa contenente la resina con il primo amminoacido già legato.

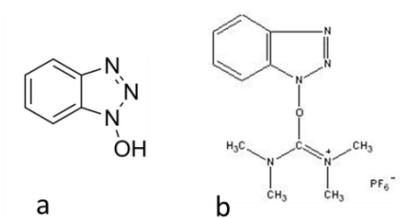


Figura 24: Struttura chimica di (a) HOBT e (b) Hbtu.

Al termine della reazione con il secondo amminoacido, le operazioni di sblocco dell'N-terminale sono state ripetute ciclicamente per favorire il legame con i successivi amminoacidi, fino alla sintesi completa del peptide.

- Sblocco del peptide dalla resina e dei gruppi funzionali di ogni amminoacido.

Al termine del *coupling* dell'ultimo amminoacido, l'N-terminale è stato sbloccato con la soluzione di piperidina in DMF e successivamente la resina è stata lavata con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  per eliminare i residui di prodotto non reagito.

A questo punto il peptide legato alla resina è stato liberato dalla resina stessa e i gruppi funzionali delle catene laterali sono stati sbloccati dai gruppi protettivi utilizzando una miscela di agenti sbloccanti e *radical scavenger* (TFA/Anisolo/ $\text{H}_2\text{O}$ /Tips (triisopropilsilano) in rapporto volumetrico 89/5/5/1). La resina è stata sospesa in questa soluzione e lasciata sotto agitazione per 2 ore; al termine, la resina è stata separata dal peptide mediante filtrazione.

Il peptide così sintetizzato e recuperato è stato successivamente purificato mediante HPLC per determinare purezza del prodotto e resa di processo (vedi capitolo 1.3.1, Metodi, Parte B)

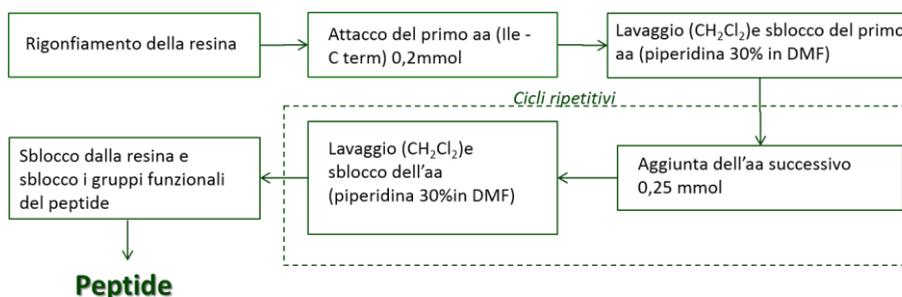


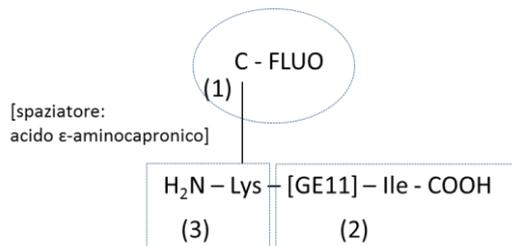
Figura 25: Schema riassuntivo delle fasi di sintesi dei peptidi in fase solida.

### 1.1.1 Sintesi del peptide GE11 fluorescente

Il peptide GE11 è stato ulteriormente marcato con carbossifluoresceina per facilitarne la caratterizzazione e rendere possibile un potenziale studio di *up-take* cellulare delle nanoparticelle mediante microscopio confocale.

Il peptide fluorescente (GE11-Fluo) è stato sintetizzato utilizzando lo stesso strumento a microonde utilizzato per la sintesi peptidica in fase solida (Biotage Initiator SP Microwave synthesizer). La sintesi ha previsto il legame della carbossifluoresceina ad un gruppo amminico libero della catena peptidica. Al fine di lasciare l'estremità N terminale del peptide libera per il legame con il polimero, si è deciso di aggiungere una lisina all'estremità N terminale della sequenza peptidica: l'ammina primaria della catena laterale

della lisina è stata sfruttata per attaccare la fluoresceina al peptide attraverso la formazione di un legame ammidico.



Per questa reazione, il gruppo carbossilico libero della carbossifluoresceina è stato attivato mediante reazione con EDC/NHS e funzionalizzato con acido ε-aminocapronico, utilizzato come spaziatore necessario per il legame con il gruppo amminico in ε della lisina (1).

Separatamente, la sintesi del peptide è stata condotta in fase solida, come descritto precedentemente, utilizzando come primo amminoacido della sintesi l'amminoacido corrispondente al C terminale (Isoleucina – ile) (2).

Al termine della sintesi, quando ancora il peptide GE11 era legato alla resina, è stata aggiunta una lisina come N terminale della catena alla quale è stata legata la carbossifluoresceina funzionalizzata con acido ε-aminocapronico, ottenendo così il derivato GE11-Fluo (vedere annex I per le fasi dettagliate di sintesi).

## 1.2 Realizzazione del coniugato GE11-PLGA

L'obiettivo finale di questa parte del lavoro è stato quello di legare al polimero PLGA il peptide GE11, al fine di impiegare il polimero funzionalizzato per la realizzazione di *smart nanocarriers*. La reazione di *coupling* avviene tra il gruppo  $-NH_2$  terminale del peptide e il gruppo  $-COOH$  del polimero attraverso la formazione di un legame ammidico, sfruttando la *carbodiimmide chemistry* (Greg T. Hermanson, 2008). Si tratta di una reazione che prevede l'utilizzo di carbodiimmidi come agenti di coupling, definiti reagenti "zero length" poiché non si ritrovano nel prodotto finale della reazione. La carbodiimmide viene utilizzata per attivare il  $-COOH$  del polimero. Esistono diverse carbodiimmidi: la scelta dipende dalla solubilità dei metaboliti nel mezzo di reazione. Una volta attivato il  $-COOH$  con la carbodiimmide, la formazione del legame ammidico può avvenire in i) modo diretto, cioè il gruppo  $NH_2$  del peptide funge da nucleofilo e si lega al  $-COOH$  del polimero attivato con la carbodiimmide (Fig. 26), oppure ii) in modo indiretto, cioè legando al  $-COOH$  attivato con la carbodiimmide l'idrossisuccinimide (NHS) che funge da buon gruppo uscente per la formazione del legame ammidico (Fig. 27). Il prodotto secondario di questa reazione è sempre un derivato dell'urea.

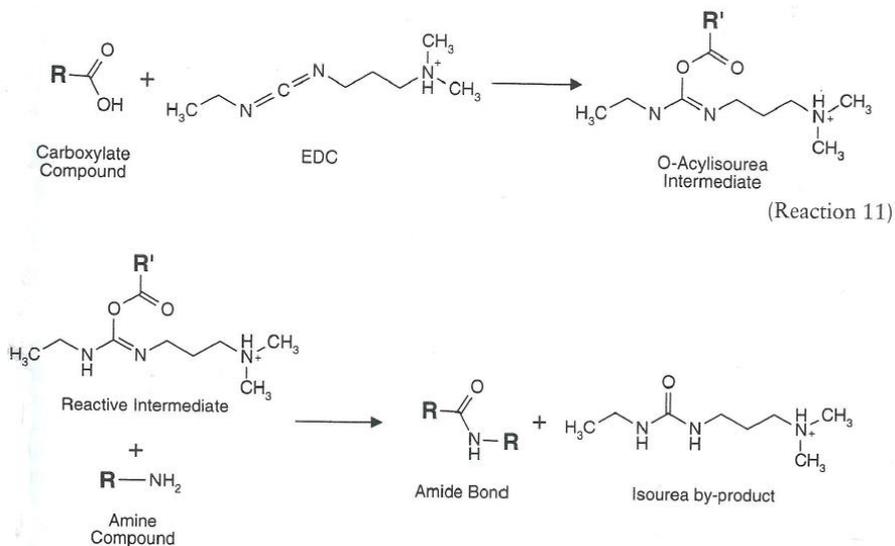


Figura 26: schema della reazione di formazione del legame ammidico tra un gruppo carbossilico e un gruppo amminico utilizzando come catalizzatore una carbodiimmide (EDC) (Greg T. Hermanson, 2008).

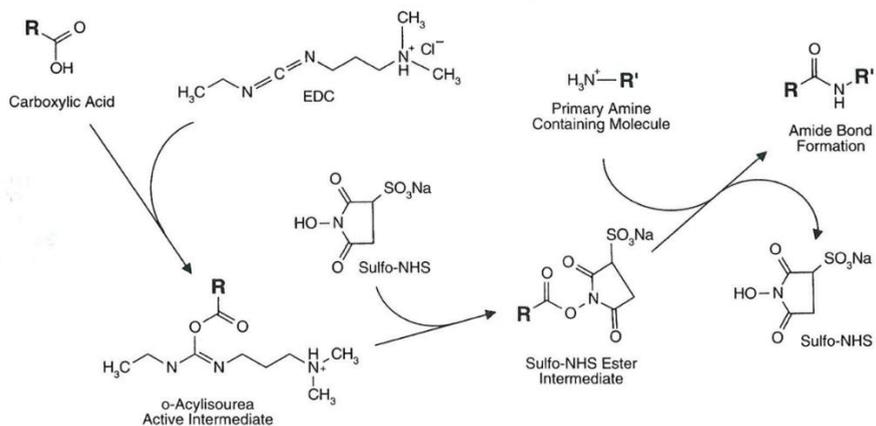


Figura 27: schema della reazione di formazione del legame ammidico tra un gruppo carbossilico e un gruppo amminico utilizzando come catalizzatore una carbodiimmide (EDC) e un derivato della idrossi-succinimide (NHS) (Greg T. Hermanson, 2008).

Per questa parte della ricerca, il polimero selezionato è il poli-lattide-co-glicolide (7525 DLG 3A, Mw 35,000 Da, 75% lattide/ 25% glicolide,

Lakeshore Biomaterials, USA) avente i gruppi carbossilici liberi all'estremità della catena. Per quanto riguarda l'ottimizzazione del protocollo di funzionalizzazione del polimero, è stato utilizzato in fase preliminare il peptide modello fenilalanina-glutamina-prolina-valina (FQPV). È bene sottolineare che il peptide selezionato presenta un solo gruppo  $\text{NH}_2$  libero a livello del quale può avvenire la reazione con il PLGA, per evitare la polimerizzazione del peptide stesso.

Il protocollo di sintesi del coniugato GE11-PLGA può essere schematizzato in due fasi: una prima fase di attivazione del gruppo  $-\text{COOH}$  del PLGA con carbodiimmide e N-idrossisuccinimide (NHS) e una seconda fase di legame del peptide al polimero.

Uno dei punti critici dell'ottimizzazione del processo di sintesi riguarda la scelta del solvente opportuno, che possa solubilizzare sia il polimero che il peptide. Infatti, la reazione condotta in mezzo acquoso, dove PLGA e NHS sono stati solubilizzati in MES buffer e il peptide FQPV invece è stato solubilizzato in PBS a pH 7,4, non ha portato ai risultati desiderati, probabilmente a causa della insolubilità del polimero in fase acquosa (Betancourt, Byrne, et al., 2009). Per queste ragioni si è deciso di svolgere la reazione di funzionalizzazione del PLGA in fase organica, come descritto di seguito.

50 mg di polimero (0,0017 mmol) sono stati solubilizzati in 2 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro sotto agitazione magnetica e in atmosfera di gas inerte ( $\text{N}_2$ ). Al momento della completa solubilizzazione del polimero, sono stati aggiunti 16,5 mg di EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimmide HCl; 0,085 mmol) e 29  $\mu\text{l}$  di DIPEA (0,085 mmol) per favorire la reazione.

Successivamente, sono stati aggiunti 9,85 mg di NHS (0,085mmol) e sono stati lasciati sotto agitazione magnetica per tutta la notte per completare la reazione. Il PLGA-NHS è stato purificato dagli eccessi di reagenti in soluzione; il PLGA attivato con NHS è stato quindi sottoposto a reazione con il peptide precedentemente solubilizzato in acetonitrile. Le fasi del processo sono schematizzate nella Figura 28.

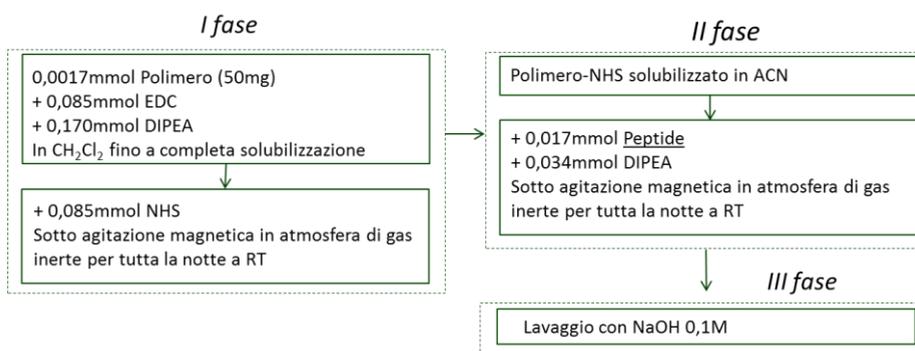


Figura 28: Schema riassuntivo del protocollo di funzionalizzazione del PLGA con il peptide.

Al termine della reazione il coniugato peptide-PLGA è stato purificato mediante estrazione con una soluzione acquosa basica e successivamente essiccato.

Il protocollo descritto ed ottimizzato utilizzando il peptide FQPV (ottenendo il coniugato modello FQPV-PLGA) è stato utilizzato con successo anche per la funzionalizzazione del PLGA con il peptide GE11, oggetto della nostra ricerca.

Lo stesso protocollo è stato utilizzato anche per la realizzazione del coniugato GE11-PLGA marcato: in questo caso il peptide GE11-Fluo è stato coniugato al PLGA seguendo le fasi di processo descritte precedentemente.

### **1.3 Caratterizzazione del peptide GE11 e del coniugato GE11-PLGA**

#### 1.3.1 Determinazione della purezza e dell'identità del peptide

Il peptide GE11 sintetizzato come descritto al capitolo 1.1 di questa sezione, è stato successivamente purificato mediante HPLC semi preparativa (AKTA Basic100; Colonna Phenomenex C18 Jupiter, 250 x 10 mm, 10  $\mu$ m) e la purezza è stata valutata mediante HPLC in fase inversa (Colonna Supelco Ascentis C18, 250 x 4,6 mm, 10  $\mu$ m). Il metodo di analisi è un metodo in gradiente in cui il solvente A è rappresentato da H<sub>2</sub>O /TFA 0,1%, mentre B è ACN: H<sub>2</sub>O /TFA 0,1% 80:20. Il gradiente prevede il passaggio da 10 a 40 di B in A in 3 volumi, da 40 a 70 in 3 volumi, da 70 a 100 in 2 volumi e in 100 per 2 volumi, con una velocità di flusso di 5 ml/min per la semipreparativa e 1 ml/min per l'analitica. Le letture vengono fatte a 226, 254 e 280 nm. La purezza è stata espressa come percentuale del peptide GE11 ottenuto rispetto a tutti i prodotti ottenuti dal processo di sintesi.

Attraverso la stessa metodica HPLC è stata definita anche la resa di processo, espressa come percentuale rispetto ai reagenti utilizzati nella sintesi.

L'identità del peptide invece è stata confermata mediante analisi con la spettrometria di massa MALDI-TOF (Bruker Microflex LT Spectrometer),

utilizzando acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico (4-HCCA) e acido sinapinico (SIN) come matrici.

### 1.3.2 Determinazione del grado di funzionalizzazione del polimero con il peptide GE11

Il coniugato GE11-PLGA è stato sottoposto ad una ampia caratterizzazione al fine di confermare l'effettiva coniugazione del polimero con il peptide. Per questa caratterizzazione, sono state prese in considerazione diverse metodiche: analisi NMR, analisi fluorimetrica e analisi cromatografica (GPC). Il problema principale di questa caratterizzazione è la differenza significativa di peso molecolare del polimero PLGA (35 kDa) rispetto al peso del peptide GE11 (1 kDa), tale da rendere necessaria la caratterizzazione del coniugato mediante diverse metodiche per confermare i risultati ottenuti.

- Per prima cosa, il coniugato GE11-PLGA è stato caratterizzato mediante  $^1\text{H}$  NMR, registrato a 400 MHz in  $\text{d}_6$ -DMSO a 50°C. Il tracciato NMR del coniugato è stato confrontato al tracciato del PLGA come tale, al fine di confermare la presenza dei picchi caratteristici di ogni polimero in esame. Attraverso l'integrazione dei picchi è stato possibile valutare anche da un punto di vista quantitativo il grado di funzionalizzazione del polimero PLGA con il peptide.
- Ulteriore analisi del grado di funzionalizzazione è stata condotta utilizzando un'analisi al fluorimetro del coniugato GE11-PLGA-Fluo. Come descritto precedentemente, il coniugato GE11-PLGA-Fluo è

stato sintetizzato legando ad ogni catena di peptide una sola molecola di carbossifluoresceina (rapporto 1:1 molare). Il peptide fluorescente è stato successivamente legato al polimero mediante la formazione di un legame ammidico con il gruppo carbossilico libero del PLGA. Perciò, la quantificazione della fluoresceina legata al polimero può essere sfruttata indirettamente anche per la quantificazione del peptide legato al polimero. Nello specifico, una certa quantità del coniugato GE11-PLGA-Fluo è stata pesata e solubilizzata in DMSO. In base alla curva di calibrazione realizzata con concentrazioni differenti di GE11-Fluo (da 0,1  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ) e leggendo l'intensità dell'emissione fluorescente a 518 nm, il GE11 presente nel coniugato è stato quantificato.

- Infine, il coniugato GE11-PLGA è stato sottoposto ad analisi mediante *Gel Permeation Chromatography* (GPC), metodica generalmente utilizzata per la determinazione del peso molecolare dei polimeri. L'obiettivo di questa analisi è stato quello di verificare la presenza o meno del peptide GE11 libero all'interno del coniugato GE11-PLGA ed una eventuale variazione del tempo di ritenzione del picco del coniugato rispetto al picco del polimero PLGA, a ulteriore conferma dell'avvenuta modificazione del polimero di origine. Con questa metodica è stato possibile ottenere solamente un dato qualitativo della funzionalizzazione. Nello specifico, 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione 10 mg/ml in DMSO dei campioni in esame è stata analizzata con uno strumento GPC dotato di pompa Varian 9010 e detector IR (Prostra 355 RI, Varian). L'eluente

è THF + BHT come antiossidante, ad una velocità di flusso di 1 ml/min. Per l'analisi sono state utilizzate 3 colonne in serie, caratterizzate da una porosità differente (Ultrastyrigel, 7,7 x 250 mm, nell'ordine  $10^4$  Å,  $10^3$  Å e 500 Å).

I risultati del grado di funzionalizzazione sono espressi come % di attivo legato rispetto al quantitativo teorico che potrebbe legarsi al polimero, considerando che ad ogni catena polimerica si lega una sola molecola di peptide.

### 1.3.3 Caratterizzazione del comportamento termico del polimero GE11-PLGA

Il coniugato GE11-PLGA è stato sottoposto ad analisi termica mediante Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC) e Analisi Termogravimetrica (TGA): l'obiettivo è quello di valutare il comportamento del coniugato GE11-PLGA a diverse temperature. Le analisi sono sempre state condotte utilizzando il polimero PLGA come confronto: i poliesteri alifatici come il PLGA sono infatti polimeri semicristallini, perciò caratterizzati da un comportamento termico specifico e caratteristico del polimero in esame, che influenza la stabilità *in vitro* e *in vivo* dei sistemi nanoparticellari realizzati a partire da questi polimeri. Da questo confronto è possibile indagare in che modo la funzionalizzazione del polimero con il peptide possa aver modificato le proprietà termiche del polimero stesso.

L'analisi DSC (apparecchio DSC Q2000 interfacciato ad un elaboratore TA5000 - Ta Instruments, USA) è stata condotta su campioni di 3-5 mg posti all'interno di crogioli di alluminio aperti, sotto flusso di azoto (45 ml/min). I campioni hanno subito una doppia scansione da -40°C a 100°C, con una velocità di riscaldamento di 5 K/min.

L'analisi termo gravimetrica è stata condotta in flusso di azoto (3 L/ora), in un intervallo di temperature compreso tra 30 e 100°C, a una velocità di riscaldamento pari a 5 K/min, utilizzando uno strumento TGA Q5000 IR interfacciato ad un elaboratore TA5000 (Ta Instruments, USA).

#### **1.4 Preparazione delle nanoparticelle polimeriche**

I polimeri PEGilati vengono utilizzati spesso in ambito farmaceutico per la realizzazione di sistemi nanoparticellari *smart* poiché il PEG viene sfruttato come spaziatore e *linker* per l'attacco di agenti di direzionamento attivo. Il PLGA PEGilato (PEG-PLGA) rimane quindi in molti casi il polimero di elezione per la realizzazione di *smart nanoparticles*.

In questo progetto di ricerca il PEG-PLGA è stato utilizzato come confronto al fine di valutare eventuali differenze tra il PLGA-PEG e un PLGA di analogo peso molecolare e funzionalizzato direttamente sui gruppi carbossilici liberi con il peptide GE11 (GE11-PLGA). Inoltre, il PEG-PLGA è stato utilizzato anche per sviluppare un'ulteriore formulazione di *carrier* nanoparticellari, realizzati a partire da una miscela tra il coniugato GE11-PLGA e il PEG-PLGA, in modo da combinare l'azione attiva dell'agente di targeting con gli effetti del PEG sulla clearance e sull'immunogenicità dei sistemi nanoparticellari,

con l'obiettivo di ottenere sistemi stabili e attivi contro un determinato bersaglio.

Due differenti metodiche sono state utilizzate per la realizzazione delle nanoparticelle: i) la tecnica della nanoprecipitazione e ii) la tecnica dell'emulsione semplice con evaporazione del solvente, già descritti in precedenza (capitolo 1.2, Metodi, Parte A).

Il protocollo di preparazione definitivo è stato ottimizzato utilizzando i polimeri puri (PLGA-PEG e PLGA). Successivamente, il metodo di preparazione settato è stato utilizzato per la preparazione di nanoparticelle funzionalizzate con il peptide: dapprima sono state realizzate nanoparticelle modello utilizzando il coniugato FQPV-PLGA. Ulteriori lotti di nanoparticelle sono stati allestiti mediante incapsulazione o adsorbimento del peptide FQPV sulle nanoparticelle, allo scopo di individuare una metodica complementare all'utilizzo del coniugato per aumentare l'entità di caricamento del peptide. Dopo avere vagliato diverse metodiche e strategie di veicolazione del peptide, la formulazione definitiva di nanoparticelle di GE11-PLGA è stata selezionata. Infine, sono stati realizzati *carrier* nanoparticellari contenenti un farmaco modello, il Desametasone (DXM, MW 392,46 g/mol, Fluka Analytical), ampiamente utilizzato come agente antiinfiammatorio nell'artrite reumatoide, adatto sia a una somministrazione sistemica che intra-articolare (*Boekhorst, Jensen, et al., 2012*), (*Higaki, Ishihara, et al., 2005*). I lotti di nanoparticelle allestiti sono schematizzati in Figura 29.

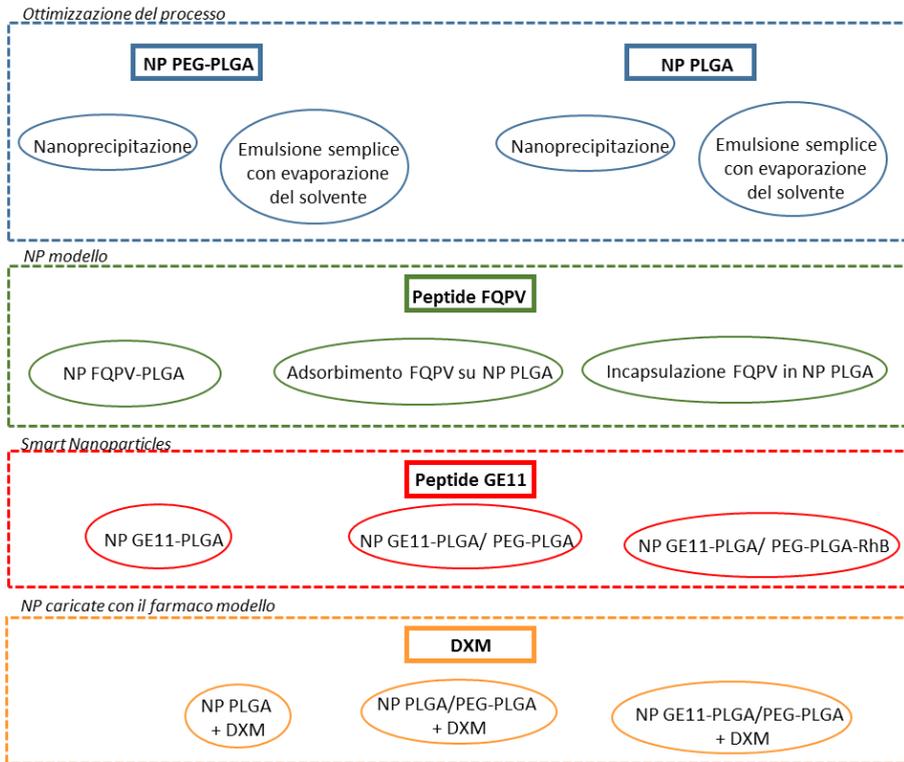


Figura 29: Schema dei lotti di nanoparticelle realizzati.

#### 1.4.1. Nanoparticelle con il polimero PEGilato (PLGA-PEG)

Le nanoparticelle di PLGA-PEG (7525 DLG 3C PEG 6000, PM 36 kDa, Lakeshore Biomaterials – Surmodics Pharmaceuticals, Birmingham, AL) sono state realizzate come confronto alle nanoparticelle costituite dai nuovi coniugati a base di PLGA, obiettivo della ricerca, e sono state allestite con due metodiche differenti, i) la tecnica della nanoprecipitazione e ii) quella dell'emulsione semplice con evaporazione del solvente.

Secondo la metodica della nanoprecipitazione, il polimero è stato solubilizzato in opportuno solvente organico (acetone) a diverse concentrazioni (5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mg/ml). Dopo completa solubilizzazione, sono stati aggiunti 700 µl di etanolo e la soluzione è stata ulteriormente miscelata al vortex per un minuto. La soluzione polimerica è stata successivamente gocciolata all'interno di una soluzione acquosa di PVA 1% p/v sotto forte agitazione magnetica (700 rpm). Due diversi rapporti volumetrici tra la soluzione polimerica e la soluzione di PVA sono stati considerati (1:1 v:v e 1:2 v:v) al fine di valutare gli effetti del PVA sulla dimensione e stabilità delle nanoparticelle. Al termine del tempo di *curing*, le nanoparticelle sono state recuperate tramite centrifugazione, risospese in acqua e ne è stata valutata la dimensione mediante strumento a diffusione dinamica della luce (Nicomp, capitolo 1.3, Metodi, Parte A).

In base ai risultati dell'analisi dimensionale, i parametri di processo ottimali sono stati selezionati al fine di ottenere nanoparticelle con dimensioni e distribuzione dimensionale adatte ad una somministrazione endovenosa e intra-articolare delle stesse.

Utilizzando la seconda metodica (emulsione semplice con evaporazione del solvente) le nanoparticelle sono state realizzate solubilizzando il polimero in un solvente immiscibile in acqua, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Durante il processo di preparazione delle nanoparticelle è fondamentale mantenerne la stabilità andando a valutare non solo gli effetti della concentrazione polimerica e del metodo di agitazione ma anche il tempo di *curing*, necessario affinché il solvente sia completamente eliminato per evaporazione. In particolare, il

polimero è stato solubilizzato a diverse concentrazioni (15 e 20 mg/ml) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La soluzione polimerica così ottenuta è stata gocciolata all'interno di una soluzione acquosa di PVA 1% p/v (rapporto 1:2 v:v tra la soluzione polimerica e la soluzione di PVA) sotto agitazione (Ultra-turrax, Ika Technologies, Italia) a diverse velocità di agitazione (6500, 9500 e 13500 rpm) per diversi tempi di *curing* (10 minuti, 20 minuti, 1, 2, 4 ore), mantenendo l'emulsione in bagno di ghiaccio per evitare il surriscaldamento della soluzione polimerica. Al termine, l'emulsione è stata trasferita in un becher e lasciata sotto agitazione (700 rpm) per tutta la notte per favorire la completa evaporazione del solvente organico. Le nanoparticelle così ottenute sono state recuperate per centrifugazione per eliminare il PVA in eccesso e le migliori condizioni operative sono state selezionate in base ai risultati dell'analisi dimensionale.

#### 1.4.2 Nanoparticelle con il polimero non PEGilato (PLGA)

L'ottimizzazione del processo di preparazione delle nanoparticelle condotta utilizzando il PEG-PLGA è stata utilizzata come punto di partenza per la realizzazione delle nanoparticelle di PLGA. Anche in questo caso infatti sono stati realizzati lotti di nanoparticelle di solo PLGA utilizzando sia la metodica della nanoprecipitazione che la metodica dell'emulsione con evaporazione del solvente. Le nanoparticelle realizzate sono state caratterizzate in termini di dimensione e distribuzione dimensionale.

### 1.4.3. Nanoparticelle funzionalizzate con il peptide modello

Le nanoparticelle modello sono state preparate utilizzando il coniugato FQPV-PLGA, al fine di selezionare il protocollo di preparazione più opportuno da utilizzare successivamente con il coniugato di interesse GE11-PLGA. In fase preliminare inoltre è stata valutata la capacità delle nanoparticelle a base di PLGA di caricare il peptide modello mediante la sua incapsulazione o adsorbimento.

Sono stati quindi allestiti i seguenti lotti di nanoparticelle:

- i) a base del coniugato FQPV-PLGA, sfruttando metodiche e parametri di processo ottimizzati con i polimeri puri;
- ii) per adsorbimento del peptide FQPV sulla superficie di nanoparticelle placebo di PLGA;
- iii) mediante incapsulazione del peptide FQPV in nanoparticelle di PLGA.

#### *Nanoparticelle a base del coniugato FQPV-PLGA*

Il coniugato FQPV-PLGA presenta notevoli differenze in termini di solubilità rispetto al PLGA, mostrandosi insolubile in acetone. Per questo motivo la tecnica della nanoprecipitazione, opportunamente ottimizzata con i polimeri puri, è stata adattata al coniugato e condotta utilizzando il DMSO come solvente, poiché miscibile in acqua ed elencato tra i solventi con una bassa tossicità nella classe 3 della norma ICH Q3C (R5) *Impurities: guideline on residual solvents*. Come descritto nel capitolo dei risultati, il protocollo modificato si è mostrato adeguato alla realizzazione di nanoparticelle con le dimensioni desiderate.

Considerando i problemi di ipotetica difficile eliminazione del DMSO dalle nanoparticelle (per es., mediante liofilizzazione) e quindi della loro potenziale citotossicità, è stata anche ottimizzata una metodica ibrida, in cui al  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  è stata aggiunta una certa quantità di acetone. Il  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  è fondamentale per la solubilizzazione del coniugato FQPV-PLGA mentre l'aggiunta dell'acetone è risultata necessaria sia per ridurre la dimensione delle nanoparticelle sia per garantire la solubilizzazione del principio attivo selezionato (DXM), come vedremo in seguito. In questa fase del lavoro è stato necessario progettare un disegno sperimentale che ci aiutasse ad individuare la corretta combinazione di parametri fondamentali per l'ottenimento di nanoparticelle con le dimensioni opportune. Il software utilizzato è STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

Mantenendo fissi la concentrazione del polimero e il volume della soluzione di PVA, è stato progettato un disegno di screening caratterizzato da 3 fattori e una risposta: i 3 fattori sono stati il solvente, espresso come % di acetone aggiunta al  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (da 40 a 80%), la concentrazione di PVA, espressa come % p/p (da 0,4 a 0,6%), ed il volume della soluzione polimerica gocciolato all'interno della soluzione di PVA (da 2 a 5 ml). La risposta è invece la dimensione delle nanoparticelle (espressa in nm). Si tratta di un disegno fattoriale completo, costituito da 10 esperimenti, comprese 2 repliche del punto centrale del disegno; gli esperimenti sono condotti in modo casuale. In Tabella IV il riassunto dei fattori e delle risposte comprese in questo disegno.

Tabella IV: Riassunto dei fattori considerati del disegno fattoriale di screening.

Fattori	Alto	Basso	Unità
Solvente	80	20	% v/v di acetone
Conc. PVA	0,6	0,2	% p/p
Volume PLGA	2	5	ml

La progettazione di un disegno sperimentale ha permesso di organizzare in modo razionale gli esperimenti necessari ad ottimizzare il processo. L'ulteriore vantaggio di questo approccio sperimentale è quello di valutare non solo l'effetto del singolo fattore sulla risposta finale ma anche l'effetto dell'interazione di due fattori indipendenti sulla risposta stessa. Nel nostro caso, sono stati realizzati diversi lotti di nanoparticelle, ciascuno dei quali ottenuto secondo una combinazione diversa dei fattori sopra elencati (solvente, concentrazione di PVA e volume della soluzione polimerica). Per ciascuno di questi lotti è stata determinata la dimensione delle nanoparticelle e il protocollo di preparazione definitivo è stato selezionato sulla base della risposta "dimensione".

*Nanoparticelle ottenute per adsorbimento del peptide FQPV sulla superficie delle nanoparticelle placebo di PLGA*

Accanto al metodo che utilizza il coniugato FQPV-PLGA, è stato sviluppato un secondo metodo in cui il peptide FQPV è stato adsorbito sulle nanoparticelle di PLGA preventivamente allestite. Secondo il protocollo seguito, al termine della preparazione, le nanoparticelle sono state centrifugate e lavate con H<sub>2</sub>O per eliminare il PVA in eccesso. A questo

punto, il lotto di nanoparticelle è stato suddiviso in diverse eppendorf, ciascuna corrispondente ad un tempo di incubazione diverso. In ognuna di queste eppendorf è stato aggiunto un uguale volume (1 ml) di una soluzione acquosa di FQPV (2 mg/ml). Le nanoparticelle sono state lasciate per tempi diversi in incubazione con la soluzione di FQPV e ad intervalli di tempo prestabiliti (10, 30, 60, 90, 120, 180, 240 minuti) sono state centrifugate (16400 rpm, 4°C, 20 minuti) per separarle dal surnatante. Il surnatante è stato recuperato ed analizzato con il metodo HPLC in gradiente (*Faraj, Dorati, et al., 2007*) utilizzando come colonna C18 Zorbax Eclipse plus, 4,6 x 15 cm, 5 µm; la fase mobile è costituita da: 80:20 A:B fino a 70:30 A:B, dove A= H2O/ TFA 0,1% v/v B= ACN/ TFA 0,1%; con un flusso di 1ml/min. Lunghezza d'onda: 258nm.

Il metodo prevede un'analisi di 16 minuti, in cui il picco del peptide esce intorno a 6 minuti. Una curva di calibrazione è stata realizzata in un range di concentrazioni compreso tra 125 µg/ml e 1500 µg/ml; in queste condizioni si osserva un andamento lineare della concentrazione del peptide rispetto all'assorbanza ( $y=26,088x + 1885,7$ ,  $R^2=0,9965$ ).

La quantità di FQPV adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle è stata quindi determinata in modo indiretto, andando a quantificare il peptide non adsorbito. I risultati della caratterizzazione di queste nanoparticelle sono stati espressi come quantità di peptide adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle di PLGA nel tempo.

#### Nanoparticelle ottenute per incapsulazione del peptide FQPV

Infine, un lotto di nanoparticelle modello è stato realizzato per incapsulazione del peptide FQPV. Per realizzare questo lotto di nanoparticelle, il peptide FQPV è stato aggiunto alla soluzione polimerica prima del gocciolamento nella soluzione di PVA. La quantificazione del FQPV incapsulato è stata effettuata in modo indiretto sulle acque di preparazione e di lavaggio raccolte durante la preparazione del lotto, mediante il metodo HPLC descritto precedentemente.

#### 1.4.4. Nanoparticelle a base del coniugato GE11-PLGA

Come già osservato con il coniugato FQPV-PLGA, la modificazione del polimero PLGA mediante la formazione di un legame covalente con un peptide, anche se di piccole dimensioni, cambia in maniera significativa le proprietà di solubilità del polimero. Infatti, come osservato con il coniugato modello FQPV-PLGA, anche il coniugato GE11-PLGA non è più solubile nei comuni solventi utilizzati per la realizzazione delle nanoparticelle, ovvero  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e Acetone. Per questo motivo, le nanoparticelle *smart* a base di GE11-PLGA sono state realizzate secondo la tecnica della nanoprecipitazione, utilizzando il DMSO come solvente.

La procedura utilizzata è il risultato di un'ottimizzazione di processo che è stata condotta precedentemente utilizzando il polimero non funzionalizzato (PLGA) in acetone, dove sono state considerate diverse concentrazioni di polimero e diversi tempi di *curing*. Il metodo è stato poi modificato per rispettare le proprietà di solubilità del coniugato GE11-PLGA. Le

nanoparticelle sono state successivamente caratterizzate, come descritto in seguito.

Le potenzialità di sistemi nanoparticellari targettizzati risiede nella capacità di tali sistemi di raggiungere il bersaglio in maniera selettiva, indirizzando la cessione del farmaco e di conseguenza la sua attività farmacologica solo a livello di un determinato tessuto. Il raggiungimento del bersaglio è vincolato anche a proprietà intrinseche dei sistemi nanoparticellari, che ne influenzano la stabilità e il tempo di permanenza in circolo, come la capacità di eludere il sistema immunitario e la clearance renale. È noto in letteratura che la presenza di PEG sulla superficie delle nanoparticelle contribuisce a entrambi questi aspetti, con il risultato di aumentare il tempo di permanenza in circolo delle nanoparticelle e la loro stabilità nei fluidi biologici. Per questa ragione, una seconda formulazione di nanoparticelle targettizzate con il peptide GE11 sono state progettate. Nello specifico, si è pensato di realizzare nanoparticelle composte da una miscela fisica di coniugato GE11-PLGA e PEG-PLGA in rapporto 1:1 p:p. In questo modo, la superficie delle nanoparticelle dovrebbe esprimere sia l'agente di targeting attivo (GE11) che i residui di PEG.

Per ottenere questa seconda formulazione di nanoparticelle con il coniugato GE11-PLGA, è stata realizzata una soluzione polimerica di GE11-PLGA e PEG-PLGA in uguale rapporto di massa in DMSO, per garantire la completa solubilizzazione di entrambi i polimeri. Al termine della solubilizzazione, la soluzione polimerica è stata gocciolata nella soluzione di PVA, nelle condizioni e secondo i parametri già selezionati.

#### 1.4.5 Nanoparticelle caricate con un farmaco modello

La presenza del GE11 sulla superficie delle nanoparticelle ha come obiettivo quello di indirizzare il farmaco veicolato nelle nanoparticelle all'interno di tessuti caratterizzati da una sovraespressione cellulare di EGFR. Come già anticipato, il recettore EGFR viene sovraespresso in molte forme di tumore solido ma anche nelle articolazioni di soggetti affetti da artrite reumatoide. Per questa ragione, si è pensato di utilizzare come farmaco il Desametasone (DXM), farmaco antiinfiammatorio steroideo utilizzato generalmente per il trattamento sistemico dell'artrite reumatoide (*Butoescu, Jordan, et al., 2009*). L'obiettivo è quello di realizzare nanoparticelle destinate al trattamento dell'artrite reumatoide somministrate sia per via sistemica che per via intra-articolare. Le nanoparticelle caricate con l'attivo sono state successivamente caratterizzate in termini di *drug content* e di rilascio *in vitro* (capitoli 1.5.7 e 1.5.8, Metodi, Parte B).

Come da letteratura, l'incapsulazione del DXM risulta essere piuttosto difficoltosa (*Gomez-Graete, Tsapis, et al., 2007*). L'attivo è stato incapsulato all'interno delle nanoparticelle di PLGA andando a modificare il protocollo di preparazione delle nanoparticelle precedentemente descritto e settato per le nanoparticelle placebo. Diverse strategie di incapsulazione sono state considerate:

- Solubilizzazione dell'attivo direttamente nella soluzione polimerica in DMSO;
- Solubilizzazione dell'attivo all'interno della soluzione polimerica con l'aggiunta di due diversi solventi organici che a differenza di DMSO

e Etanolo non sono miscibili in acqua ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e Etilacetato). L'obiettivo è quello di rallentare la diffusione del solvente organico nella fase esterna acquosa e di conseguenza di ridurre anche la fuoriuscita dell'attivo dalla matrice polimerica;

- Aggiunta alla soluzione acquosa di PVA di una certa quantità di NaCl al fine di creare una pressione osmotica tale da ridurre la diffusione dell'attivo verso la fase esterna.

Le altre fasi del processo di realizzazione delle nanoparticelle sono rimaste invariate rispetto al protocollo seguito per la realizzazione di lotti placebo. Per ognuno dei lotti realizzati il rapporto polimero:attivo di partenza è sempre stato mantenuto costante (10:1 p:p). Al termine del tempo di *curing*, le nanoparticelle sono state filtrate con un filtro in nylon con una porosità di 80  $\mu\text{m}$ , per recuperare eventuali cristalli di DXM nella soluzione di PVA. Il filtrato contenente le nanoparticelle è stato sottoposto a centrifuga per separare le nanoparticelle dal surnatante.

Il protocollo definitivo per la realizzazione di nanoparticelle caricate con DXM è stato selezionato sulla base dell'entità di caricamento dell'attivo raggiunta per ogni lotto preparato e successivamente utilizzato per realizzare nanoparticelle a base di GE11-PLGA caricate con DXM.

#### 1.4.6 Nanoparticelle fluorescenti

La realizzazione di nanoparticelle fluorescenti è necessaria per poter condurre una caratterizzazione delle nanoparticelle riguardante anche il

loro profilo biologico. In particolare, l'utilizzo di nanoparticelle fluorescenti è stato necessario per valutare la stabilità delle nanoparticelle in particolari fluidi biologici e per valutare il profilo di *uptake* cellulare dei sistemi nanoparticellari allestiti.

Nonostante gli sforzi sintetici per ottenere il peptide marcato (Paragrafo 1.1.1), la carbossifluoresceina però non rappresenta un ottimo fluoroforo per alcune metodiche di microscopia a fluorescenza poiché va incontro facilmente a fenomeni di *photobleaching*. Per questa ragione, il coniugato GE11(fluo)-PLGA non è stato utilizzato per la realizzazione di nanoparticelle fluorescenti. Per ovviare questo problema, si è pensato di funzionalizzare il PEG-PLGA con Rodamina B (RhB) ed utilizzare tale polimero per la realizzazione di nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA-RhB, con il metodo descritto precedentemente. Il protocollo di funzionalizzazione del PLGA con la Rodamina è un protocollo utilizzato e consolidato da tempo (*Costantino, Gandolfi, et al., 2005*). Nello specifico, ad una soluzione di PEG-PLGA (750 mg) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro (5 ml) sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente e in atmosfera di gas inerte, sono stati aggiunti Rodamina B (81,4 mg, 0,17 mmol), diciclooesilcarbodimmide DCC (35,4 mg, 0,17 mmol) e 4,4-dimetilaminopiridina DMAP (200 mg, 1,7 mmol) e lasciati sotto agitazione per 24 ore. Al termine, il  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  è stato allontanato con rotavapor. Il polimero così ottenuto è stato successivamente recuperato con acqua e sottoposto a successivi cicli di lavaggio con acqua e centrifugazione per eliminare i residui di Rodamina non reagita. Il grado di marcatura del polimero è stato definito mediante fluorimetria ed è pari a 1 mg di Rodamina B per grammo di polimero.

## 1.5 Caratterizzazione delle nanoparticelle

### 1.5.1 Analisi dimensionale e potenziale zeta

Dimensioni e carica superficiale sono due caratteristiche fondamentali di un sistema nanoparticellare, perchè ne influenzano e determinano direttamente il comportamento *in vitro* e *in vivo*, come la stabilità nei fluidi biologici, la capacità di penetrare nelle cellule bersaglio e la loro eliminazione.

L'analisi dimensionale è stata condotta mediante l'apparecchio NICOMP 380 ZLS (Particle Sizing Systems, CA, USA) su nanoparticelle in sospensione acquosa, come descritto nel capitolo 1.3, Metodi, Parte A.

Lo stesso strumento è stato anche utilizzato per la determinazione della carica superficiale delle nanoparticelle (Potenziale zeta).

Sappiamo infatti che una particella superficialmente carica produce una distribuzione di ioni nella regione che la circonda, provocando un aumento della concentrazione di contro-ioni vicino alla superficie. Lo strato liquido che circonda la particella è composto da due zone: una interna detta "strato di Stern", dove gli ioni sono fortemente legati, ed una esterna, detta "strato diffuso", dove le interazioni sono più deboli. Le due zone costituiscono insieme un doppio strato elettronico intorno ad ogni particella. Questo confine si chiama *slipping plane*. Il potenziale in corrispondenza di questo confine è conosciuto come potenziale zeta. Lo strumento funziona in questo modo: applicando un campo elettrico al liquido, le particelle

colloidal tendono a muoversi verso il polo di carica opposta; pertanto, la direzione dello spostamento indica chiaramente il segno della carica sulla superficie. La velocità con cui si muovono le particelle è proporzionale alla grandezza della carica e misurando sia la velocità sia la direzione dello spostamento in un campo elettrico noto è possibile calcolare la mobilità elettroforetica e da qui il potenziale zeta del sistema colloidale. Per questa analisi, lo strumento NICOMP 380/ZLS è fornito di un diodo laser di 15 mW e di un rilevatore con fibra ottica stabilita a 19° per l'analisi del potenziale zeta.

Il campione è introdotto in cuvettes di plastica e gli elettrodi standard sono costituiti di platino. Le misure del potenziale zeta sono state condotte su nanoparticelle in sospensione in una soluzione di NaCl 10 mM.

#### 1.5.2 Determinazione della resa di processo

Al termine della preparazione, le nanoparticelle vengono centrifugate e liofilizzate, in assenza di crioprotettore, al fine di valutare l'efficienza del processo produttivo.

La resa di processo si esprime come rapporto tra il peso delle nanoparticelle liofilizzate e il peso delle materie di partenza (polimero e, nel caso, attivo), in percentuale.

### 1.5.3 Analisi morfologica mediante Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM)

Le nanoparticelle sono state analizzate da un punto di vista morfologico mediante la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), al fine di valutarne la forma e confermare le dimensioni registrate mediante analisi allo strumento a diffusione di luce (Nicomp). Il campione di nanoparticelle da analizzare al microscopio (TEM 208 S, Philips NL) è stato preparato con la tecnica del *negative staining* mediante il metodo a goccia. Le nanoparticelle sono state sospese in acqua bidistillata e un'aliquota di 15 µl di sospensione particellare è stata depositata su un retino di carbone Formvar (AGAR Scientific, Stansed, UK) con maglie da 300 mesh e fissata per circa 2 minuti. L'eccesso di sospensione è stato rimosso con filtro di carta e il campione è stato colorato con una soluzione di uranile (1 M). Il metodo è definito *negative staining* perché è il rivestimento del retino su cui sono poste le nanoparticelle a colorarsi, mentre le nanoparticelle risultano bianche.

Le analisi al microscopio elettronico vengono solitamente condotte su campioni di nanoparticelle in sospensione acquosa. Pertanto, sono stati analizzati lotti freschi, appena preparati, di nanoparticelle di GE11-PLGA e della formulazione contenente anche il polimero PEGilato. Le immagini sono state messe a confronto con le immagini delle nanoparticelle non targettizzate. Inoltre, sono state registrate anche le immagini di nanoparticelle liofilizzate con un opportuno crioprotettore e risospese in

acqua prima dell'analisi, al fine di verificare l'effetto del crioprotettore sulla stabilità delle nanoparticelle al ciclo di liofilizzazione.

#### 1.5.4 Caratterizzazione del comportamento termico delle nanoparticelle polimeriche

Anche le nanoparticelle polimeriche sono state sottoposte a caratterizzazione del comportamento termico mediante analisi DSC, così come è stato caratterizzato il coniugato GE11-PLGA. Nello specifico, il comportamento termico delle nanoparticelle a base di GE11-PLGA, con e senza l'aggiunta del polimero PEGilato, è stato confrontato al comportamento delle rispettive formulazioni di nanoparticelle non targettizzate con il GE11 e con i polimeri come tali (PLGA e PEG-PLGA). Le condizioni con cui sono state condotte le analisi sono le stesse descritte per il coniugato (capitolo 1.3.3, Meotdi, Parte B).

#### 1.5.5 Test di stabilità *in vitro* a lungo termine dei sistemi nanoparticellari allestisti

Considerando l'importanza che la dimensione riveste nel definire l'efficacia di un sistema nanoparticellare, è fondamentale che tale proprietà non cambi nel tempo quando le nanoparticelle si trovano in particolari di condizioni di pH e a contatto con determinati fluidi biologici. Il pH infatti potrebbe influenzare il potenziale zeta delle nanoparticelle e di conseguenza potrebbe venire a meno quella repulsione tra cariche

elettrostatiche necessaria ad evitare l'aggregazione delle nanoparticelle stesse.

È per questo motivo che sono stati condotti diversi test di stabilità *in vitro* sui sistemi nanoparticellari allestiti a base di GE11-PLGA, con e senza il polimero PEGilato. Nello specifico, sono stati realizzati test di stabilità a lungo termine (30 giorni). Questi studi sono necessari soprattutto per l'applicazione locale per somministrazione intra-articolare delle nanoparticelle, nel caso in cui si formassero dei *depot*.

Per quanto riguarda i test a lungo termine, essi sono stati condotti a 4°C, in soluzione fisiologica per valutare la stabilità delle nanoparticelle in sospensione in possibili condizioni di stoccaggio. Altri test a lungo termine, sono stati condotti a 37°C in tampone fosfato a pH 7.4 e a pH 5.0 per simulare le condizioni di acidità di un tessuto infiammatorio/ tumorale.

Il test è stato condotto risospendendo le nanoparticelle nel mezzo opportuno e conservando la sospensione nelle condizioni di temperatura e di pH indicate. Ad intervalli di tempo regolari, la sospensione è stata analizzata per determinare la variazione della dimensione e dell'indice di polidispersità nel tempo.

#### 1.5.6 Stabilità delle nanoparticelle nei fluidi biologici

Un aspetto fondamentale che influenza la stabilità delle nanoparticelle è anche la loro interazione con le proteine che costituiscono i fluidi biologici al momento della somministrazione. In base alla natura delle nanoparticelle stesse, la presenza di proteine nei fluidi biologici potrebbe da un lato prevenire l'aggregazione creando un guscio intorno alle nanoparticelle ma

dall'altro lato potrebbe anche rappresentare un fattore di instabilità in quanto ne riduce la carica superficiale e ne aumenta il diametro idrodinamico.

La dimensione delle nanoparticelle viene comunemente valutata mediante strumenti che misurano il *dynamic light scattering* delle nanoparticelle in sospensione. Questi strumenti non possono essere utilizzati quando il mezzo all'interno del quale si vuole misurare la dimensione è un mezzo con un elevato contenuto particellare, ad esempio di proteine o di frammenti cellulari, come sono i fluidi biologici (*Gaumet, Vargas, et al., 2008*). L'elevato contenuto particellare potrebbe influenzare la corretta lettura del diametro delle nanoparticelle. Allo stesso tempo, la determinazione della dimensione delle nanoparticelle in contatto con i fluidi biologici è di fondamentale importanza perché, come già abbondantemente descritto, il comportamento *in vivo* delle nanoparticelle dipende anche dalla loro dimensione.

Nel laboratorio di Biochimica Generale e di Farmacia Fisica della Facoltà di Farmacia dell'Università di Gent (Belgio), dove ho trascorso alcuni mesi del periodo di dottorato, sono state messe a punto delle metodiche innovative che permettono la caratterizzazione dimensionale di nanoparticelle sospese in fluidi biologici.

In particolare, con la tecnica del *Fluorescent Single Particle Tracking* (fSPT) è possibile registrare il movimento di nanoparticelle fluorescenti che si muovono in modo casuale all'interno di un fluido (*Braeckmans, Buyens, et al., 2010, Braeckmans, Buyens, et al., 2010, Braeckmans, Vercauteren, et al., 2010*).

Gli strumenti utilizzati per questo tipo di esperimenti sono composti da:

- un microscopio a fluorescenza, sia esso confocale o a ampio campo;
- una camera molto sensibile capace di registrare i movimenti delle singole particelle.

Le fasi di un esperimento fSPT sono rappresentate in Figura 30. La prima fase dell'esperimento consiste nella registrazione dei filmati delle nanoparticelle in movimento (1). Le nanoparticelle vengono visualizzate come punti luminosi di intensità differente, dove l'intensità della fluorescenza corrisponde alla quantità di fluoroforo e quindi alla dimensione delle nanoparticelle. In seguito alla registrazione, i filmati vengono analizzati con particolari software che permettono in una prima fase di individuare le nanoparticelle all'interno del filmato (2), distinguendole dal background. Per fare questo, le nanoparticelle devono essere sufficientemente luminose e allo stesso tempo la concentrazione del campione analizzato non deve essere troppo elevata, per permettere di distinguere con precisione le singole particelle. Una volta individuate le nanoparticelle, è possibile tracciare il percorso di ciascuna di esse (3) e da questo ricavare la dimensione (4), in base alla viscosità del mezzo.

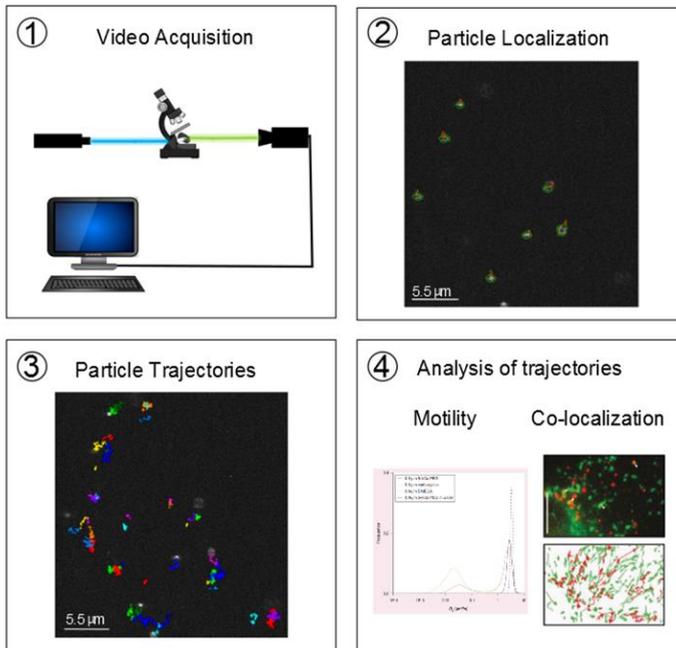


Figura 30: Schema delle fasi di un esperimento di fSPT (immagine realizzata da Elisa Zagato).

Le criticità principali di questa metodica sono innanzitutto la scelta del fluoroforo, che deve essere stabile nelle condizioni testate, non deve andare incontro a bleaching e deve essere molto luminoso (elevata *quantum yield*). Fluorofori con una bassa luminosità non permettono di individuare le nanoparticelle di dimensioni più piccole, determinando una sovrastimazione della misura. Il fenomeno di fotobleaching è da evitare per non incorrere nella perdita di segnale durante la registrazione del filmato. Altra criticità è la concentrazione del campione: campioni troppo concentrati rischiano di determinare un aumento eccessivo del rumore di fondo oltre a non permettere la chiara individuazione delle singole

particelle. Campioni troppo poco concentrati non permettono di ottenere un numero statisticamente significativo di tracciati (minimo 500 tracciati per ogni campione).

Considerando la necessità di avere nanoparticelle fluorescenti, solamente la formulazione di nanoparticelle ottenute con la miscela PLGA/ PEG-PLGA è stata analizzata, poiché è stato possibile funzionalizzare il polimero PEGilato con Rodamina B prima di realizzare le nanoparticelle. Di conseguenza, solo il lotto GE11-PLGA/ PEG-PLGA è stato sottoposto a caratterizzazione mediante fSPT.

Per questi esperimenti, le nanoparticelle sono state risospese in opportuno mezzo alla concentrazione prestabilita e successivamente stoccate per 1 h e per 4 h a 37°C al fine di simulare le condizioni di temperatura corporea. Il test è stato condotto in triplicato, stoccando in stufa a 37°C un campione diverso per ogni tempo considerato. Le registrazioni dei filmati sono state invece eseguite a 22,5°C. I fluidi considerati sono stati acqua, utilizzata come riferimento, siero fetale bovino (FBS), plasma umano e liquido sinoviale umano. I risultati ottenuti sono stati confrontati con la dimensione determinata mediante DLS di un lotto di nanoparticelle risospese in acqua e aventi la stessa composizione polimerica ma non marcate con RhB.

Il plasma umano è stato ricavato da campioni di sangue raccolti presso l'Ospedale Universitario di Gent da volontari sani. Il sangue è stato centrifugato a 1,7 rcf per 10 minuti per separare il plasma dalla parte corpuscolata. Il plasma è stato aliquotato e conservato a -25°C fino al momento dell'utilizzo. I campioni sono stati sottoposti a determinazione della viscosità prima dell'esperimento fSPT utilizzando un viscosimetro a

capillare (Lauda MGW S5). La viscosità del plasma umano calcolata è di 1,80 cP.

I campioni di liquido sinoviale sono stati donati dal reparto di reumatologia dell'Ospedale Universitario di Gent. I campioni utilizzati sono campioni di liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite indifferenziata<sup>14</sup>. Questo ha rappresentato una notevole variabilità nelle prove condotte con le nanoparticelle a causa della variazione della viscosità misurata: infatti, campioni diversi hanno dimostrato viscosità notevolmente differente (1,85 cP, 3,88 cP e 9,18 cP). Per questa ragione, si è ritenuto necessario misurare la viscosità di ogni campione di liquido sinoviale prima del suo utilizzo per gli esperimenti fSPT.

Le concentrazioni ottimali delle nanoparticelle da testare sono state settate in base al comportamento delle nanoparticelle stesse, come verrà descritto nella sezione dei risultati.

### 1.5.7 Citotossicità delle nanoparticelle a base di GE11

Le nanoparticelle allestite sono state sottoposte ad un test di citotossicità, condotto nel laboratorio di Neuroscienze Cellulari e Molecolari del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Pavia.

In particolare, la citotossicità delle nanoparticelle è stata valutata con un metodo colorimetrico (MTS test) utilizzando il kit CellTiter 96® AQueous One Solution, Cell Proliferation Assay (Promega, USA) in cui viene valutata

---

<sup>14</sup> Forma di artrite che non può essere classificata in nessuna forma di artrite nota ma che è comunque caratterizzata da una infiammazione, disfunzione motoria e danno articolare evidente mediante radiografia

la vitalità cellulare in seguito ad incubazione con un agente potenzialmente tossico, nel nostro caso le nanoparticelle. Il test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di convertire il reagente MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) in sali di formazano che risultano essere solubili nel normale mezzo di coltura delle cellule, dandone una tipica colorazione da giallo a marrone scuro. Tramite lettura fotometrica (assorbanza a 490 nm) è possibile quantificare i sali di formazano e di conseguenza il numero di cellule vitali. Esiste infatti una proporzionalità diretta tra il numero di cellule vitali e la quantità di cristalli di formazano prodotti.

Il test di vitalità cellulare è stato condotto su 3 differenti linee cellulari: HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) come controllo e due linee cellulari tumorali (A549 – carcinoma polmonare; Caki1 – carcinoma renale). Le cellule sono state seminate in una multiwell da 96 pozzetti (3000/5000 cellule per pozzetto) ed una volta adese alla superficie del pozzetto le cellule sono state starvate<sup>15</sup> per 24 ore in terreno allo 0,5% di siero prima di aggiungere le nanoparticelle. I campioni di nanoparticelle da analizzare (PLGA, GE11-PLGA e GE11-PLGA/ PEG-PLGA) sono stati diluiti nello stesso terreno in cui sono state starvate le cellule ottenendo delle sospensioni standard di nanoparticelle con una concentrazione compresa tra 0,1 µg/ml e 1 mg/ml; 100 µl della sospensione di nanoparticelle sono stati addizionati ad ogni pozzetto ed incubati per 48 ore a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Al termine, il mezzo è stato eliminato, le cellule sono state lavate con PBS e poi sono stati aggiunti 20 µl di reagente diluito 1:5 nel terreno di coltura: le cellule a

---

<sup>15</sup> Incubazione delle cellule in un mezzo di coltura caratterizzato da un ridotto contenuto di siero

contatto con il reagente sono state incubate per 2 ore a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, al riparo dalla luce, per favorire la formazione dei cristalli di formazano. Alla comparsa della colorazione, i campioni sono stati letti allo spettrofotometro a 490 nm. I risultati sono stati espressi come % di cellule vitali rispetto al controllo, rappresentato da cellule alle quali non vengono aggiunte le nanoparticelle.

### 1.5.8 Uptake cellulare

Il vantaggio dell'uso dei sistemi nanoparticellari "vettorizzati" è quello di poter indirizzare l'azione terapeutica verso un determinato bersaglio, grazie al rilascio del farmaco veicolato nelle nanoparticelle in maniera selettiva nelle cellule di interesse. I sistemi nanoparticellari sono intrinsecamente caratterizzati dalla capacità di poter penetrare all'interno delle cellule, favorendo così l'*uptake* di molecole attive che altrimenti non verrebbero captate o verrebbero rapidamente degradate, come il DNA. Funzionalizzando i sistemi nanoparticellari con agenti di direzionamento attivo, il processo di *uptake* delle nanoparticelle diventa più veloce, perché spesso sono coinvolti meccanismi attivi di internalizzazione, più duraturo nel tempo e mirato soprattutto verso le cellule bersaglio. Per fare questo, i sistemi nanoparticellari definiti *smart* devono riconoscere alcuni bersagli sulla membrana cellulare, come recettori o proteine di membrana. È questo il caso del peptide GE11 che riconosce in maniera selettiva il recettore EGFR e può quindi fungere da agente di direzionamento attivo riconoscendo le cellule che sovraesprimono EGFR.

Pertanto, l'obiettivo del test di *cellular uptake* è quello di valutare la cinetica con cui i sistemi nanoparticellari a base di GE11-PLGA vengono captati all'interno delle cellule che sovraesprimono EGFR.

Prima di eseguire il test di uptake, si è ritenuto necessario verificare che le cellule utilizzate esprimessero effettivamente il recettore EGFR in maniera significativamente maggiore rispetto a cellule controllo (*Maya, Sarmento, et al., 2014*). Per fare questo, le cellule A549 (carcinoma polmonare) sono state trattate con un anticorpo primario anti-EGFR marcato con FITC (Anti-EGFR antibody [ICR10] (FITC) (ab11400), Abcam, UK); come controllo sono state utilizzate le cellule JAWS II, monociti. Nello specifico,  $10^6$  cellule sono state risospese nel tampone adatto alla misurazione con citofluorimetro (FACS buffer: PBS, 1% FBS, 0.09%  $\text{NaN}_3$ , Gibco); dopo successivi lavaggi, 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione di anticorpo 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sono stati aggiunti alle cellule in sospensione e lasciati in incubazione per almeno 30 minuti a 4°C. Al termine del tempo di incubazione, le cellule sono state sottoposte a cicli consecutivi di lavaggi per eliminare la porzione di anticorpo non reagita e poi sottoposte a quantificazione della fluorescenza mediante citofluorimetro (FACSCalibur, BD Bioscience) in seguito ad eccitazione a 488 nm. I risultati sono espressi come confronto rispetto a cellule non trattate con anticorpo. Il test di cellular uptake è stato condotto seminando circa 50000 cellule per pozzetto di una multiwell da 8, con fondo in vetro, ed incubate con RPMI 10% FBS a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Successivamente, 0,250 ml di una sospensione di nanoparticelle a base GE11-PLGA/ PEG-PLGA-RhB 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sono stati aggiunti alle cellule e le nanoparticelle sono state lasciate in incubazione a contatto con le cellule per i tempi prefissati (0,5, 1, 2, 4 e 24 ore). Al

termine del periodo di incubazione, le cellule sono state fissate con una soluzione di PFA 2% e il nucleo delle cellule è stato colorato con 0,6 µl di una soluzione di HOECHST in PBS. Le cellule sono state successivamente visualizzate con un microscopio confocale a fluorescenza (Nikon, TE 2000) e il quantitativo di nanoparticelle internalizzato nelle cellule è stato quantificato a partire dalla fluorescenza emessa dalle nanoparticelle utilizzando il software Image J. Il test è stato condotto utilizzando come confronto nanoparticelle di PLGA/PEG-PLGA non targettizzate con GE11. Inoltre, lo stesso test è stato condotto anche mantenendo le cellule in incubazione a 4°C così da inibire i meccanismi di *uptake* attivi, ad esempio quelli mediati dai recettori. In questo modo è possibile valutare se l'*uptake* delle nanoparticelle dipende da un meccanismo attivo o passivo.

#### 1.5.9 Caratterizzazione dei lotti caricati con il farmaco modello (DXM): determinazione del contenuto di farmaco

I lotti di nanoparticelle caricate con DXM sono stati analizzati al fine di definire quale protocollo fosse più efficace nel caricamento dell'attivo. Per quanto riguarda la determinazione del DXM incapsulato, in letteratura sono disponibili diversi metodi che prevedono i) la determinazione diretta del contenuto di DXM nelle nanoparticelle andando a solubilizzare le nanoparticelle liofilizzate in acetonitrile (*Dawes, Fratila-Apachitei, et al., 2009*) oppure ii) la determinazione indiretta, cioè sulla quantità di DXM rimasta nella fase acquosa esterna al momento della preparazione delle nanoparticelle (*Gomez-Graete, Tsapis, et al., 2007*). In fase preliminare,

sono stati utilizzati entrambi i metodi, al fine di selezionare la metodica più opportuna. Un'ulteriore analisi è stata condotta sui filtri utilizzati per purificare le nanoparticelle dai cristalli di DXM.

In tutti i casi, il DXM è stato analizzato mediante metodica HPLC, nelle seguenti condizioni (*Gomez-Graete, Tsapis, et al., 2007*): Colonna: C18 Zorbax Eclipse plus, 4,6 x 15 cm, 5 µm; Fase mobile: 40:60 A:B, dove A= ACN e B= H<sub>2</sub>O, 1 ml/min; Lunghezza d'onda: 238nm.

La durata della corsa analitica è di 10 minuti, in cui il picco del DXM esce intorno a 4 minuti. La curva di calibrazione è stata preparata solubilizzando DXM in acetonitrile a diverse concentrazioni; si osserva un andamento lineare della concentrazione del DXM rispetto all'assorbanza ( $y=52,31x + 1,35$ , R<sup>2</sup> 0,99977) in un *range* di concentrazioni compreso tra 0,8 e 26 µg/ml.

Per quantificare il DXM rimasto sui filtri, i filtri utilizzati per la preparazione delle nanoparticelle sono stati immersi in 5 ml di acetonitrile e lasciati per 1 h in incubazione per permettere la completa solubilizzazione del DXM. La soluzione di acetonitrile è stata analizzata mediante HPLC.

Per quanto riguarda il metodo indiretto di quantificazione del contenuto del DXM nelle nanoparticelle, un'aliquota di soluzione acquosa di PVA è stata prelevata e il PVA è stato fatto precipitare per aggiunta di acetonitrile (volume doppio rispetto al volume della soluzione di PVA). Filtrando la soluzione H<sub>2</sub>O:acetonitrile, è possibile eliminare i residui di PVA; il filtrato è stato analizzato mediante metodica HPLC riportata precedentemente.

Infine, per quanto riguarda la determinazione diretta del *drug content*, protocolli riportati in letteratura prevedono la solubilizzazione di una

quantità di nanoparticelle liofilizzate in acetonitrile (5 ml). La soluzione così ottenuta viene analizzata con HPLC. I lotti di nanoparticelle realizzati con la metodica della nanoprecipitazione utilizzando DMSO come solvente, non sono completamente solubili in acetonitrile. Per questa ragione è stato ottimizzato un protocollo diretto alternativo per la determinazione del DXM incapsulato. Diversi solventi organici sono stati considerati ma solo il DMSO si è rivelato il solvente opportuno per la completa solubilizzazione delle nanoparticelle. Secondo il protocollo ottimizzato, 20 mg di nanoparticelle liofilizzate sono state solubilizzate in 1 ml di DMSO sotto agitazione magnetica. Successivamente, 3 ml di metanolo sono stati aggiunti alla soluzione polimerica in DMSO al fine di determinare la precipitazione del polimero: infatti, all'aggiunta del metanolo la soluzione polimerica diventa opalescente. La sospensione è stata centrifugata 30 minuti a 16400 rpm a 4°C per permettere la separazione del polimero precipitato dal DXM in soluzione. Il surnatante è stato recuperato ed analizzato mediante il metodo HPLC opportuno. I risultati sono espressi come rapporto tra la quantità di DXM realmente incapsulata e il peso delle nanoparticelle cariche (*drug content*).

#### 1.5.10 Test di rilascio *in vitro* del DXM dalle nanoparticelle

Il test di rilascio *in vitro* è stato condotto sulle nanoparticelle fresche caricate con DXM. In particolare, le nanoparticelle al termine del tempo di curing sono state centrifugate per eliminare i residui di PVA. Il pellet è stato successivamente risospeso in tampone HEPES pH 7,5 (1 ml) e le

nanoparticelle così risospese sono state lasciate sotto agitazione basculante per diversi intervalli di tempo (3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 e 90 minuti, 2, 4, 6 e 24 ore). Un singolo campione corrisponde ad ogni intervallo di tempo. Ai tempi prestabiliti, le nanoparticelle in sospensione sono state centrifugate (30 minuti, RT, 16400 rpm), tutto il surnatante è stato recuperato ed analizzato per quantificare l'attivo rilasciato.

Il DXM è stato quantificato mediante HPLC con lo stesso metodo analitico descritto nel paragrafo precedente. La curva di calibrazione è stata fatta con soluzioni di DXM in HEPES comprese tra 1,375 µg/ml e 22µg/ml, considerando la solubilità del DXM in HEPES (74 µg/ml). In questo range di concentrazioni si è osservata una buona linearità tra la concentrazione e l'area del picco ( $y=49,637x + 0,5841$ ;  $R^2=0,9998$ ).

## 2. RISULTATI

### 2.1. GE11: resa di processo, purezza e identità del peptide

Il processo di sintesi descritto è caratterizzato da una resa del 45% p/p e il peptide ottenuto ha dimostrato una purezza superiore al 95% p/p.

L'identità del peptide e la massa sono state valutate mediante analisi alla spettrometria di massa MALDI-TOF (Bruker Microflex LT Spectrometer) (Fig. 31), realizzata utilizzando due matrici differenti (acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico (4-HCCA) e acido sinapinico (SIN)), in cui è possibile distinguere il picco corrispondente al peso molecolare del peptide (1541 g/mol), in entrambi gli spettri realizzati utilizzando due matrici differenti per l'analisi.

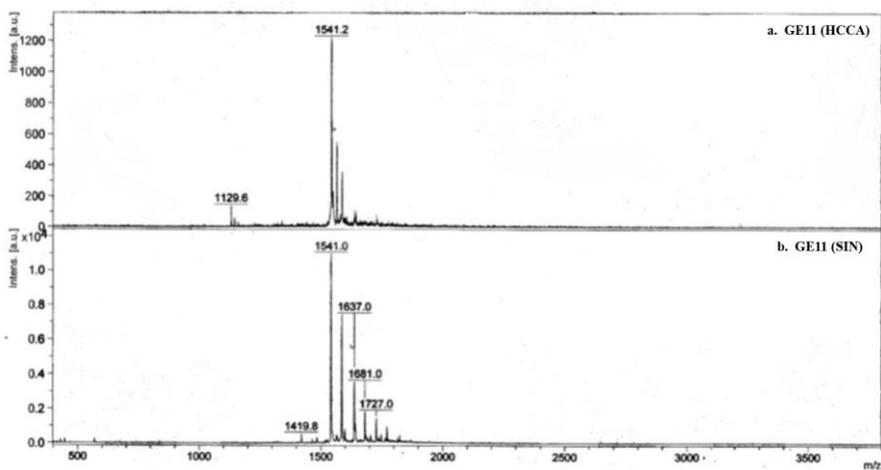


Figura 31: Spettri di massa del peptide GE11 (Maldi-TOF) realizzati con due matrici differenti a) acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico (4-HCCA) e b) acido sinapinico (SIN).

## **2.2. GE11-PLGA: determinazione del grado di funzionalizzazione e comportamento termico**

### 2.2.1 Determinazione del grado di funzionalizzazione del polimero

Il grado di funzionalizzazione del PLGA con il peptide GE11 è stato quantificato e confermato con diverse metodiche.

In Figura 32 è riportato lo spettro  $^1\text{H}$  NMR del PLGA puro (nero) e del coniugato GE11-PLGA (rosso), registrato a 400 MHz in  $\text{d}_6$ -DMSO a 50°C. Si può confermare una modificazione del profilo NMR del coniugato rispetto al PLGA tal quale grazie alla presenza del segnale tipico dei gruppi aromatici del peptide (3 residui di Tirosina e 1 di Triptofano) intorno a 7 ppm, che risulta essere assente nello spettro del PLGA. Andando a confrontare l'integrazione dei picchi tipici del polimero e quelli del peptide e considerando che ad ogni catena di PLGA si lega una sola molecola di GE11, è possibile calcolare il grado di funzionalizzazione del PLGA. In particolare, il picco nella regione dei gruppi aromatici viene confrontato con il picco del C terziario del lattide (5 ppm). Da questa integrazione si ricava che la resa di funzionalizzazione corrisponde al 95%, rispetto al totale dei gruppi carbossilici liberi. Un'analisi analoga era stata condotta anche sul coniugato FQPV-PLGA (verde): dallo spettro relativo, si osserva ancora la presenza dei segnali nella regione dell'aromatico (fenilalanina del peptide) e dall'integrazione dei picchi è possibile calcolare una resa di funzionalizzazione del 70-80%. In questo caso, è stato anche possibile

confermare l'effettiva formazione di un nuovo legame covalente grazie alla modificazione del picco del peptide.

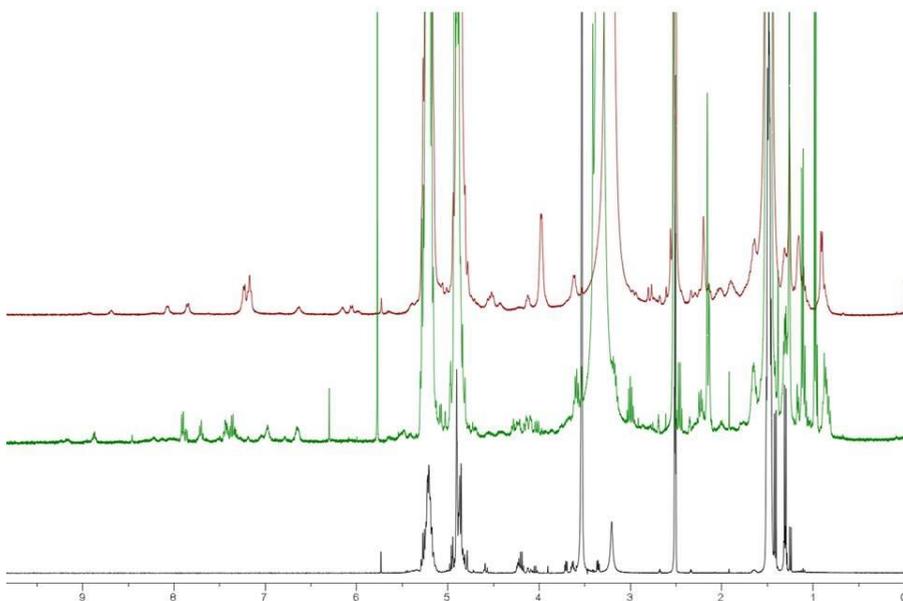


Figura 32: Spettro NMR del PLGA (nero) in confronto a GE11-PLGA (rosso) e FQPV-PLGA (verde).

I risultati ottenuti mediante analisi NMR sono stati confermati con analisi al fluorimetro condotto su un campione del coniugato GE11-Fluo-PLGA, come descritto precedentemente.

Dai risultati della caratterizzazione mediante GPC (Fig. 33) si osserva il picco del PLGA a circa 23 minuti (MW= 26000 Da) e del GE11 a 32 minuti (MW=1540 Da), in accordo con il rispettivo peso molecolare. La presenza del picco del GE11 libero sta ad indicare la presenza di una frazione del peptide non legata al polimero, ma probabilmente adsorbita e non

perfettamente eliminata dai lavaggi del polimero. Con il metodo delle aggiunte standard è stato comunque possibile determinare la concentrazione corrispondente a questo picco e da questo calcolare l'effettiva funzionalizzazione del polimero che risulta essere intorno al 85%. Nonostante questo, il grado di funzionalizzazione del polimero si mantiene oltrei valori accettabili.

Un'altra importante osservazione è che il coniugato GE11-PLGA presenta un picco ad un tempo di ritenzione diverso rispetto al picco del PLGA (25 min) che corrisponde a valori di peso molecolare più bassi (11800 Da). È come se il processo di funzionalizzazione, quindi il trattamento con solventi organici di natura diversa, determinasse una scissione delle catene polimeriche con conseguente riduzione del peso molecolare (MW).

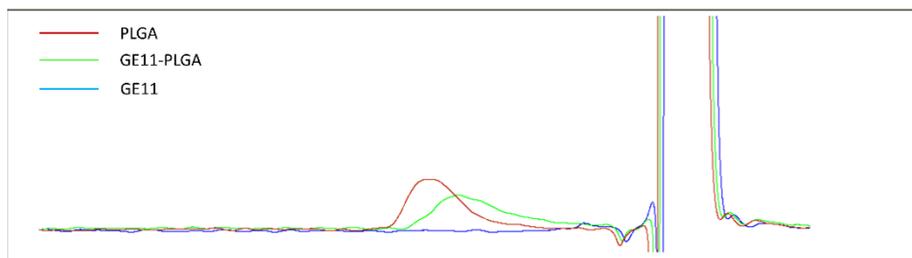


Figura 33: Cromatogramma GPC del PLGA (rosso), GE11-PLGA (verde) e GE11 (blu).

### 2.2.2 Comportamento termico del coniugato GE11-PLGA

La Figura 34 mostra i tracciati DSC di GE11, GE11-PLGA e PLGA, sia in prima che in seconda rampa di riscaldamento.

Il GE11 (tracciato verde, Fig. 34 a e b) manifesta un picco endotermico a 45,72°C che è attribuibile alla perdita di massa del peptide stesso per disidratazione in seguito a riscaldamento, come confermato anche dall'analisi con TGA (Fig. 35). Quest'ultima analisi infatti dimostra una perdita di massa pari al 3,1% del peso del campione. Il picco del GE11 è evidente solo nella prima rampa di riscaldamento, trattandosi di una perdita di massa dovuta a disidratazione e quindi di un fenomeno irreversibile.

Il PLGA (rosso, Fig. 34) ha il tipico comportamento dei polimeri semicristallini come i poliesteri alifatici: si registra infatti un picco endotermico a 45-46°C sia nella prima che nella seconda rampa, corrispondente alla transizione vetrosa del polimero e ad un rilassamento endotermico (quest'ultimo non evidente in seconda rampa). La TGA eseguita sul campione non ha evidenziato nessuna perdita di massa (dati non riportati).

Il comportamento del GE11-PLGA (blu, Fig. 34) non si è dimostrato così diverso rispetto al PLGA secondo analisi DSC: anche in questo caso è evidente un picco endotermico a 49-50°C, leggermente spostato verso temperature più alte rispetto al PLGA. Il picco endotermico è accompagnato anche da una perdita di massa, come evidenziato dall'analisi termogravimetrica, dovuta alla disidratazione del peptide GE11. In questo caso, l'entità di riduzione della massa è quantitativamente meno significativa rispetto al solo GE11 (1,3% del peso del campione) (Fig. 35). Questi risultati dimostrano che la funzionalizzazione del polimero PLGA con

il peptide GE11 non modifica in maniera significativa il comportamento termico del polimero stesso.

I risultati precedentemente descritti sono stati confermati anche da un'analisi DSC modulata (*tracciati non riportati*).

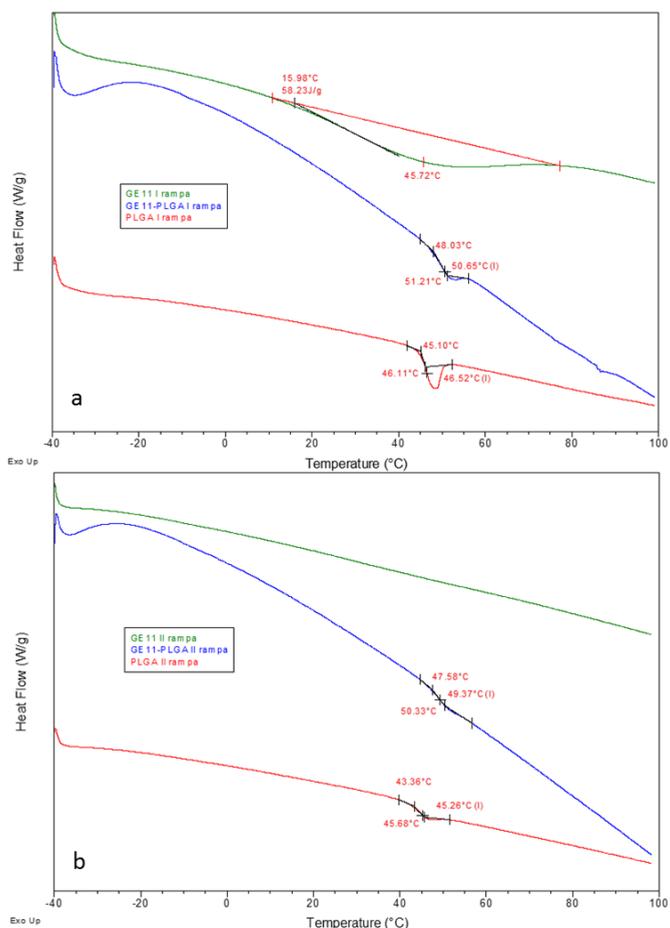


Figura 34: Risultati dell'analisi DSC condotta su GE11 (verde), GE11-PLGA (blu) e PLGA (rosso), sia in prima (a) che in seconda (b) rampa di riscaldamento.

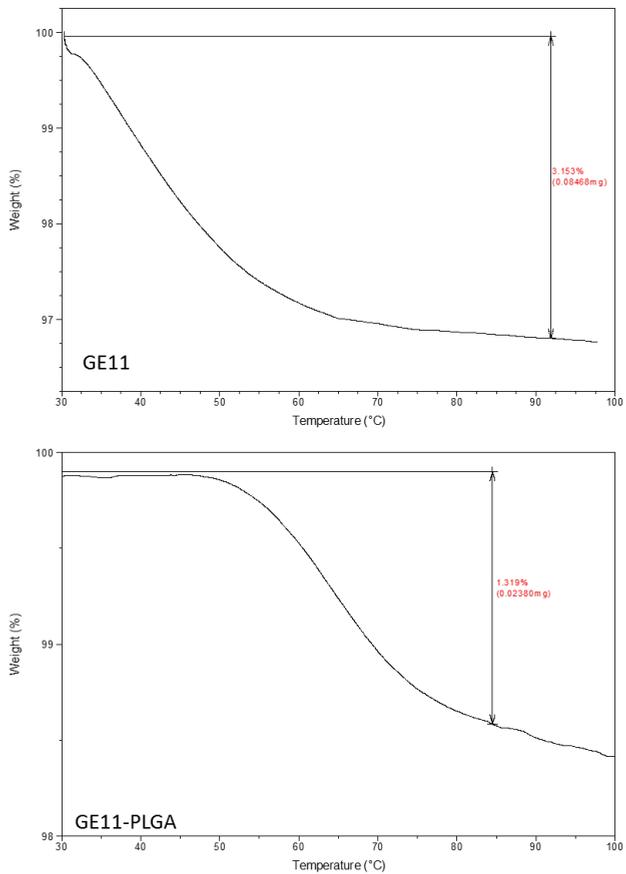


Figura 35: Risultati dell'analisi mediante TGA condotta su GE11 e GE11-PLGA.

## **2.3 Realizzazione delle nanoparticelle polimeriche**

### 2.3.1 Realizzazione di nanoparticelle di PEG-PLGA e ottimizzazione del protocollo di preparazione

Come ampiamente descritto nei capitoli precedenti, i polimeri PEGilati rappresentano i polimeri di elezione per la realizzazione di nanoparticelle, soprattutto di nanoparticelle targettizzate. È per questa ragione che le nanoparticelle di PLGA-PEG (7525 DLG 3C PEG 6000, PM 36 kDa, Lakeshore Biomaterials – Surmodics Pharmaceuticals, Birmingham, AL) sono state utilizzate come confronto alle nanoparticelle realizzate a partire dal coniugato GE11-PLGA, obiettivo della ricerca. Questo polimero è stato sfruttato per eseguire un'accurata ottimizzazione del protocollo di realizzazione delle nanoparticelle, al fine di valutare e selezionare tutte le variabili di processo necessarie a ottenere un processo robusto. La scelta dei parametri di processo ottimali si è basata sulla caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle, con l'obiettivo di ottenere nanoparticelle di dimensioni opportune e con una buona distribuzione dimensionale.

Le nanoparticelle sono state allestite con due metodiche differenti, i) la tecnica della nanoprecipitazione e ii) quella dell'emulsione semplice con evaporazione del solvente.

La tecnica della nanoprecipitazione è stata sviluppata solubilizzando il polimero in un solvente miscibile in acqua (acetone) e gocciolando la soluzione polimerica così ottenuta all'interno di una soluzione acquosa di

PVA sotto agitazione. In Tabella V sono riportate le variabili di processo considerate (concentrazione del polimero e rapporto volumetrico tra la soluzione polimerica e la soluzione di PVA) e la relativa analisi dimensionale al termine del tempo di *curing* (4 ore, a 700 rpm con agitazione magnetica) dei lotti realizzati.

Tabella V: Condizioni operative per la realizzazione di lotti di nanoparticelle ottenuti mediante la metodica della nanoprecipitazione e risultato dell'analisi dimensionale.

#	Conc. Polim. (mg/ml)	Solvente	Concentrazione PVA (%, p/v)	Rapporto Polimero: PVA v:v	Dimensioni (nm ± ds)	PI
22	10	acetone	1	1:1	51,8±29,9	0,334
23	10	acetone	1	1:2	45,1±22,7	0,253
24	5	acetone	1	1:1	44,9±24,9	0,308
25	5	acetone	1	1:2	49,0±22,8	0,215
26	15	acetone	1	1:2	67,3±22,8	0,115
27	20	acetone	1	1:2	64,2±33,3	0,268
28	30	acetone	1	1:2	59,6±24,9	0,174
29	40	acetone	1	1:2	66,1±24,3	0,136
30	50	acetone	1	1:2	70,9±24,2	0,120

Come possiamo osservare dalla Tabella V, la dimensione delle nanoparticelle risulta essere intorno ai 50 nm per tutti i lotti realizzati, senza un'influenza significativa della concentrazione del polimero in

soluzione. È interessante osservare invece l'effetto del volume di PVA utilizzato: all'aumentare del volume di PVA si registra una riduzione dell'indice di polidispersità, ad indicare la realizzazione di lotti con una ottima distribuzione dimensionale (ad esempio, lotti #22 e #23, l'indice di polidispersità viene ridotto da 0,334 a 0,253 aumentando il volume di PVA). Considerando la concentrazione del polimero, è evidente come una troppo bassa concentrazione polimerica risulti in lotti di nanoparticelle polidispersi, al contrario di quanto si osserva per concentrazioni polimeriche più elevate (15, 20, 30, 40, 50 mg/ml). Alla fine dello studio di ottimizzazione, il protocollo di preparazione delle nanoparticelle selezionato è quello corrispondente al lotto #26, in cui la concentrazione polimerica selezionata è 15 mg/ml e un rapporto 1:2 v:v tra la soluzione di polimero e quella di PVA. 15 mg/ml è la concentrazione che in effetti ha portato ad ottenere nanoparticelle con buone dimensioni e una omogenea distribuzione dimensionale ( $67,3 \pm 22,8$  nm; PI 0,115). Le concentrazioni di polimero più elevate sono state scartate perché non davano significativi vantaggi sulle dimensioni delle nanoparticelle; inoltre, un'elevata concentrazione di polimero potrebbe rallentare eccessivamente la cessione dell'attivo veicolato nei sistemi nanoparticellari. Di seguito, sono riassunte brevemente le fasi di processo selezionate per ottenere le nanoparticelle con la tecnica della nanoprecipitazione:

- *Solubilizzare il polimero in 5 ml di acetone alla concentrazione di 15 mg/ml;*
- *Aggiungere 700  $\mu$ l di etanolo e agitare con vortex;*

- *Versare la soluzione polimerica in 10 ml di PVA 1% p/v, mantenendo il sistema sotto agitazione magnetica vigorosa (700 rpm) per 4 ore.*

Utilizzando la seconda metodica (emulsione semplice con evaporazione del solvente) le nanoparticelle sono state realizzate solubilizzando il polimero in un solvente immiscibile con acqua,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , che è stato successivamente allontanato per evaporazione al fine di ottenere le nanoparticelle. Anche in questo caso, sono stati valutati diversi parametri di processo (concentrazione, velocità e tempo di agitazione mediante Ultra-turrax) e selezionati in base alle dimensioni delle nanoparticelle ottenute (Tab. VI).

Tabella VI: Condizioni operative per le realizzazioni di lotti di nanoparticelle ottenuti mediante la metodica della emulsione semplice/ evaporazione del solvente e risultato dell'analisi dimensionale.

#	Conc Polim. (mg/ml)	Agitazione		Dim. (nm ± ds)	PI	Tempo di curing (min)	Dim. (nm ± ds)	PI
		Velocità (rpm)	Tempo (min)					
31	20	6500	10	392,5 ±223,6	0,526	O.N.*	634,6 ±454,9	0,514
32	20	6500	20	436,4 ±281,1	0,417	O.N.	891,2 ±597,9	0,450
33	20	6500	60	521,7 ±341,4	0,434	O.N.	944,8 ±637,7	0,453
34	20	6500	120	511,4 ±355,9	0,484	O.N.	693,7 ±472,4	0,464
35	20	6500	240	478,5 ±363,9	0,576	O.N.	474,3 ±353,8	0,557
36	20	13500	240	154,7 ±124,2	0,645	O.N.	178,6 ±139,3	0,608
37	15	13500	240	134,2 ±69,4	0,267	O.N.	128,4 ±55,9	0,190

\*Over Night

Dai risultati elencati in tabella, si può osservare come mantenendo il sistema per un tempo più prolungato sotto agitazione (Ultraturrax) sia possibile ottenere nanoparticelle stabili anche dopo il tempo di *curing*. Come si può verificare per il lotto #35, in cui le dimensioni delle nanoparticelle sono pressochè invariate al termine dell'agitazione e dopo *curing overnight* a 25°C, a differenza dei lotti ottenuti con un tempo di agitazione inferiore (#31, #32, #33, #34). Probabilmente, il tempo di agitazione è necessario per dare alle nanoparticelle una dimensione e una struttura più stabili intanto che il solvente inizia ad evaporare. Questo comportamento è ulteriormente confermato quando si utilizza una velocità di agitazione maggiore (13500 anzichè 6500 rpm). Inoltre, con velocità di agitazione maggiori la dimensione delle nanoparticelle si stabilizza su valori inferiori (#36 154,7±124,2, PI 0,645). Il problema di questi lotti è la disomogeneità dimensionale, ma andando a ridurre la concentrazione del polimero a 15 mg/ml, si ottengono nanoparticelle di buone dimensioni, monodisperse e stabili (#37, 134,2±69,4 nm, PI 0,267 dopo agitazione, 128,4±55,9 nm, PI 0,190 dopo *curing overnight*).

Come è possibile osservare, questa metodica permette di ottenere nanoparticelle con dimensioni maggiori rispetto alla metodica della nanoprecipitazione utilizzando la stessa concentrazione polimerica (15 mg/ml), pur presentando dimensioni accettabili in vista dell'applicazione delle nanoparticelle.

Il protocollo definitivo per ottenere nanoparticelle con la tecnica dell'emulsione semplice con evaporazione del solvente può essere così riassunto:

- *Solubilizzare il polimero in 5 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> alla concentrazione di 15 mg/ml;*
- *Gocciolare la soluzione polimerica in 10 ml di PVA 1% sotto agitazione (Ultraturrax, 13500 rpm);*
- *Mantenere il sistema sotto agitazione nelle medesime condizioni per 4 ore, conservando il sistema in un bagno di ghiaccio per evitare il riscaldamento del polimero;*
- *Trasferire il sistema su un agitatore magnetico a 700 rpm per 12 ore a 25°C per permettere la completa evaporazione del solvente.*

Una parte consistente del lavoro ha riguardato anche l'ottimizzazione del processo di recupero delle nanoparticelle ottenute con entrambi i metodi, al fine di garantire una buona resa di processo e mantenere la stabilità e la risospesibilità delle nanoparticelle stesse. Per entrambe le metodiche considerate si sono ottenute rese di processo pari al 58,33±1,05 %, in seguito a 30 minuti di ultra-centrifuga a 40000 rpm a 4°C (Ultracentrifuga Beckman LE80, rotore 70Ti).

Per quanto riguarda la carica superficiale, le nanoparticelle di PLGA hanno manifestato un potenziale zeta di -12,3±5,4 mV.

### 2.3.2 Realizzazione di nanoparticelle di PLGA

I protocolli di preparazione delle nanoparticelle selezionati ed ottimizzati con il polimero PEGilato (vedi paragrafo precedente) sono stati utilizzati

anche per la preparazione di nanoparticelle di PLGA non PEGilato (7525 DLG 3A, PM 36 kDa, Lakeshore Biomaterials – Surmodics Pharmaceuticals, Birmingham, AL). Il PLGA utilizzato è caratterizzato dalla presenza del gruppo carbossilico terminale libero, disponibile per la formazione del legame ammidico con il gruppo amminico del peptide.

Nella Tabella VII sono riportati i lotti di nanoparticelle preparati con la tecnica della nano precipitazione (ogni lotto è stato preparato almeno in triplicato).

Tabella VII: Condizioni operative per le realizzazione di lotti di nanoparticelle ottenuti mediante la metodica della nanoprecipitazione e risultato dell'analisi dimensionale.

#	Conc. Polim. (mg/ml)	Solv.	Conc. PVA (% p/v)	Rapporto Polimero: PVA v:v	Curing Time (h)	Dim. (nm ± ds)	PI
38	15	Acetone	1	1:2	4	140,8 ±54,4	0,150
39	15	DMSO	1	1:2	4	143,7 ±62,3	0,188

Le condizioni operative utilizzate sono le stesse selezionate per la realizzazione di nanoparticelle con il polimero PEG-PLGA. Le nanoparticelle di PLGA, ottenute secondo la tecnica della nanoprecipitazione, presentano dimensioni significativamente maggiori rispetto alle nanoparticelle a base di PEG-PLGA (circa 140 nm dopo lavaggio per eliminazione del PVA per il

PLGA, lotto #38, rispetto ai 50 nm delle nanoparticelle di PLGA-PEG, lotto #26).

La tecnica sopradescritta, nelle medesime condizioni operative, ha permesso inoltre di preparare nanoparticelle a base di PLGA utilizzando dimetilsolfossido (DMSO) per la solubilizzazione del polimero, consentendo di ottenere nanoparticelle di dimensioni accettabili per gli obiettivi fissati (lotto #39, Tab. VII), senza significative differenze rispetto all'uso dell'acetone come solvente.

La tecnica dell'emulsione semplice con evaporazione del solvente invece si è dimostrata inadatta alla realizzazione di nanoparticelle con una dimensione accettabile per l'uso proposto: le dimensioni delle nanoparticelle infatti erano intorno agli 800 nm. Di conseguenza, questa metodica è stata scartata.

Questi risultati confermano le differenze significative tra il polimero PEGilato e quello non PEGilato, probabilmente a causa della diversa idrofilia dei due polimeri considerati.

Anche per questi lotti, le nanoparticelle realizzate sono state successivamente centrifugate per eliminare la soluzione di PVA e per recuperare solo le nanoparticelle al fine di quantificare la resa di processo. Come visto precedentemente, la resa di processo si è dimostrata intorno al 50%.

Il potenziale zeta delle nanoparticelle è  $-17,7 \pm 4,4$  mV, compatibilmente con la presenza di gruppi carbossilici liberi all'estremità della catena polimerica.

### 2.3.3 Realizzazione di nanoparticelle modello utilizzando il peptide FQPV

#### Nanoparticelle a base del coniugato FQPV-PLGA

Come già accennato precedentemente, il coniugato ottenuto con il peptide modello FQPV-PLGA presenta notevoli differenze in termini di solubilità rispetto al PLGA, dimostrandosi insolubile in acetone. Per questo motivo le nanoparticelle modello a base di FQPV-PLGA sono state realizzate utilizzando il DMSO come solvente. Gli altri parametri di processo come concentrazione del polimero, tempo e velocità di agitazione sono stati mantenuti i medesimi dei lotti precedenti.

In Tabella VIII vengono riportati i risultati dell'analisi dimensionale del lotto allestito con il coniugato FQPV-PLGA (#40), che si mantengono adatti agli obiettivi del lavoro. Nella stessa tabella è anche indicato il grado di caricamento delle nanoparticelle con FQPV, così come calcolato dalla caratterizzazione NMR del polimero.

Tabella VIII: Lotto di nanoparticelle realizzate secondo la tecnica della nanoprecipitazione utilizzando il coniugato FQPV-PLGA e il DMSO come solvente (lotti preparati in triplicato).

<b>Lotto #</b>	<b>Dimensioni (nm ± ds)</b>	<b>PI</b>	<b>FQPV caricato (FQPV:PLGA, p:p)</b>
<b>40</b>	202,3±73,8	0,133	0,0163 (1:61,47)

Oltre alla classica tecnica della nanoprecipitazione descritta, un'ulteriore metodica è stata sviluppata: questa metodica è stata definita "ibrida" in quanto il polimero è stato solubilizzato in un miscela di Acetone:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  per garantire la solubilità del polimero e una buona dimensione delle nanoparticelle. Il metodo è stato ottimizzato grazie alla progettazione di un disegno sperimentale, fattoriale completo, che ha reso possibile una razionale valutazione dei fattori e delle relative interazioni sul risultato finale, cioè ottenere nanoparticelle di dimensioni inferiori ai 250 nm.

Per la realizzazione di queste nanoparticelle, la concentrazione di polimero è stata mantenuta a 15 mg/ml come ottimizzato; anche il volume della soluzione di PVA è stato mantenuto fisso a 10 ml. Tutti gli altri fattori (solvente, volume della soluzione polimerica e concentrazione di PVA) sono stati variati secondo quanto indicato dal disegno sperimentale. In Tabella IX è schematizzato il disegno sperimentale e sono riportati i risultati dell'analisi dimensionale di ogni lotto di nanoparticelle realizzato. 1 e -1 rappresentano rispettivamente il valore massimo e il valore minimo assunti da ciascun fattore. I valori entro cui sono stati variati i fattori, che corrisponde alla "design area", sono schematizzati nei metodi.

Tabella IX: Schema del disegno sperimentale e relativa analisi dimensionale dei lotti allestiti.

Fattori			Risposta
X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y
% v/v di acetone	% p/p	ml	nm
1	1	1	234,4
-1	1	1	532,7
-1	-1	1	1052,2
-1	-1	-1	419,9
1	-1	1	300,1
0	0	0	353,2
-1	1	-1	717,0
1	1	-1	327,8
1	-1	-1	1020,3
0	0	0	327,2

Dopo aver eseguito le prove, i risultati dell'analisi dimensionale condotta sulle nanoparticelle realizzate con le condizioni indicate nel disegno sono stati analizzati da un punto di vista statistico. L'analisi ha permesso di individuare due fattori che sono statisticamente significativi sul risultato finale: il solvente e la concentrazione del PVA. Essi infatti presentano una p-value inferiore a 0,05 indicando che essi sono significativamente diversi da zero al livello di confidenza del 95,0%. Il disegno ha un R<sup>2</sup> pari a 95,5622, indicando che il modello spiega il 95,5622% della variabilità della risposta

dimensione. I risultati del disegno sperimentale sono rappresentati graficamente dal diagramma di Pareto (Fig. 36). In questo grafico i fattori sono rappresentati come blocchi: i due fattori statisticamente significativi (solvente e concentrazione di PVA) hanno una dimensione tale da superare la linea che corrisponde all'intervallo del 95% di confidenza. Inoltre, si osserva come entrambi i fattori considerati hanno un effetto negativo sulla dimensione delle nanoparticelle, vale a dire che all'aumentare della percentuale di acetone aggiunta e all'aumentare della concentrazione di PVA le dimensioni delle nanoparticelle diminuiscono. Nessuna delle interazioni dei fattori considerati sembra avere una significatività statistica sulle dimensioni delle nanoparticelle.

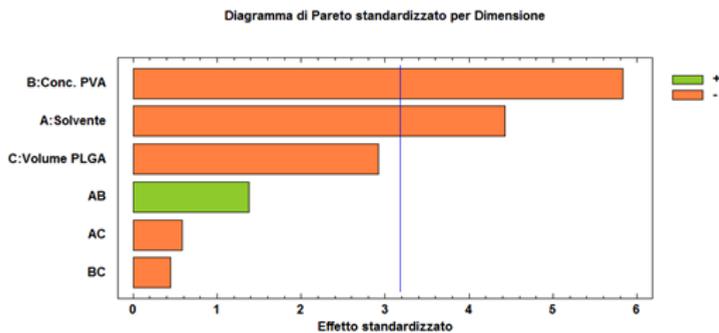


Figura 36: Diagramma di Pareto rappresentante i risultati del disegno fattoriale di screening realizzato per ottimizzare la preparazione delle nanoparticelle di PLGA.

Da questo disegno è stato possibile selezionare le condizioni per la realizzazione delle nanoparticelle con una metodica "ibrida" in cui il  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  favorisce la completa solubilizzazione del coniugato FQPV-PLGA mentre

l'acetone aiuta a ridurre la dimensione delle nanoparticelle. Di seguito, un breve schema del protocollo così ottimizzato (#41):

- *Solubilizzare il polimero in 5 ml di una miscela di acetone:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 80:20 v:v;*
- *Gocciolare la soluzione così ottenuta in 10 ml di una soluzione acquosa di PVA al 0,6% p/p, sotto agitazione vigorosa (13500 rpm) per 10 minuti;*
- *Trasferire la sospensione di nanoparticelle in un becher e lasciarla sotto agitazione magnetica per 4 h, per garantire la stabilità delle nanoparticelle stesse.*

Al termine del tempo di condizionamento, le nanoparticelle sono state centrifugate e successivamente analizzate mediante DLS. Le nanoparticelle presentano una dimensione di 234,4±59,4 nm (PI 0,199) (lotto #41).

*Nanoparticelle ottenute per adsorbimento del peptide FQPV sulla superficie di nanoparticelle placebo di PLGA*

Il secondo metodo invece ha previsto la realizzazione di nanoparticelle in cui il peptide FQPV si trova adsorbito sulle nanoparticelle di PLGA (lotto #42). Aliquote differenti di un lotto placebo di nanoparticelle di PLGA ottenute per nanoprecipitazione sono state incubate per tempi diversi con una soluzione a concentrazione nota di FQPV. Ad ogni intervallo di tempo, la quantità di FQPV adsorbita sulle nanoparticelle è stata quantificata in maniera indiretta definendo mediante HPLC la quantità di FQPV rimasta in soluzione.

Come evidenziato dall'istogramma in Figura 37, si osserva un adsorbimento del peptide sulla superficie delle nanoparticelle già dopo 10 minuti di incubazione, anche se il massimo dell'adsorbimento si raggiunge dopo 1 ora di incubazione. Come prevedibile, l'entità di adsorbimento del peptide però non si mantiene stabile nel tempo: infatti dopo 90 minuti la quantità adsorbita tende progressivamente a diminuire. Il protocollo utilizzato ci permette quindi di aumentare la quantità di FQPV caricata dalle nanoparticelle e quindi potrebbe essere considerato con un metodo complementare alla realizzazione di nanoparticelle con il coniugato peptide-PLGA. Il problema resta comunque la stabilità del peptide adsorbito che come osservato tende ad essere rilasciato. Per cui il metodo potrebbe essere utile solo in caso di un rapido contatto delle nanoparticelle con le cellule bersaglio. I valori di potenziale zeta indicati in Tabella X corrispondono al valore misurato dopo 90 minuti quindi corrispondente al massimo dell'adsorbimento.

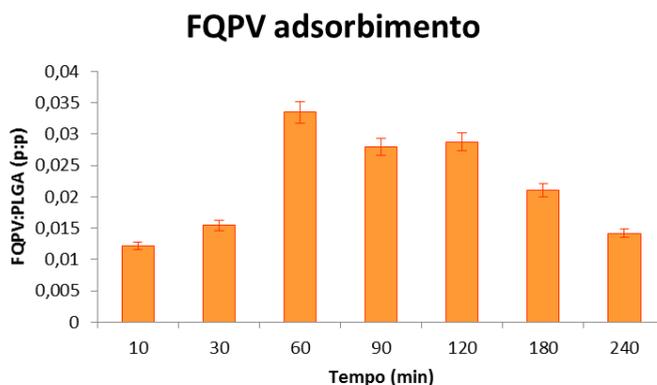


Figura. 37: Profilo di adsorbimento del peptide FQPV sulla superficie delle nanoparticelle di PLGA a diversi intervalli di incubazione, espresso come rapporto p:p tra il peptide FQPV e le nanoparticelle.

### Nanoparticelle ottenute per incapsulazione del peptide FQPV

Infine, un lotto di nanoparticelle è stato realizzato per incapsulazione del peptide FQPV. Le nanoparticelle sono state realizzate per nanoprecipitazione (lotto #43). Nello specifico, la soluzione di PLGA (15 mg/ml) è stata solubilizzata in acetone; a questa soluzione sono stati aggiunti 700 µl di una soluzione di FQPV in etanolo (2 mg/ml) e successivamente gocciolati in una soluzione di PVA all'1% p/p, come ottimizzato con le nanoparticelle placebo (Lotto #38). Le nanoparticelle ottenute hanno mostrato dimensioni pari a  $353,8 \pm 104,0$  nm (PI 0,080). La quantificazione del FQPV è stata effettuata in modo indiretto sulle acque di preparazione e di lavaggio raccolte durante la preparazione del lotto, mediante il metodo HPLC descritto precedentemente (capitolo 1.3.3, Metodi, Parte B). Dall'analisi delle acque di preparazione si osserva che tutto il peptide si trova nella soluzione di PVA, cioè nella fase esterna utilizzata per la preparazione delle nanoparticelle. Il metodo dell'incapsulazione non si rivela quindi un metodo efficace per la realizzazione di nanoparticelle con il peptide FQPV, probabilmente a causa del peso molecolare ridotto e dell'elevata idrofilia del peptide stesso.

La Tabella X è riassuntiva dei lotti di nanoparticelle a base di PLGA e caricati con FQPV, in confronto ai lotti placebo di nanoparticelle di PLGA (lotto #38 e lotto #39).

Tabella X: Lotti di nanoparticelle a base di PLGA e caricate con FQPV.

#	Solvente	Dimensioni		Pot. zeta (mV)	Resa di processo (%, v/v)	FQPV caricato (FQPV:PLGA ,p:p)
		NP nm±ds	PI			
# 38PLGA	acetone	140,8 ±54,5	0,150	- 17,7	44,28	-
#39 PLGA	DMSO	143,7 ±62,3	0,188	-16,9	45,56	-
#40 FQPV-PLGA	DMSO	202,3 ±73,8	0,133	-17,7	40,36	1:61,47 (0,0163)
#41 FQPV-PLGA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Acetone	234,4 ±59,4	0,199	-20,3	41,25	1:61,47 (0,0163)
#42 PLGA + FQPV adsorbito	acetone	244,1 ±65,7	0,072	-19,7	40,15	1:29,9 (0,033)
# 43 PLGA + FQPV incapsulato	acetone	353,8 ±104,0	0,08	-20,5	65,98	1:150 (0,0067)

In Tabella X sono riportati anche i risultati di resa di processo, accettabili per tutti i lotti allestiti, e il potenziale zeta che si mantiene negativo per tutti i lotti realizzati.

#### 2.3.4 Realizzazione di *smart nanoparticles* a base del coniugato GE11-PLGA

A causa delle caratteristiche di solubilità del coniugato GE11-PLGA, le nanoparticelle targettizzate con il peptide sono state ottenute utilizzando il DMSO come solvente mediante la tecnica della nanoprecipitazione. Le condizioni di processo utilizzate sono le stesse ottimizzate con i polimeri non funzionalizzati (vedi paragrafo 2.3.2, Risultati, Parte B). In Tabella XI sono indicate le condizioni di processo utilizzate per ottenere le nanoparticelle a base di GE11-PLGA con riferimento anche ai risultati dell'analisi dimensionale condotta.

Tabella XI: Riassunto delle condizioni operative utilizzate per la realizzazione dei lotti di nanoparticelle di GE11-PLGA (lotti allestiti in triplicato).

#	Conc. polimerica (mg/ml)	Solv.	Dim. (nm ± ds)	PI	Pot. Zeta (mV)	Resa di processo (% p/p)
44	15 (GE11-PLGA)	DMSO	142,1±2,3	0,173	-25,3	59,1

Come mostrato in Tabella XI, la nanoparticelle di GE11-PLGA hanno manifestato dimensioni opportune: la dimensione infatti non risulta essere significativamente maggiore rispetto alle nanoparticelle di solo PLGA. Le

rese di processo si mantengono buone. Anche il potenziale zeta non è significativamente diverso rispetto alle nanoparticelle di solo PLGA e si mantiene su valori negativi.

Al fine di ottenere nanoparticelle più idrofile e stabili in seguito a somministrazione, un'altra formulazione di nanoparticelle "intelligenti" è stata realizzata miscelando il polimero non PEGilato con un polimero PEGilato. In particolare, il protocollo di preparazione di queste nanoparticelle ha previsto la preparazione di una soluzione polimerica in DMSO di GE11-PLGA e PEG-PLGA in rapporto 1:1 p:p. Le nanoparticelle ottenute saranno quindi formate da GE11-PLGA e PEG-PLGA in miscela. Allo stesso modo, una formulazione di nanoparticelle non targettizzate è stata realizzata come confronto alle nanoparticelle intelligenti realizzate con questa metodica. Quindi, il lotto di nanoparticelle è stato preparato a partire da una miscela 1:1 p:p di PLGA e PEG-PLGA in DMSO. Tutte le altre condizioni di processo sono rimaste inalterate (Tab. XII).

Tabella XII: Riassunto delle condizioni operative utilizzate per la realizzazione dei lotti di nanoparticelle ottenute dalla miscela dei polimeri.

#	Conc. Polim. (mg/ml)	Solv.	Dim. (nm ± ds)	PI	Pot. Zeta (mV)	Resa di processo (% p/p)
45	15 (GE11-PLGA/PEG-PLGA 1:1 p:p)	DMSO	143,9±2,3	0,145	-24,9	40,77
46	15 (PLGA/PEG-PLGA 1:1 p:p)	DMSO	125,8±0,9	0,073	-14,6	47,5

Come possiamo osservare, la presenza del PEG sulla superficie delle nanoparticelle ne riduce la dimensione ma non modifica significativamente il potenziale zeta.

## 2.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle polimeriche

### 2.4.1 Caratterizzazione morfologica mediante Microscopio Elettronico a Trasmissione

I risultati relativi alla caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle sono stati confermati anche dalle analisi al TEM di campioni di nanoparticelle allestiti al momento ed analizzati come sospensione acquosa. In Figura 38 sono riportate le micrografie al TEM di campioni di nanoparticelle di a) PLGA, b) GE11-PLGA e c) GE11-PLGA/PEG-PLGA in cui si

può osservare la forma sferica e regolare e la buona distribuzione dimensionale di tutti i lotti di nanoparticelle realizzati.

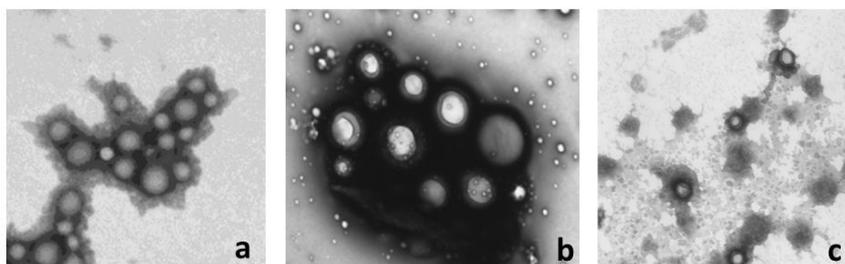


Figura 38: Micrografie al TEM di campioni di nanoparticelle fresche a base di a) PLGA, b) GE11-PLGA e c) GE11-PLGA/PEG-PLGA.

Campioni di nanoparticelle sono stati liofilizzati utilizzando un crioprotettore (saccarosio, 1,67 mg/ml), al fine di migliorare il processo mantenendo la dimensione e la forma delle nanoparticelle anche dopo la liofilizzazione. A titolo esemplificativo, la Figura 39 a mostra le nanoparticelle di PLGA fresche mentre la Figura 39 b rappresenta le nanoparticelle di PLGA dopo liofilizzazione effettuata con l'aggiunta del crioprotettore. In entrambi i casi, le nanoparticelle presentano forma sferica regolare ed una distribuzione dimensionale omogenea dimostrando che le condizioni utilizzate per la liofilizzazione sono adatte ad ottenere un prodotto essiccato solido con buone proprietà morfologiche. I risultati ottenuti al TEM sono stati anche confermati dall'analisi con DLS (Tab. XIII).

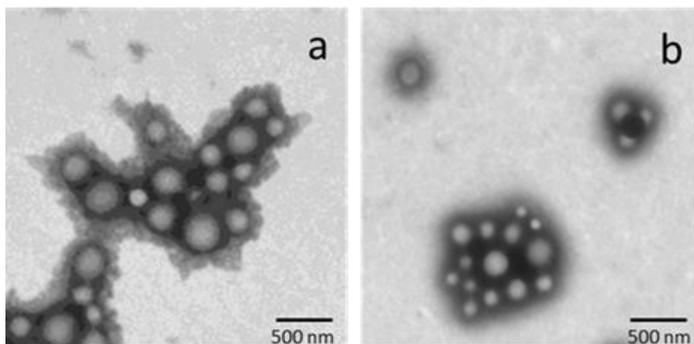


Figura 39: Immagini al TEM delle nanoparticelle di PLGA a) fresche e in b) dopo la liofilizzazione.

Tabella XIII: Analisi dimensionale delle nanoparticelle di PLGA prima e dopo la liofilizzazione e effetto della presenza di un crioprotettore sulla dimensione.

#	Fresche (nm±ds)	Dopo liofilizzazione	
		Senza crioprotettore (nm±ds)	Con crioprotettore (nm±ds)
NP PLGA	246,8±5,4	552,9±130,1	305,0±38,2

#### 2.4.2 Caratterizzazione del comportamento termico delle nanoparticelle

L'analisi del comportamento termico delle nanoparticelle mediante DSC è necessaria per verificare se il processo di produzione delle nanoparticelle possa avere modificato la Tg tipica di questi polimeri. Il problema può essere sia determinato dall'uso dei solventi organici, nel nostro caso DMSO e etanolo, ma anche dei processi di recupero delle nanoparticelle come la liofilizzazione. Come descritto nell'introduzione, il comportamento chimico-fisico di questi polimeri influenza la bio-degradazione e anche la velocità di cessione del farmaco incapsulato.

In Tabella XIV sono riassunti i valori di  $T_g$  dei polimeri come materie prime (PLGA, PEG-PLGA e GE11-PLGA) in confronto a valori di  $T_g$  riscontrati nelle nanoparticelle realizzate (PLGA NP, GE11-PLGA NP, PLGA/ PEG-PLGA NP, GE11-PLGA/ PEG-PLGA NP).

Tabella XIV: Riassunto dei valori di  $T_g$  determinati mediante DSC relativi alle NP realizzate e ai rispettivi polimeri come materie prime.

Polimeri		Nanoparticelle	
#	$T_g$ (°C)	#	$T_g$ (°C)
PLGA	45,24	PLGA NP	49,99
GE11-PLGA	49,33	GE11-PLGA NP	50,98
PEG-PLGA	-12,60	PLGA/ PEG-PLGA NP	13,84
		GE11-PLGA/ PEG-PLGA NP	21,50

Come possiamo osservare, la  $T_g$  delle nanoparticelle aumenta rispetto alla  $T_g$  delle singole materie prime per tutti i lotti realizzati. L'aumento del valore di  $T_g$  non è significativo al punto da poter influenzare il comportamento *in vitro* /*in vivo* delle nanoparticelle.

Considerando le nanoparticelle di PLGA e di GE11-PLGA, è evidente come la matrice polimerica delle nanoparticelle si trovi nello stato vetroso (perché sotto la  $T_g$ ) sia in condizioni ambientali che in condizioni fisiologiche (37°C), presupponendo una buona stabilità delle nanoparticelle e un buon controllo della cessione dell'attivo incapsulato.

Le nanoparticelle realizzate a partire dalla miscela con il polimero PEGilato sono invece caratterizzate da un  $T_g$  molto più bassa, 13,84°C per le

nanoparticelle di PLGA/ PEG-PLGA e 21,50°C per le nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA. La  $T_g$  di questi sistemi nanoparticellari risulta essere influenzata da entrambe le componenti polimeriche: infatti, la presenza del polimero PEGilato riduce notevolmente la  $T_g$  delle nanoparticelle a causa delle sua  $T_g$  sub-ambiente (-12,60°C). Quindi la matrice polimerica delle nanoparticelle si trova nello stato gommoso sia in condizioni ambientali che a temperatura fisiologica. Gli effetti sulla stabilità delle nanoparticelle verrà valutata in seguito negli studi di stabilità delle nanoparticelle *in vitro*.

#### 2.4.3 Stabilità *in vitro* delle nanoparticelle

Nelle immagini seguenti vengono riportati i risultati del test di stabilità *in vitro* condotto sulle nanoparticelle a base di GE11-PLGA e GE11-PLGA/ PEG-PLGA in confronto ai lotti costituiti dal polimero non funzionalizzato (PLGA e PLGA/PEG-PLGA).

In prima analisi, il test di stabilità è stato condotto risospendendo le nanoparticelle in soluzione fisiologica e conservando la sospensione a 4°C per 30 giorni (Fig. 40 e 41). L'obiettivo è quello di valutare la stabilità delle nanoparticelle in una possibile formulazione prima della somministrazione da parte del paziente. I risultati vengono espressi come andamento della dimensione e dell'indice di polidispersità nel tempo di lotti di GE11-PLGA e GE11-PLGA/ PEG-PLGA, in confronto alle rispettive formulazioni realizzate senza il PLGA funzionalizzato.

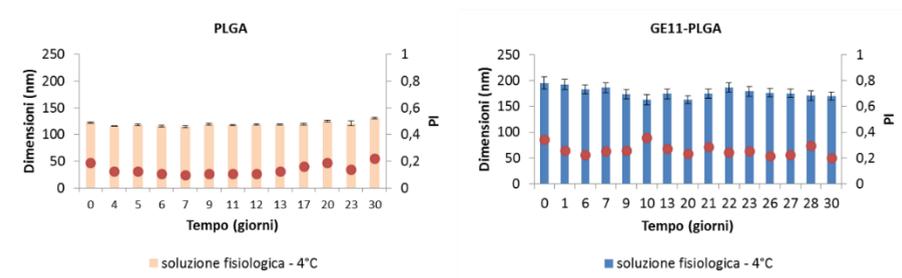


Figura 40: Risultati del test di stabilità condotto su nanoparticelle di PLGA e GE11-PLGA a 4°C in soluzione fisiologica.

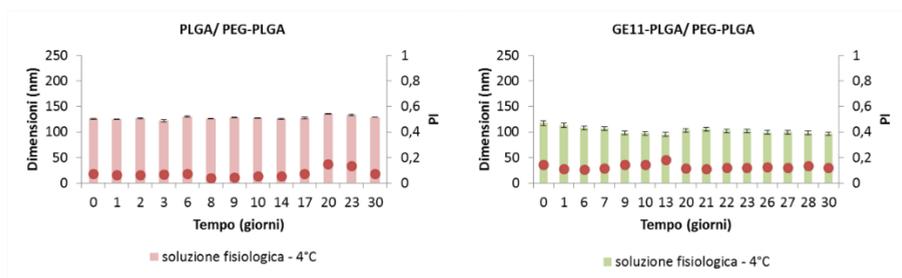


Figura 41: Risultati del test di stabilità condotto su nanoparticelle di PLGA/PEG-PLGA e GE11-PLGA/PEG-PLGA a 4°C in soluzione fisiologica.

Come possiamo osservare dalle immagini riportate (Fig. 40 e 41), le nanoparticelle base di GE11-PLGA manifestano un’ottima stabilità in soluzione fisiologica per 30 giorni, senza significative differenze rispetto a quanto osservato con i lotti di nanoparticelle di solo PLGA. Anche le formulazioni ottenute aggiungendo anche il polimero PEGilato hanno dimostrato la stessa buona stabilità per tutto il tempo del test.

Successivamente il test di stabilità è stato condotto in due diverse condizioni di pH (7,4 e 5,0) e a 37°C al fine di valutare il comportamento delle nanoparticelle al variare del pH e a temperatura fisiologica.

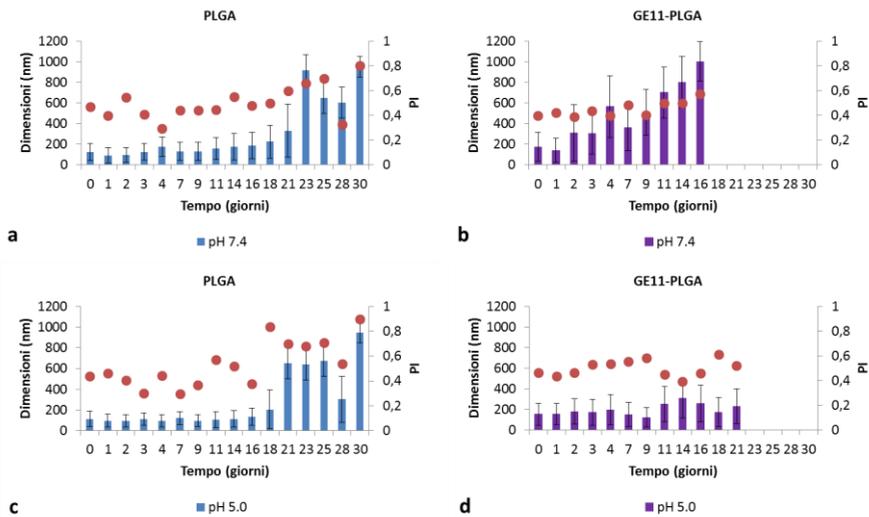


Figura 42: Risultati del test di stabilità condotto su nanoparticelle di PLGA (a e b) e nanoparticelle di GE11-PLGA (c e d) per 30 giorni a pH 7,4 e pH 5,0.

Le nanoparticelle di PLGA dimostrano una buona stabilità in entrambe le condizioni di pH considerate fino a 21-23 giorni (Fig. 42, a e b), dopodiché si osserva un aumento della dimensione delle nanoparticelle e dell'indice di polidispersità, a indicazione dell'aggregazione delle nanoparticelle. In Figura 42, c e d, invece è descritto il comportamento delle nanoparticelle di GE11-PLGA. Dall'andamento della dimensione e dell'indice di polidispersità nel tempo si può notare che la presenza del coniugato GE11-PLGA crea instabilità nelle nanoparticelle: a pH 7,4 le nanoparticelle sono stabili fino a circa 9 giorni, a pH 5,0 fino a 21 giorni. L'assenza del risultato dell'analisi per alcune tempistiche è indice della forte aggregazione delle nanoparticelle, al punto da impedire la corretta lettura del campione. La scarsa stabilità di queste nanoparticelle potrebbe essere dovuta alla degradazione delle

matrice polimerica, più veloce per presenza del peptide che aumenta l'idrofilia del sistema e perché il peso molecolare del GE11-PLGA è inferiore rispetto al PLGA, come dimostrato dall'analisi GPC.

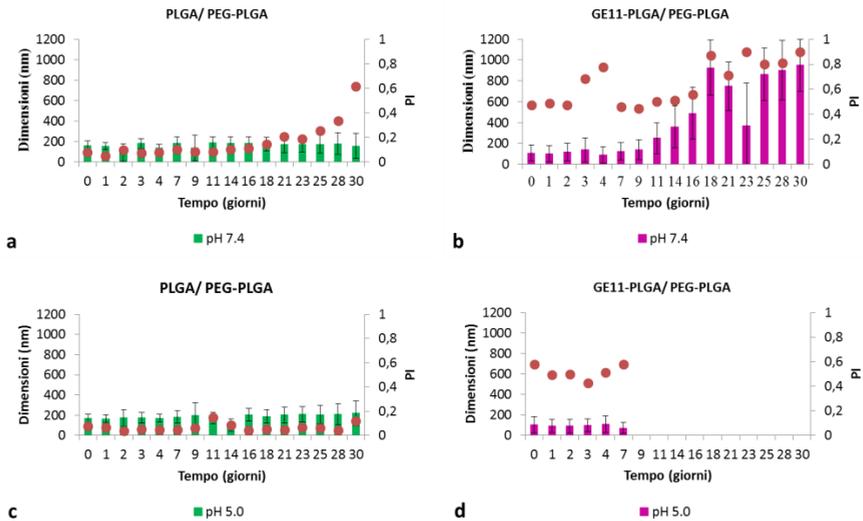


Figura 43: Risultati del test di stabilità condotto su nanoparticelle di PLGA/ PEG-PLGA (a e b) e nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA (c e d) per 30 giorni a pH 7,4 e pH 5,0.

In Figura 43 vengono descritti i risultati del test di stabilità condotto con le nanoparticelle ottenute dalla miscela fisica del PLGA con il polimero PEGilato (Fig. 43, a e b) e del coniugato GE11-PLGA con il polimero PEGilato (Fig. 43, c e d). La combinazione del polimero PLGA con il PLGA-PEG contribuisce a migliorare la stabilità delle nanoparticelle fino a 30 giorni in entrambe le condizioni di pH testate. Quindi, la ridotta  $T_g$  delle nanoparticelle ottenute dalla miscela con il polimero PEGilato sembra non influenzarne la stabilità nelle condizioni sperimentali selezionate. Per

quanto riguarda le nanoparticelle a base di GE11-PLGA/ PEG-PLGA (Fig. 43, c e d), la presenza del coniugato GE11-PLGA crea instabilità nonostante la presenza del polimero PEGilato: dopo 9 giorni le dimensioni delle nanoparticelle tendono ad aumentare in entrambe le condizioni di pH prese in considerazione. Ulteriori prove andrebbero eseguite per spiegare questo comportamento.

#### 2.4.4 Stabilità delle nanoparticelle nei fluidi biologici

La determinazione della stabilità delle nanoparticelle nei fluidi biologici è stata condotta mediante esperimento fSPT utilizzando particelle marcate con Rodamina B. L'esperimento è stato ottimizzato a partire dalle nanoparticelle non targettizzate (PLGA/ PEG-PLGA-RhB) per le quali è stata determinata la concentrazione opportuna per eseguire correttamente l'esperimento ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml). L'esperimento è stato inizialmente condotto su vetrini da microscopia sui quali sono stati posizionati 5-6  $\mu$ l della sospensione di nanoparticelle. La prima problematica riscontrata è stata l'adesione delle nanoparticelle alla superficie del vetrino (Fig. 44). Questo fenomeno è evidente quando l'esperimento viene condotto in acqua, mentre la presenza di proteine nei fluidi biologici riduce significativamente il fenomeno, probabilmente grazie alla stabilizzazione superficiale delle nanoparticelle ad opera delle proteine contenute nei fluidi biologici. L'acqua è stata usata come sostituto al tampone HEPES: infatti in questo mezzo il fenomeno dell'adesione al fondo era ancora più accentuato, probabilmente a causa di qualche componente del tampone stesso. Come

già anticipato, l'adesione delle nanoparticelle causa l'aumento del rumore di fondo e riduce il numero di particelle che possono essere visualizzate. Per limitare questo problema, l'esperimento fSPT è stato condotto utilizzando una multiwell con il fondo in vetro con la quale è possibile utilizzare volumi maggiori di sospensione di nanoparticelle (50  $\mu$ l).

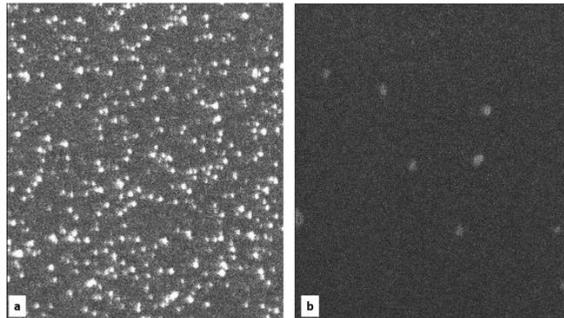


Figura 44: Esempio di adesione al fondo delle nanoparticelle, in acqua (a) e in Hepes Buffer (b).

A partire dai primi esperimenti condotti è risultato chiaro come il numero di nanoparticelle visibili dopo stoccaggio a 37°C fosse notevolmente ridotto rispetto al numero di particelle individuate al tempo zero nel medesimo campione. Il fenomeno è evidente già dopo 1 ora di stoccaggio a 37°C ma è maggiormente accentuato dopo 4 ore. Si è deciso quindi di verificare che il problema non fosse dovuto alla liberazione della RhB dalle nanoparticelle. Campioni di nanoparticelle nelle stesse concentrazioni utilizzate per l'esperimento fSPT sono stati stoccati a 37°C per 4 h. A diversi intervalli di tempo (1h, 2h, 3h e 4h) le nanoparticelle sono state centrifugate e il surnatante è stato analizzato mediante fluorimetro (Aminco-Bowman series 2, Thermo Scientific Inc;  $\lambda_{exc}$  = 554 nm;  $\lambda_{em}$  = 583 nm). L'obiettivo è quello di

verificare un eventuale aumento dell'intensità della fluorescenza nel surnatante dovuta ad una cessione del fluoroforo. L'esperimento è stato condotto di tampone Hepes pH 7,4, in tampone fosfato a pH 5 e in FBS, con l'intento di verificare se differenze del pH e della composizione del mezzo potessero influenzare il comportamento delle nanoparticelle. Come possiamo osservare dal grafico in Figura 45, è possibile notare che già dopo 1 ora di stoccaggio a 37°C si osserva un aumento della fluorescenza del surnatante rispetto a  $t_0$  ad indicare una cessione del fluoroforo, senza significative differenze nelle diverse condizioni sperimentali testate. Probabilmente, questo *burst release* iniziale corrisponde alla frazione di RhB che è adsorbita o in qualche modo intrappolata tra le catene del polimero. L'intensità del segnale nel tempo non tende a cambiare significativamente, per cui non giustifica la riduzione ulteriore del segnale letto con fSPT dopo 4 ore (Fig. 45).

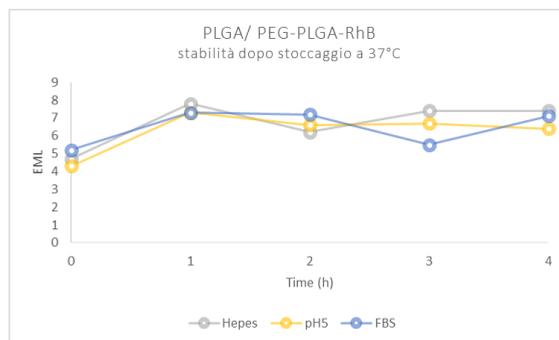


Figura 45: Risultati dell'esperimento di stabilità del legame RhB-polimero condotto dopo stoccaggio della sospensione di nanoparticelle a 37°C.

Probabilmente il problema potrebbe essere dovuto ad un'adesione delle nanoparticelle in sospensione a 37°C alla superficie delle eppendorf

utilizzate per lo stoccaggio. Le eppendorf sono state sostituite con piccoli vial di vetro, per provare a ridurre il fenomeno, ma il comportamento delle nanoparticelle si è manifestato il medesimo. È bene sottolineare che le nanoparticelle testate sono alla stato rubbery nelle condizioni di processo utilizzate a causa della loro ridotta Tg; inoltre, lavorando con piccoli volumi (50 $\mu$ l) a basse concentrazioni, anche le più piccole variazioni diventano significative ai fini dell'esperienza. Per questa ragione si è deciso utilizzare concentrazioni crescenti delle nanoparticelle in sospensione per ogni intervallo di tempo, per permettere di raccogliere un numero sufficiente di tracciati.

In Figura 46 sono rappresentati i risultati del test fSPT condotto sulle nanoparticelle di PLGA/ PEG-PLGA-RhB in acqua. Come possiamo osservare, la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle è descritta da una dispersione omogenea, che tende ad essere piuttosto ristretta ad indicare una buona omogeneità del lotto. Nelle tabelle relative è possibile notare come il numero di tracciati sia stato sempre conforme a quanto richiesto per avere un buon dato statistico (minimo 500 tracciati). L'unico problema si è riscontrato con due campioni (s2t1 e s3t1) dove per entrambi il numero di tracciati si è dimostrato insufficiente e di conseguenza la distribuzione piuttosto scodata. Nel complesso, le nanoparticelle hanno dimostrato una buona stabilità in acqua come rappresentato dalla distribuzione complessiva ai 3 diversi intervalli di tempo (Fig. 46 d) (diametro medio:  $t_0=140,8$  nm;  $t_1=154,9$  nm;  $t_4=135,4$  nm) e soprattutto conforme a quanto misurato mediante DLS ( $\approx 130$  nm).

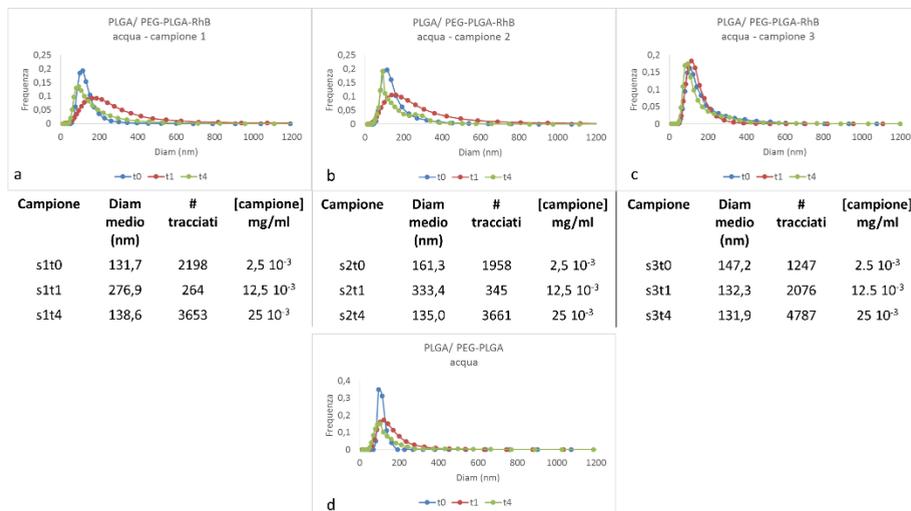


Figura 46: Analisi dimensionale delle nanoparticelle di PLGA/ PEG-PLGA-RhB in acqua condotta mediante fSPT; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

Successivamente la stabilità delle nanoparticelle è stata testata in FBS. Come è possibile osservare in Figura 47 le nanoparticelle hanno manifestato un'ottima stabilità. Complessivamente, solo dopo 4 ore di incubazione a 37°C, le nanoparticelle hanno dimostrato un aumento della dimensione particellare come indicato dalla comparsa di una "spalla" nella distribuzione della popolazione di nanoparticelle verso le dimensioni più alte (Fig. 47 d). Le dimensioni medie rimangono comunque al di sotto di valori accettabili (diametro medio:  $t_0 = 157,5$  nm;  $t_1 = 158,7$  nm;  $t_4 = 156,7$  nm) e del tutto paragonabili a quanto riscontrato in acqua.

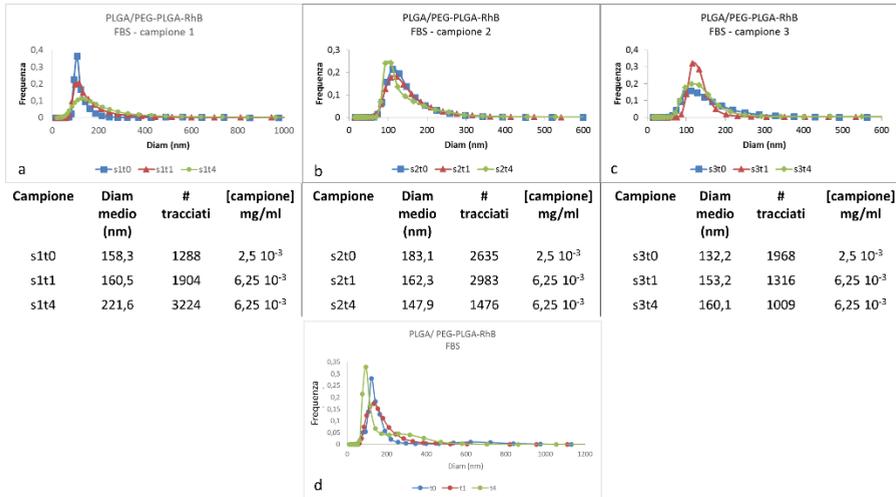


Figura 47: Comportamento delle nanoparticelle non targettizzate in FBS indagato con fSPT; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

Visti i buoni risultati ottenuti con FBS, si è deciso di investigare il comportamento delle nanoparticelle di PLGA7PEG-PLGA-RhB anche in plasma umano e in liquido sinoviale umano.

Come anticipato, il plasma umano utilizzato per questi esperimenti è costituito da campioni prelevati da volontari sani di cui è stata misurata la viscosità (1,8 cP) mediante viscosimetro a capillare.

La prima cosa che risulta evidente è che nelle stesse concentrazioni utilizzate per le analisi con FBS, il numero di tracciati che si riesce a raccogliere è ridotto (Fig. 48). Questo potrebbe essere spiegato da un'interferenza delle proteine del plasma umano con la fluorescenza della rodamina. Il secondo aspetto importante è che la dimensione delle nanoparticelle tende ad aumentare non appena le stesse entrano in contatto con il plasma umano: i valori di  $t_0$  infatti sono significativamente

maggiori rispetto a quanto riscontrato con acqua e FBS (140,8 nm in acqua e 157,8 nm in FBS al  $t_0$  rispetto a 194,7 nm in plasma umano al  $t_0$ ). Dopo incubazione a 37°C, la dimensione media delle nanoparticelle tende ad aumentare ulteriormente (diametro medio:  $t_0= 194,7$  nm;  $t_1= 279,6$  nm;  $t_4= 266,6$  nm). Questo aumento della dimensione è attribuibile alla formazione di una corona proteica che si forma quando le nanoparticelle non hanno catene libere di PEG a creare ingombro all'adsorbimento delle proteine. È bene sottolineare che l'aumento della dimensione della popolazione di nanoparticelle nel suo insieme non supera i 350 nm, per cui non si può parlare di una vera e propria aggregazione. Per cui possiamo affermare che le nanoparticelle sono stabili.

Considerando che sono le proteine ad influenzare l'aggregazione delle nanoparticelle, non si è ritenuto necessario analizzare il comportamento delle nanoparticelle nel sangue intero.

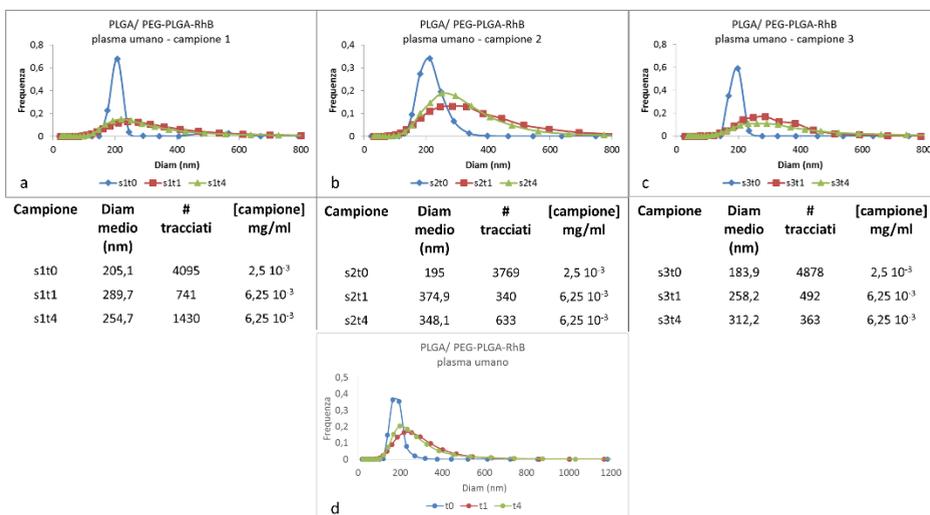


Figura 48: Stabilità delle nanoparticelle in plasma umano determinata mediante tecnica FSP; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

Infine si è passati alla caratterizzazione delle nanoparticelle di PLGA/PEG-PLGA-RhB in liquido sinoviale umano, pensando ad una somministrazione intra-articolare delle nanoparticelle per il trattamento di malattie reumatiche. I campioni utilizzati di liquido sinoviale provengono dall’Ospedale Universitario di Gent, prelevati da pazienti affetti da artrite indifferenziata. Vista la notevole variabilità nella viscosità dei campioni ricevuti, si è preferito misurare la viscosità tutte le volte prima dell’esperimento. La scelta dell’utilizzo di campioni di pazienti e non di volontari sani deriva dal fatto che non è facile reperire volontari disposti a questo tipo di prelievo doloroso.

Al contrario di quanto riscontrato con il plasma umano, le nanoparticelle in liquido sinoviale si sono dimostrate molto più stabili, senza evidenziare

aggregazione eccessiva in nessuna delle tempistiche considerate (diametro medio:  $t_0 = 130,7$  nm;  $t_1 = 181,9$  nm;  $t_4 = 162,8$  nm) (Fig. 49). La viscosità del liquido sinoviale utilizzato in questo esperimento era 1,88 cP. Il liquido sinoviale è un ultra filtrato del plasma umano, che presenta qualitativamente la stessa composizione in proteine del plasma ma una concentrazione decisamente inferiore. Quindi è la concentrazione delle proteine a rappresentare il punto critico per l'aggregazione delle nanoparticelle, poiché influenza l'entità con cui queste adsorbono sulle nanoparticelle stesse.

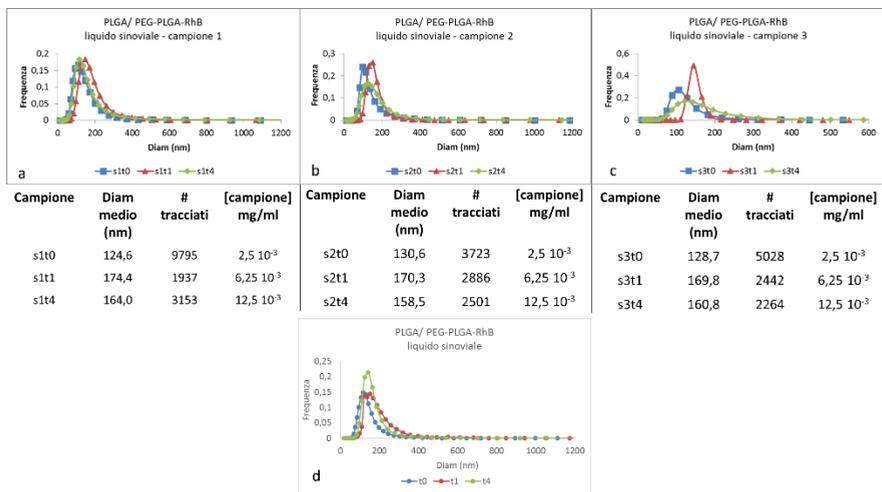


Figura 49: Stabilità delle nanoparticelle a base di PLGA(PEG-PLGA (RhB) nel liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite indifferenziata determinato mediante FSPT; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

Le condizioni sperimentali utilizzate con le nanoparticelle non funzionalizzate con il peptide GE11 sono state utilizzate come punto di

partenza per eseguire il test sulle nanoparticelle a base del coniugato GE11-PLGA.

Considerando i campioni di nanoparticelle di GE11-PLGA/PEG-PLGA-RhB in acqua, riferimento per le misure successive, è possibile osservare che la perdita di nanoparticelle in seguito a stoccaggio non è più così accentuata come per le nanoparticelle non targettizzate, tanto che è possibile eseguire la registrazione dei filmati al tempo  $t_1$  e al tempo  $t_4$  con campioni di nanoparticelle ad una concentrazione inferiore al  $t_0$  (Fig. 50). È come se la presenza del peptide sulla superficie delle nanoparticelle contribuisse a limitare l'effetto di adesione delle stesse alle pareti della eppendorf.

In maniera analoga a quanto osservato per le nanoparticelle di PLGA, la dimensione delle nanoparticelle di GE11-PLGA/PEG-PLGA misurata in acqua è paragonabile a quanto valutato mediante DLS ( $\approx 140$  nm) e non si osserva aggregazione in seguito a stoccaggio a  $37^\circ\text{C}$  (Fig. 50 d) (diametro medio:  $t_0 = 127,2$  nm;  $t_1 = 127,1$  nm;  $t_4 = 129,3$  nm).

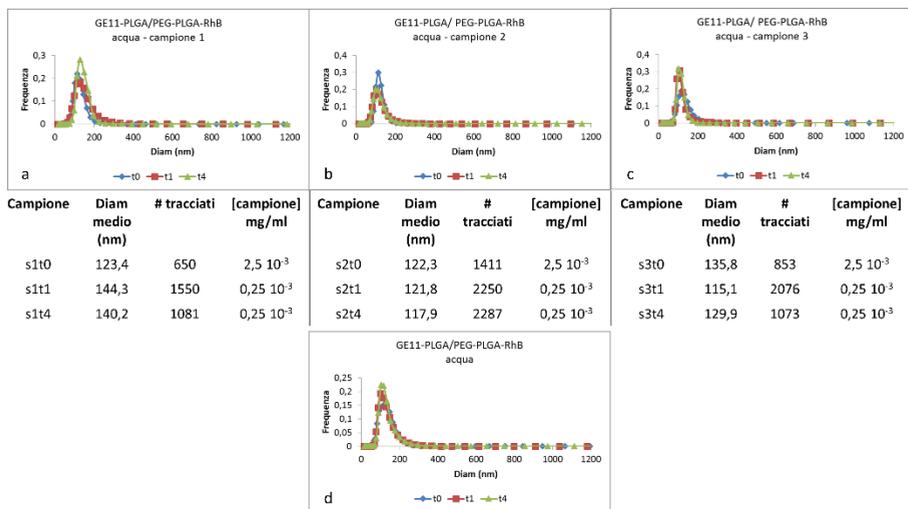


Figura 50: determinazione della dimensione delle nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA-RhB in acqua mediante fSPT; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

Anche in FBS le nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA-RhB si manifestano stabili, come possibile osservare dall'andamento complessivo dei tracciati raccolti dalla media dei tre campioni analizzati (Fig. 51 d) (dimensione media:  $t_0 = 122,7$  nm;  $t_1 = 159,3$  nm;  $t_4 = 134,8$  nm). In questo caso, il fenomeno dell'adesione delle nanoparticelle alla eppendorf è ancora evidente, tanto che la concentrazione del campione di nanoparticelle è aumentata di 10 volte nel passaggio dal  $t_0$  al  $t_1$  e  $t_4$ .

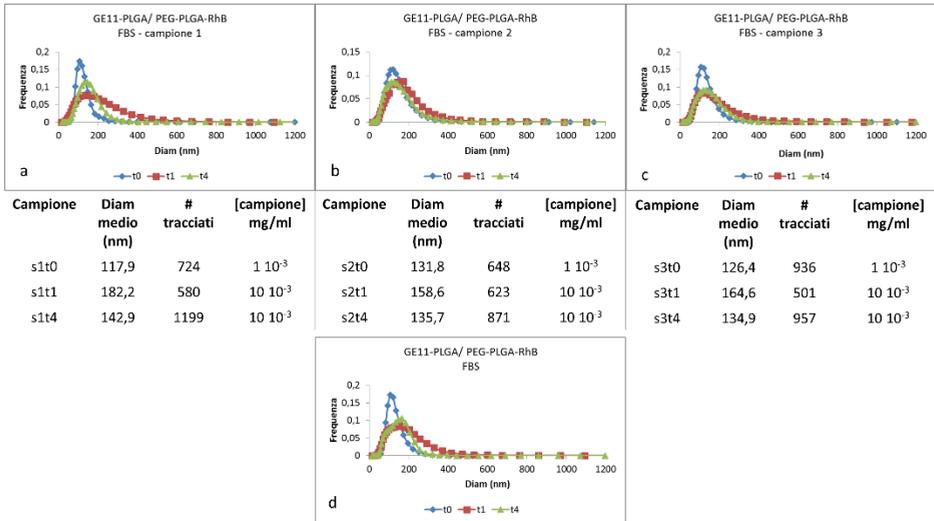


Figura 51: stabilità delle nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA in FBS valutata mediante fSPT; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

Per quanto riguarda il comportamento in plasma umano, anche con le nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA si osserva un aumento della dimensione al contatto con il plasma umano rispetto a quanto riscontrato in acqua (177,2 nm al  $t_0$  in plasma umano rispetto a 127,2 nm al  $t_0$  in acqua) anche se leggermente meno evidente rispetto a quanto riscontrato con le nanoparticelle senza il peptide (diametro medio:  $t_0=194,7$  nm PLGA/GE11-PLGA). Questa differenza non è più così evidente per i tempi  $t_1$  e  $t_4$ : nonostante il valore medio della dimensione delle nanoparticelle con e senza peptide sia differente, la distribuzione dimensionale non lascia intendere una grande differenza. In entrambi i casi le curve sono ampie e spostate verso valori di dimensioni intorno a 250 nm (Fig. 52). Da questi risultati possiamo evincere che la presenza del peptide sulla superficie delle

nanoparticelle non influenza la stabilità delle nanoparticelle, ne in senso negativo che in senso positivo.

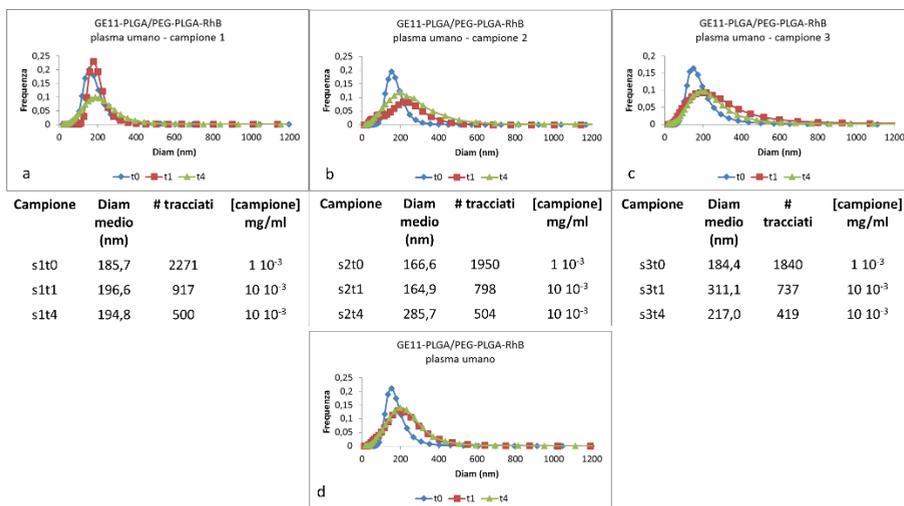


Figura 52: stabilità delle nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA in plasma umano valutata mediante fSPT; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

Infine, le nanoparticelle di GE11-PLGA/PEG-PLGA sono state sottoposte a test di stabilità in liquido sinoviale. Il liquido utilizzato ha dimostrato una viscosità decisamente maggiore della viscosità del liquido utilizzato per l'esperimento con le nanoparticelle non targettizzate (3,88 cP anziché 1,85 cP).

Nonostante la viscosità differente, le nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA si sono dimostrate stabili. Infatti al  $t_0$  non si osserva aggregazione rispetto alla dimensione dimostrata dalle nanoparticelle in acqua o in FBS (100,9 nm a  $t_0$  in liquido sinoviale rispetto a 127,2 nm al  $t_0$  in acqua e 122,7 al  $t_0$  in FBS) (Fig. 53). Dopo 1 ora di incubazione la dimensione tende ad aumentare e rimanere pressoché stabile anche dopo 4 ore di incubazione

(diametro medio:  $t_0= 100,9$  nm;  $t_1= 145,6$  nm;  $t_4=130,8$  nm). La distribuzione dimensionale tende ad aumentare dimostrando una spalla verso valori di dimensione maggiori. In questo caso, le nanoparticelle hanno evidenziato un comportamento particolare: la dimensione delle nanoparticelle in liquido sinoviale sembra inferiore alla dimensione misurata in acqua. Considerando che l'andamento del comportamento delle nanoparticelle con il GE11 è del tutto paragonabile al comportamento delle nanoparticelle senza il GE11 nel liquido sinoviale, possiamo supporre che il problema sia dovuto non alle nanoparticelle ma ad una scorretta determinazione della viscosità del mezzo: il liquido sinoviale è infatti ricco di acido ialuronico che si presenta con una struttura gelatinosa. Questo potrebbe creare una micro-disomogeneità nella composizione del campione che influenza la determinazione delle viscosità quando misurata con un viscosimetro capillare. Ulteriori indagini dovrebbero essere condotte al fine di determinare con più precisione la viscosità del liquido sinoviale.

La maggiore stabilità delle nanoparticelle nel liquido sinoviale potrebbe essere attribuibile alla ridotta concentrazione di proteine biologiche nel liquido sinoviale rispetto alla concentrazione delle stesse nel plasma umano.

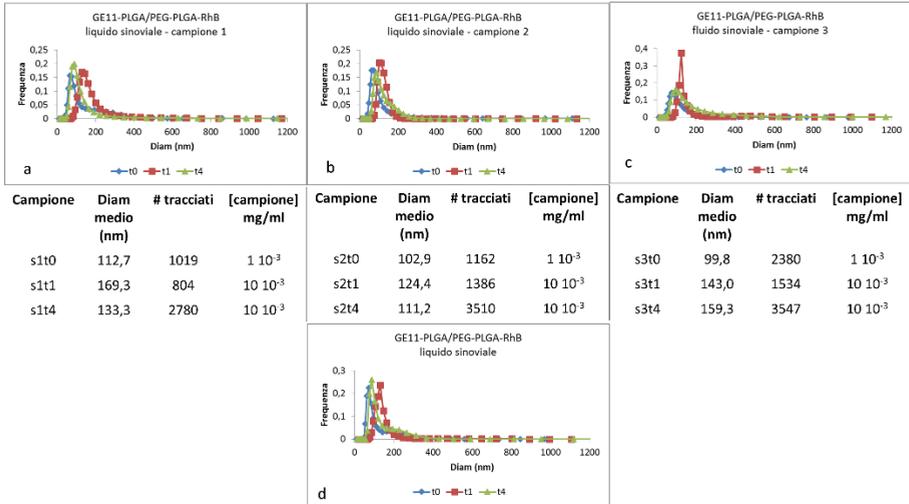


Figura 53: test di stabilità delle nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA eseguito in liquido sinoviale umano mediante fSPT; in d è rappresentato il risultato medio dei tre campioni analizzati.

In Figura 54 è rappresentato il riassunto di tutti gli esperimenti fSPT condotti, in cui è possibile osservare quanto descritto precedentemente: come noto, la metodica fSPT permette la corretta determinazione della dimensione delle nanoparticelle nei fluidi biologici caratterizzati da una viscosità differente. Le nanoparticelle, targettizzate e non, a base di PLGA, sono stabili in tutte le condizioni testate, a 37°C per 4 ore.

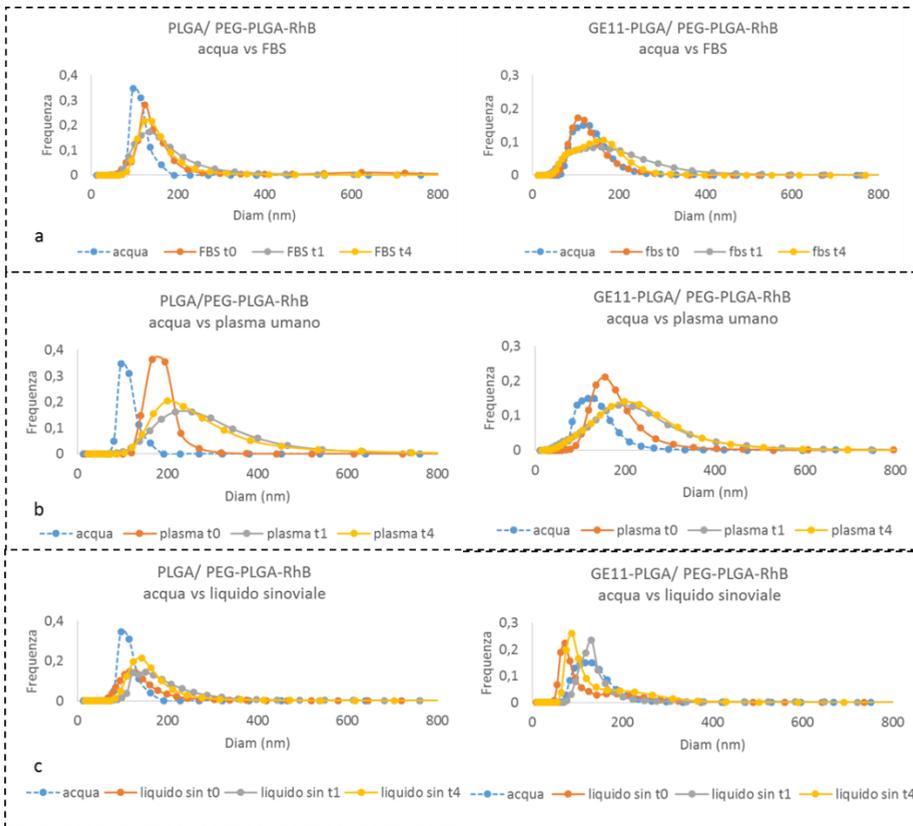


Figura 54: Riassunto del test di stabilità condotto con fSPT sulle nanoparticelle PLGA/ PEG-PLGA e GE11-PLGA/PEG-PLGA-RhB a confronto in FBS (a), in plasma umano (b) e in liquido sinoviale (c). La distribuzione dimensionale delle nanoparticelle è sempre confrontata al valore misurato in acqua.

### 2.4.5 Test di citotossicità

Il test di citotossicità è stato condotto dopo 48 ore di incubazione dei sistemi nanoparticellari realizzati con le cellule selezionate. Lo scopo è quello di valutare se il metodo di preparazione delle nanoparticelle e il coniugato stesso possano avere in qualche modo un effetto sulla vitalità cellulare. Le linee cellulari utilizzate per questo test sono state due linee

cellulari tumorali caratterizzate da una sovraespressione di EGFR (A459 e Caki1) e HUVEC come controllo. I risultati sono espressi come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo, rappresentato da cellule che non vengono messe in contatto con le nanoparticelle.

In Figura 55 possiamo notare come le nanoparticelle di PLGA, preparate mediante la tecnica della nanoprecipitazione utilizzando come solvente DMSO, non risultino essere citotossiche alle concentrazioni testate (tra 0,1 µg/ml e 1 mg/ml) sia sulle HUVEC che sulle cellule tumorali A549. Infatti, anche alle concentrazioni più alte, la vitalità cellulare si mantiene intorno al 72% del controllo.

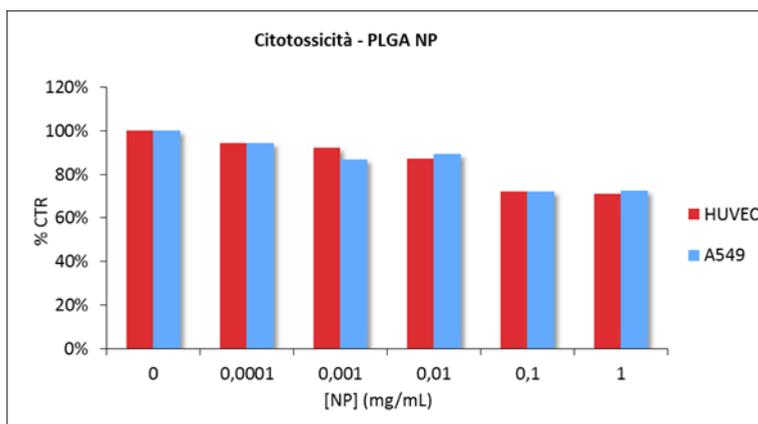


Figura 55: risultati del test di citotossicità delle nanoparticelle di PLGA condotto su HUVEC e A549 per 48h.

Le *smart nanoparticles* realizzate utilizzando il coniugato GE11-PLGA, sia da solo (Fig. 56 a) che in associazione con il polimero PEGilato (Fig. 56 b) hanno manifestato buone proprietà di citocompatibilità. Nello specifico, le nanoparticelle di GE11-PLGA (Fig. 56 a) sono citocompatibili con la linea

cellulare di carcinoma renale (verde), in cui si nota solo una leggera riduzione della crescita a concentrazioni di nanoparticelle più alte (1 mg/ml). Sulla linea cellulare di carcinoma polmonare (rosso) la presenza di GE11 sembra aumentare la crescita cellulare rispetto al controllo fino a concentrazioni  $\leq 0,1$  mg/ml, oltre i quali si osserva un rallentamento della crescita.

Per le nanoparticelle di GE11-PLGA/ PEG-PLGA (Fig. 56 b), non si osserva una corrispondenza tra la crescita cellulare e la concentrazione delle nanoparticelle testate sulla linea cellulare di carcinoma renale (verde), probabilmente a causa di un errore sperimentale; la vitalità cellulare si mantiene comunque sopra l'80% del controllo per tutte le concentrazioni testate. Considerando la linea cellulare di carcinoma polmonare, il GE11 sembra avere un effetto positivo sulla crescita cellulare che aumenta all'aumentare della concentrazione delle nanoparticelle, fino a manifestare un effetto citotossico quando la concentrazione delle nanoparticelle è intorno a 1 mg/ml. Si osserva comunque una riduzione della crescita cellulare rispetto ai lotti di nanoparticelle di solo GE11-PLGA, probabilmente dovuto alla presenza del PEG.

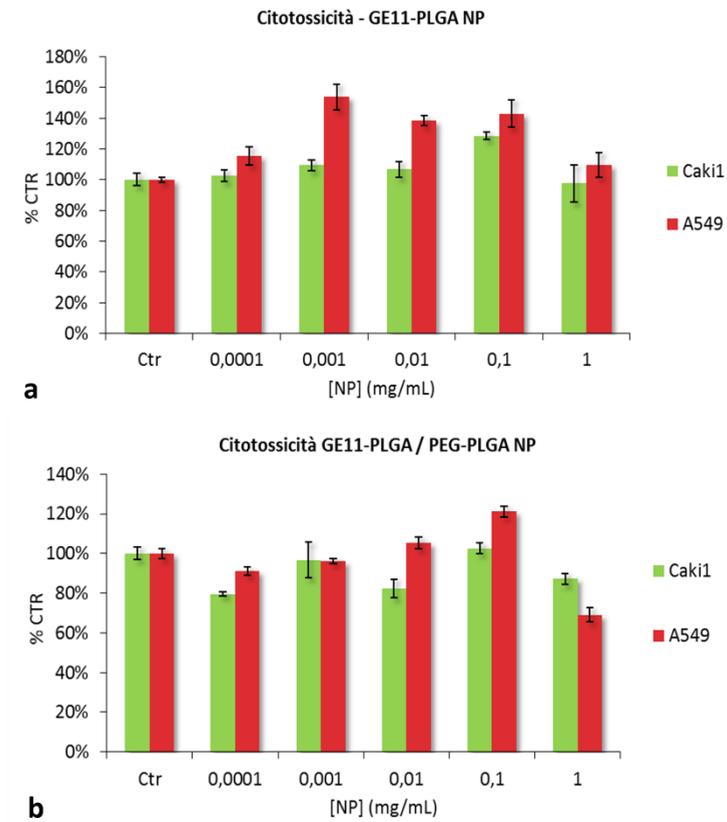


Figura 56: risultati del test di citocompatibilità delle nanoparticelle di GE11-PLGA (a) e GE11-PLGA/ PEG-PLGA (b) condotto su Caki1 e A549 per 48h.

### 2.4.6 Test di uptake cellulare

Uno dei vantaggi principali dell'utilizzo dei sistemi nanoparticellari come sistemi per il *drug delivery* è quello di poter veicolare il farmaco direttamente all'interno della cellula. I sistemi nanoparticellari infatti vengono captati dalle cellule grazie alla loro dimensione. I meccanismi con

cui le nanoparticelle vengono internalizzate sono molteplici e possono essere dei meccanismi di diffusione passiva oppure di trasporto attivo. Mentre i meccanismi passivi sono tempo-dipendenti, i meccanismi attivi sono più veloci e sono influenzati dalla disponibilità del trasportatore stesso. Si tratta quindi di meccanismi di internalizzazione più rapidi rispetto alla diffusione e più selettivi.

La realizzazione di sistemi nanoparticellari intelligenti che riconoscono in maniera specifica alcuni bersagli cellulari sfrutta meccanismi di *uptake* attivi mediati dal recettore per favorire una più rapida internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule e una permanenza più prolungata nel citoplasma, oltre a riconoscere in maniera selettiva le cellule che esprimono il bersaglio. Per questa ragione, la determinazione del profilo di *uptake* è fondamentale per verificare l'efficacia dei sistemi nanoparticellari realizzati. La linea cellulare utilizzata per le prove di *uptake* è stata la linea A549 (carcinoma polmonare), utilizzata anche in letteratura come linea cellulare modello caratterizzata da una sovraespressione del recettore EGFR. L'espressione è stata confermata anche sperimentalmente prima dell'esperimento di *uptake* andando a trattare le cellule con un anticorpo anti-EGFR marcato con FITC e quantificando mediante citofluorimetro le cellule che esprimono il recettore. In Figura 57 sono riportati i risultati della caratterizzazione delle cellule: in entrambi i grafici in grigio sono riportate le cellule non trattate con l'anticorpo mentre in rosso sono rappresentate le cellule trattate con l'anticorpo. Nella linea cellulare di carcinoma polmonare si può osservare come le cellule in effetti sovraesprimano il recettore perché il segnale delle cellule trattate con l'anticorpo è significativamente

spostato verso valori di fluorescenza maggiori (intensità: cellule controllo=14,2; cellule trattate=253,1) rispetto alle cellule non trattate. Al contrario di quanto succede nelle linea cellulare controllo in cui non si osserva differenza tra le cellule non trattate e le cellule trattate con anticorpo.

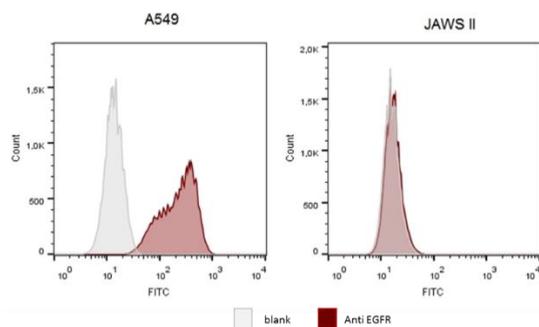


Figura 57: Risultati della caratterizzazione dell'espressione di EGFR su cellule A549 e su cellule controllo.

Per gli studi di *uptake* le cellule sono state incubate con le nanoparticelle per diversi intervalli di tempo (0,5, 1, 2, 4 e 24 ore) e per ogni intervallo di tempo sono state registrate le immagini delle cellule al microscopio confocale, al fine di verificare l'effettiva internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule. Il dato qualitativo è stato supportato da una determinazione quantitativa andando a misurare la fluorescenza delle nanoparticelle nell'immagine mediante in software ImageJ. I risultati quantitativi sono espressi come intensità per cellula. Il test è stato condotto sulle cellule funzionalizzate con il peptide GE11 e sulle cellule non funzionalizzate; inoltre, l'esperimento è stato condotto anche a 4°C per

valutare l'andamento dell'*uptake* quando i meccanismi di *uptake* attivi sono inibiti.

La Figura 58 dimostra i risultati del test di *uptake* condotto sulle nanoparticelle a base di GE11-PLGA/ PEG-PLGA (RhB), sia a 37°C che a 4°C sulle A549.

È evidente che le nanoparticelle vengono internalizzate con un meccanismo di captazione attivo poiché a 4°C l'*uptake* delle nanoparticelle è significativamente ridotto. Solamente dopo 4 ore di incubazione a 4°C l'intensità della fluorescenza è aumentata. Nelle cellule conservate a 37°C l'*uptake* è molto veloce poiché già a 0,5 ore è possibile osservare le nanoparticelle all'interno delle cellule. L'intensità del segnale aumenta con l'incubazione mantenendosi pressochè costante fino alle 24 ore di incubazione.

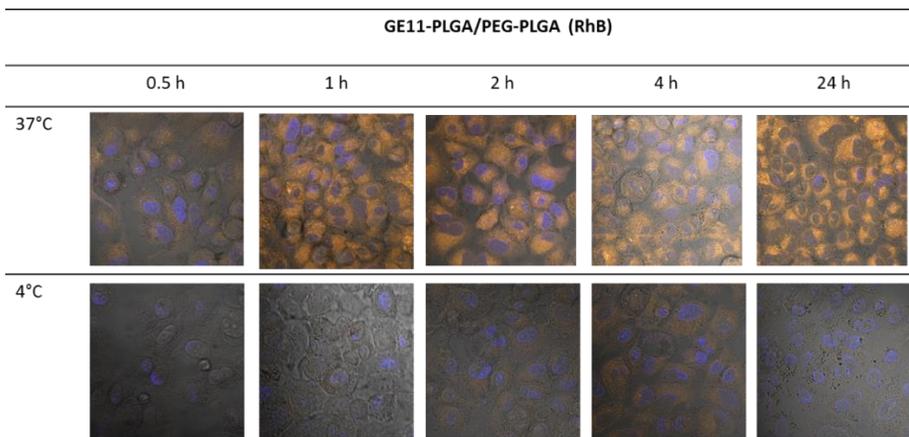


Figura 58: Risultati del test di uptake condotto sulle cellule A549 a 37°C e a 4°C con le nanoparticelle a base di GE11-PLGA/ PEG-PLGA (RhB).

Le nanoparticelle non targettizzate con il peptide hanno un comportamento differente: vengono internalizzate comunque dalle cellule anche se il profilo sembra più lento e meno duraturo rispetto alle nanoparticelle targettizzate come è evidenziato dal fatto che a 24 ore il segnale delle nanoparticelle è molto basso. Il comportamento delle nanoparticelle a 4°C è del tutto paragonabile a quanto osservato con le nanoparticelle vettorizzate (Fig. 59).

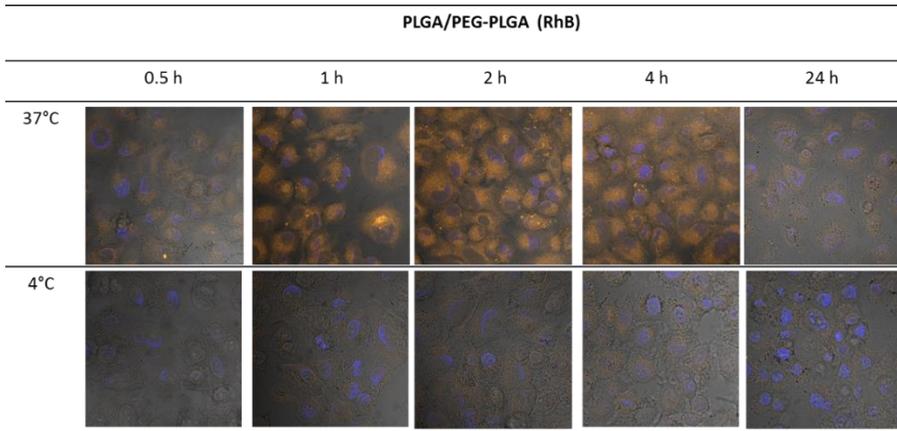


Figura 59: Risultati del test di uptake condotto sulle cellule A549 a 37°C e a 4°C con le nanoparticelle a base di GE11-PLGA/ PEG-PLGA (RhB).

Attraverso i dati quantitativi è più semplice osservare l'andamento dell'*uptake* (Fig. 60). Infatti è possibile notare come l'*uptake* delle nanoparticelle con il peptide GE11 sia più veloce e prolungato rispetto all'*uptake* delle nanoparticelle senza il peptide. Per le nanoparticelle funzionalizzate con il peptide si raggiunge il massimo dell'*uptake* dopo 2 ore di incubazione e l'intensità del segnale rimane costante fino alle 24 ore, come se si raggiungesse un *plateau*. Al contrario le nanoparticelle senza il peptide entrano in maniera più graduale raggiungendo il massimo dopo 4 ore di incubazione dopodiché le nanoparticelle tendono ad uscire dalle cellule. Il profilo di *uptake* a 4°C invece è il tipico comportamento di internalizzazione passiva, con un andamento tempo-dipendente; si osserva comunque una captazione anche se di minore entità rispetto al comportamento a 37°C e si raggiunge il massimo dopo 24 ore.

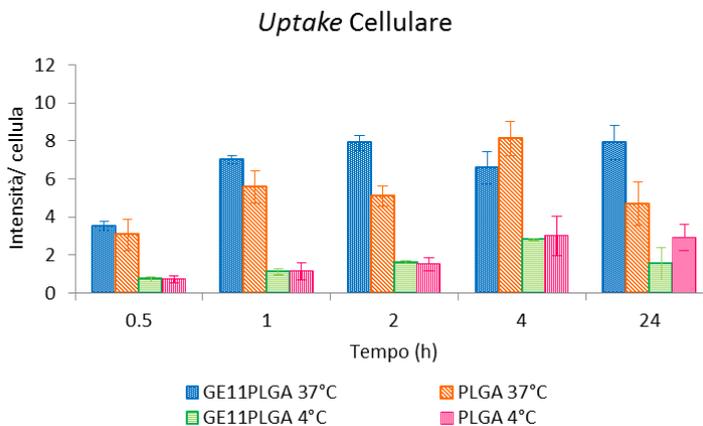


Figura 60: Risultati quantitativi del test di *uptake* cellulare condotto con le nanoparticelle vettorzate e non, marcate con RhB.

Il comportamento delle nanoparticelle funzionalizzate con il peptide GE11 è conforme a quanto riscontrato in letteratura in cui si osserva che le *smart nanoparticles* che entrano nelle cellule con un meccanismo attivo hanno profili di *uptake* più veloci e più duraturi. La formulazione testata è caratterizzata da una funzionalizzazione diretta del polimero senza l'utilizzo di uno spaziatore tra l'agente di targeting e il polimero: nonostante questo, le nanoparticelle hanno dimostrato una buona efficacia. Sarebbe interessante osservare se con l'utilizzo di uno spaziatore la differenza tra le due formulazioni sia maggiore e più significativa. Inoltre, fonte di variabilità è sicuramente anche il metodo utilizzato per l'esperimento: le cellule utilizzate sono cellule tumorali caratterizzate da una crescita veloce e irregolare, per cui non è sempre facile ottenere sempre la stessa immagine, con lo stesso numero di cellule e soprattutto con cellule della stessa dimensione. I dati andrebbero confermati con un'analisi al citofluorimetro

in cui è possibile quantificare con più accuratezza le cellule fluorescenti cioè quelle che hanno captato le nanoparticelle.

#### 2.4.7 Nanoparticelle caricate con il principio attivo modello (DXM)

Il Desametasone (DXM) è stato selezionato come farmaco modello nell'ambito di questo progetto di ricerca poiché il recettore EGFR risulta essere sovraespresso anche nella sinovia delle articolazioni dei pazienti affetti da Artrite Reumatoide. La somministrazione di nanoparticelle targettizzate caricate con DXM potrebbe rappresentare un notevole vantaggio e una buona strategia nella riduzione degli effetti collaterali dovuti alla somministrazione sistemica di glucocorticoidi come il DXM. Inoltre, la somministrazione intra-articolare delle stesse potrebbe favorire una maggiore permanenza del farmaco nel sito di interesse, riducendo così il numero di somministrazioni.

Per la realizzazione dei lotti di nanoparticelle caricate con il DXM, 7,5 mg di attivo sono stati aggiunti alla soluzione di PLGA in DMSO, 15 mg/ml, mantenendo il rapporto polimero:attivo 10:1 p:p. La soluzione contenente polimero e attivo è stata successivamente gocciolata all'interno della soluzione di PVA 1% p/v, secondo i parametri descritti precedentemente (700 rpm per 4 ore).

In Tabella XV, sono schematizzati i lotti realizzati di nanoparticelle di PLGA caricate con DXM.

Come si può osservare, il lotto#47, in cui il DXM è stato solubilizzato in DMSO, non è caratterizzato da valori di *drug content* particolarmente

elevati (280 µg per 100 mg di nanoparticelle), anche se comunque compatibili con quanto riscontrato in letteratura (*Gomez-Graete, Tsapis, et al., 2007*). Nonostante la lipofilia dell'attivo, la scarsa incapsulazione potrebbe essere dovuta al ridotto peso molecolare dell'attivo che ne favorisce la diffusione dalla matrice polimerica durante le fasi stesse della preparazione delle nanoparticelle.

Per questa ragione, sono state indagate diverse strategie alternative con l'obiettivo di rallentare la fuoriuscita del DXM dalle nanoparticelle. È noto in letteratura come solventi diversi possano in qualche modo influenzare il grado di incapsulazione dell'attivo (*Gomez-Graete, Tsapis, et al., 2007*). Per questa ragione si è cercato di aggiungere un solvente alla soluzione polimerica in cui il DXM si è dimostrato parzialmente solubile ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e Etileacetato): entrambi i solventi utilizzati sono immiscibili in acqua per cui non diffondono nella fase acquosa esterna così facilmente come l'acetone e il DMSO. Per cui, anche la diffusione della molecola attiva potrebbe essere rallentata. Questa strategia si è dimostrata effettivamente efficace solo quando il solvente utilizzato è stato l'Etileacetato (lotto#49) in cui l'incapsulazione dell'attivo ha raggiunto valori di 1,0 mg di DXM per 100 mg di nanoparticelle.

L'altra strategia comunemente utilizzata per aumentare l'incapsulazione di molecole attive in sistemi micro- e nanoparticellari è quello di aumentare la pressione osmotica della fase acquosa esterna, aggiungendo ad esempio un sale ad elevate concentrazioni. Nel nostro caso, abbiamo provato ad aggiungere NaCl 5% p/v all'interno della soluzione di PVA (lotto#50), ma il metodo non si è dimostrato efficace.

Tabella XV: Riassunto dei lotti di nanoparticelle di PLGA caricate con il farmaco modello DXM e relativo *drug content*.

#	Solvente	Solvente immiscibile in acqua	NaCl nella soluzione di PVA (% p/v)	Contenuto di DXM ( $\mu\text{g DXM / mg NP}$ )
47	DMSO	-	-	280 $\pm$ 6
48	DMSO	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	240 $\pm$ 6
49	DMSO	Etilacetato	-	1000 $\pm$ 1
50	DMSO	-	5	170 $\pm$ 16

I risultati del test di incapsulazione sono stati ottenuti andando a quantificare l'attivo direttamente sulle nanoparticelle liofilizzate. Infatti, non si è riscontrata una corrispondenza tra la quantità di DXM misurata nelle nanoparticelle e la quantità invece misurata nella fase esterna, tanto da condurci a selezionare il metodo diretto come metodo più opportuno per la determinazione del *drug content*. Nella maggior parte dei casi il dato ottenuto dalle analisi delle soluzioni di PVA utilizzate per la realizzazione delle nanoparticelle riportavano valori di DXM sovrastimati, probabilmente a causa di un'interferenza nella lettura con HPLC del PVA non del tutto precipitato. Un'altra ipotesi potrebbe essere la presenza nella soluzione di PVA di nanoparticelle di piccole dimensioni che non sono state recuperate in seguito a centrifugazione e che quindi possono influenzare la lettura del DXM. Per quanto riguarda la quantificazione del DXM sul filtro, questo ha

dimostrato valori estremamente bassi per cui possiamo dire che il metodo utilizzato non causa formazione di cristalli di DXM tali da poter essere trattieneuti dal filtro. Per cui, il protocollo definitivo di realizzazione delle nanoparticelle non ha previsto la filtrazione dei lotti ottenuti.

Le condizioni per la realizzazione di nanoparticelle caricate con il DXM, ottimizzate con il PLGA, sono state applicate per la realizzazione anche di nanoparticelle di PLGA/PEG-PLGA, al fine di valutare se l'efficienza di incapsulazione fosse paragonabile a quanto ottenuto in precedenza. Quindi il lotto è stato preparato risospendendo l'attivo in Etilacetato prima di aggiungerlo alla soluzione polimerica. Andando ad analizzare il contenuto di DXM nelle nanoparticelle si osserva una riduzione dell'incapsulazione rispetto a quanto ottenuto con il PLGA: in presenza del polimero PEGilato l'incapsulazione è pari a 672,7 µg per 100 mg di polimero. Questo risultato potrebbe essere spiegato dalla maggiore idrofilia della matrice polimerica PEGilata che determina una più facile cessione dell'attivo.

Il lotto di nanoparticelle a base di GE11-PLGA/PEG-PLGA caricato con DXM è stato ottenuto seguendo le stesse procedure ottimizzate precedentemente. La quantità di DXM incapsulata è di 785,2 µg/ 100 mg di polimero, come paragonabile per i lotti precedenti.

#### 2.4.8 Rilascio *in vitro* dell'attivo incapsulato

Come descritto, il test di rilascio è stato condotto su campioni di nanoparticelle fresche, risospese in 1 ml di tampone Hepes, pH 7,4; agli

intervalli di tempo prestabiliti, le nanoparticelle sono state centrifugate e tutto il surnatante è stato prelevato ed analizzato mediante HPLC.

I risultati del test di rilascio *in vitro* del DXM condotto sulle nanoparticelle di PLGA, PLGA/PEG-PLGA e GE11-PLGA/PEG-PLGA sono rappresentati in Figura 61.

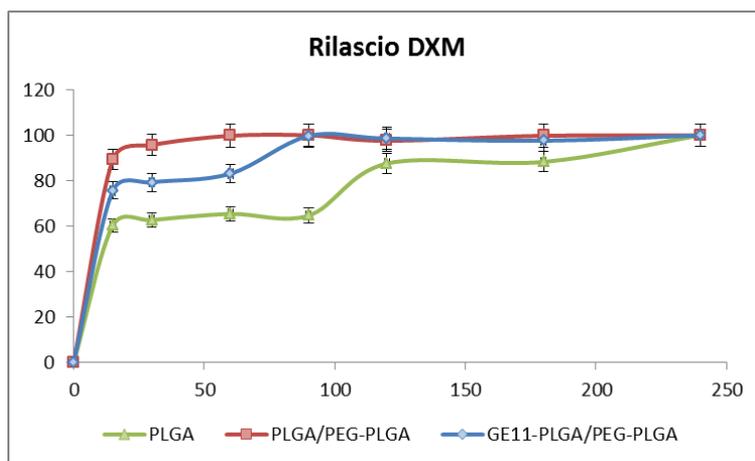


Figura 61: Risultati del test di rilascio *in vitro* del DXM condotto su nanoparticelle di PLGA (verde), PLGA/PEG-PLGA (rosso) e GE11-PLGA/PEG-PLGA (blu).

Come si può osservare dal profilo di rilascio del DXM dalle nanoparticelle allestite, si ottiene per tutte le formulazioni un rilascio completo dell'attivo in 4 ore, come precedentemente dimostrato in letteratura (*Gomez-Graete, Tsapis, et al., 2007*). Si possono osservare delle curve di cessione differenti per i tra casi considerati.

La cessione dell'attivo dalle nanoparticelle di PLGA (verde) è caratterizzata da una cessione veloce dell'attivo nei primi 15 minuti di test, corrispondente al 60% della quantità di attivo veicolata. Questo rapido

rilascio potrebbe essere attribuito alla frazione di farmaco che si trova adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle e non intrappolato all'interno della matrice polimerica. Il *burst release* iniziale è seguito da un rilascio costante che si conclude con una cessione completa dopo 90 minuti di test, probabilmente dovuta al rilascio della quantità di DXM incapsulata.

La presenza del polimero PEGilato (rosso) nella matrice polimerica contribuisce a rendere ancora più rapida la cessione dell'attivo: si raggiunge infatti il rilascio totale del DXM nella prima mezz'ora di test. Questo comportamento potrebbe essere spiegato dalla maggiore idrofilia dovuta alla presenza di PEG e alla ridotta Tg del polimero (vedi paragrafo 2.4.2, Risultati, Parte B).

Il profilo di rilascio del DXM dalle nanoparticelle di GE11-PLGA/PEG-PLGA (blu) è caratterizzato da tre fasi: il *burst release* iniziale nei primi 15 minuti di test, seguito da una fase di plateau corrispondente al 80% della quantità incapsulata; a partire da 60 minuti di test inizia la fase di rilascio dell'attivo che si completa dopo 1 ora e mezza di test. La presenza del polimero PEGilato infatti rende la cessione dell'attivo più veloce rispetto alle nanoparticelle non vettrorizzate con GE11, anche se non è paragonabile a quanto riscontrato solo con il polimero PEG-PLGA. La cessione così rapida potrebbe essere dovuta anche alla riduzione del peso molecolare del GE11-PLGA, come riscontrato dalle analisi GPC. È evidente che buona parte dell'attivo è stata rilasciata nei primi minuti di test: la somministrazione sistemica e locale di queste nanoparticelle potrebbe non essere sufficiente poiché l'attivo verrebbe ceduto prima ancora di raggiungere le cellule

bersaglio. Test *in vivo* sono necessari per valutare meglio questo comportamento.

Dal test di rilascio si può osservare che il farmaco modello (DXM) non è adeguatamente incapsulato all'interno delle nanoparticelle ma piuttosto adsorbito in superficie, determinando il *burst release* che si osserva nei primi minuti di rilascio *in vitro*. Visti questi risultati, una riformulazione delle nanoparticelle è necessaria per migliorare la cinetica di rilascio. Le alternative potrebbero essere l'utilizzo di un polimero a più elevato peso molecolare oppure utilizzare un polimero più idrofobico, come il poli- $\epsilon$ -caprolattone.



**Conclusioni**



## CONCLUSIONI

Il progetto di ricerca è stato suddiviso in due parti, ciascuna delle quali rivolta alla valutazione dell'applicabilità di derivati del polilattide per la realizzazione di sistemi nanoparticellari. L'obiettivo è il trattamento di patologie dell'osso sia attraverso una somministrazione sistemica che attraverso una somministrazione intra-articolare.

Nella prima parte del progetto, quella relativa al polimero PCNL, risulta evidente come le proprietà chimico-fisiche del polimero siano fondamentali per la realizzazione delle nanoparticelle. Infatti, a causa dell'elevato peso molecolare, il polimero non si è dimostrato adatto alla realizzazione di sistemi nanoparticellari di dimensioni opportune, in relazione anche alle metodiche di preparazione disponibili e prese in considerazione. Un'ulteriore indagine di processo potrebbe essere svolta considerando altre metodiche di preparazione, come l'utilizzo di ultrasuoni al fine di ridurre il più possibile la dimensione delle goccioline della soluzione polimerica al momento del gocciolamento.

Nonostante il polimero PCNL non si sia rivelato adatto agli obiettivi di questo progetto di ricerca, in realtà le ottime proprietà biologiche, in particolare l'elevata citocompatibilità, hanno permesso di utilizzare il polimero per la realizzazione di altri sistemi di rilascio per via parenterale.

La seconda parte del lavoro si è concentrata sulla realizzazione di sistemi nanoparticellari intelligenti (*smart nanoparticles*) a partire da un derivato

bio-attivo del PLGA. In particolare il polimero è stato funzionalizzato direttamente con un peptide capace di riconoscere in maniera selettiva il recettore EGFR. Sistemi di questo tipo, possono essere sfruttati per il trattamento di patologie caratterizzate da una sovraespressione del EGFR, quindi sia per il trattamento di tumori che per il trattamento di patologie reumatiche (artrite reumatoide).

Innanzitutto, la metodica di sintesi del coniugato GE11-PLGA è una metodica versatile che si rende adatta alla funzionalizzazione del polimero con diversi peptidi utilizzati come agenti di *targeting*. In questo modo è possibile realizzare *nanoparticulate platforms* capaci di veicolare diverse molecole attive.

Durante il progetto di ricerca, la prima parte del lavoro è stata dedicata all'ottimizzazione del metodo di preparazione delle nanoparticelle polimeriche, valutando diverse metodiche.

È risultato evidente l'effetto dei solventi utilizzati nella realizzazione di nanoparticelle con dimensioni opportune: nello specifico, l'impiego di solventi miscibili in acqua (acetone, DMSO) garantisce l'ottenimento di nanoparticelle di dimensioni inferiori e più stabili nel tempo rispetto all'impiego di solventi non miscibili in acqua ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Queste considerazioni hanno indirizzato la scelta della metodica più opportuna (nanoprecipitazione) per ottenere nanoparticelle adatte all'applicazione finale preposta. Inoltre, grazie ad un approccio sperimentale più razionale sviluppato intorno all'uso del Design of Experiment (DoE), è stato possibile confermare in maniera statistica le osservazioni raccolte a livello sperimentale.

L'effetto del solvente assume un ruolo fondamentale anche nel momento della veicolazione del farmaco all'interno della matrice polimerica. La metodica della nanoprecipitazione, in cui si usano solventi miscibili in acqua, non si è dimostrata efficiente nel tentativo di incapsulare il Desametasone. Il basso peso molecolare e la parziale solubilità in acqua del Desametasone richiedono l'utilizzo di un solvente non miscibile in acqua (etileacetato) per ridurre la diffusione dell'attivo dalla matrice polimerica. In effetti, questa strategia ha portato a risultati migliori.

Un'altra differenza significativa che si riscontra nella dimensione delle nanoparticelle è dipendente dalla struttura chimica del polimero: il polimero PEGilato utilizzato ha permesso di ottenere nanoparticelle di dimensioni minori rispetto al polimero non PEGilato, avente lo stesso peso molecolare e utilizzando la stessa metodica di preparazione delle nanoparticelle. La maggiore idrofilia contribuisce ad un diverso riarrangiamento delle catene polimeriche tale da determinare una maggiore compattezza al sistema e ridurre di conseguenza la dimensione particellare.

Durante questo progetto di ricerca, la caratterizzazione *in vitro* dei sistemi nanoparticellari è stata focalizzata alla determinazione e predizione del comportamento *in vivo* delle stesse.

In particolare, gli studi di stabilità *in vitro* sono stati mirati a valutare cambiamenti della dimensione delle nanoparticelle in condizioni sperimentali che simulano l'ambiente in cui le nanoparticelle si vengono a trovare dopo somministrazione. La dimensione è il primo aspetto da considerare per stimare la distribuzione *in vivo* delle nanoparticelle,

secondo il *targeting* passivo. Entrambe le formulazioni realizzate, con e senza PEG, sono stabili alle diverse condizioni di pH (neutro e acido). Per quanto riguarda la stabilità nei fluidi biologici, le nanoparticelle a base di GE11-PLGA/PEG-PLGA hanno dimostrato un'ottima stabilità nei fluidi biologici selezionati: plasma umano per simulare una somministrazione sistemica e liquido sinoviale umano per simulare una somministrazione locale intra-articolare. In entrambe le condizioni sperimentali selezionate non si è osservata aggregazione delle nanoparticelle ma un aumento della dimensione per formazione di una corona proteica attorno alla superficie delle nanoparticelle. Le dimensioni restano comunque entro valori accettabili (<300 nm). Questi risultati assumono un'importanza maggiore se si pensa che il PEG-PLGA utilizzato per realizzare le nanoparticelle è un polimero a blocchi in cui il PEG si trova tra due residui di PLGA: le nanoparticelle non hanno in superficie residui liberi di PEG che stabilizzano il sistema dandone una tipica caratteristica *stealth*. Probabilmente, al momento della realizzazione delle nanoparticelle, le catene si ripiegano e assumono una conformazione tale da disporre in superficie i residui di PEG. In questo modo, la superficie presenta comunque una buona idrofilia che contribuisce alla stabilità complessiva. Una struttura del genere è quella tipica dei polimerosomi.

Grazie a queste analisi di stabilità *in vitro* è possibile ipotizzare che le nanoparticelle realizzate si comportino come *long circulating nanoparticles*, ovvero nanoparticelle che rimangono nel torrente circolatorio sistemico per un tempo prolungato senza essere eliminate per captazione da parte dei macrofagi. Questo è reso possibile dalla stabilità dimensionale delle

nanoparticelle nel tempo e in diverse condizioni sperimentali: esse infatti mantengono una dimensione intorno a 200 nm, valore oltre il quale è innescata la fagocitosi da parte del RES. Presumibilmente questi sistemi nanoparticellari possono accumularsi nei tessuti bersaglio (tumori) sfruttando la prolungata permanenza in circolo e le differenti fenestrate dei capillari a livello dei tessuti tumorali (*EPR effect*).

A potenziare l'effetto terapeutico delle nanoparticelle contribuisce anche la funzionalizzazione con l'agente di *targeting* attivo rivolto verso il recettore EGFR, il peptide GE11. Come si osserva dai risultati di *uptake* condotti su linee cellulari che sovraesprimono EGFR, il profilo di internalizzazione delle nanoparticelle con GE11 è più veloce e più duraturo rispetto a quanto si riscontra con le nanoparticelle senza il peptide poiché si tratta di un *uptake* attivo, mediato dal recettore.

In merito ai risultati di *uptake*, è importante sottolineare alcuni aspetti.

Le nanoparticelle realizzate si differenziano da quanto presente in letteratura perché il peptide è direttamente collegato al polimero senza la presenza di spaziatori, sfruttando una chimica di funzionalizzazione molto semplice, versatile e meno costosa. In base a questi risultati, anche in assenza dello spaziatore, le nanoparticelle funzionalizzate con il GE11 vengono captate bene dalle cellule e in maniera diversa rispetto alle nanoparticelle non funzionalizzate. Il motivo potrebbe essere riferito ad una buona distribuzione superficiale del peptide, sufficiente comunque a garantire l'interazione con il recettore.

Un'altra curiosità è relativa al comportamento delle nanoparticelle di PLGA. Esse infatti vengono internalizzate dalle cellule con un meccanismo di

*uptake* attivo anche se non presentano nessun agente di *targeting*. Questo è sottolineato dal maggiore profilo di durante incubazione delle cellule a 37°C rispetto a 4°C, che lascia pensare che meccanismi di trasporto attivo siano coinvolti. Indagini approfondite potrebbero aiutare a capire i meccanismi di *trafficking* intracellulare coinvolti in questo fenomeno.

Purtroppo, risultati non pienamente incoraggianti sono stati ricavati dal profilo di rilascio *in vitro*: l'attivo modello selezionato (Desametasone) viene rilasciato troppo velocemente. Questo comportamento non è adatto ad una somministrazione sistemica perché l'attivo verrebbe rilasciato in circolo prima di raggiungere il bersaglio. Per una somministrazione locale, si potrebbe pensare di associare le nanoparticelle ad uno scaffold polimerico che funga da impianto intra-articolare che moduli meglio la cessione dell'attivo. Sarebbe opportuno valutare comunque l'effetto di polimeri con un diverso grado di idro-lipofilia sul profilo di rilascio dell'attivo, come il policaprolattone.

Alla luce di questi risultati, possiamo concludere che i sistemi nanoparticellari realizzati rappresentano un buon sistema di *drug delivery* in cui *targeting* attivo e *targeting* passivo vengono combinati, contribuendo a definire un sistema nanoparticellare efficace nel trattamento di patologie caratterizzate da una sovraespressione del EGFR. Il progetto di ricerca può essere suddiviso in due filoni, per un ulteriore approfondimento: una parte rivolta ad una somministrazione sistemica e una parte rivolta alla somministrazione intra-articolare. La via di somministrazione sistemica potrebbe essere più adatta al trattamento di tumori mentre la via di

somministrazione intra-articolare è più adatta al trattamento di patologie infiammatorie a carico dell'osso.

Ulteriori valutazioni potrebbero coinvolgere lo studio di spaziatori alternativi al PEG, come polisaccaridi o poli-amminoacidi idrofili, al fine di valutare l'impatto e l'effetto di diversi spaziatori sulla captazione delle nanoparticelle all'interno delle cellule.

Nonostante i buoni risultati ottenuti dalla caratterizzazione *in vitro*, i risultati andrebbero confermati con test *in vivo* su animali esprimenti un modello di tumore o di artrite caratterizzato da una sovraespressione del recettore EGFR.

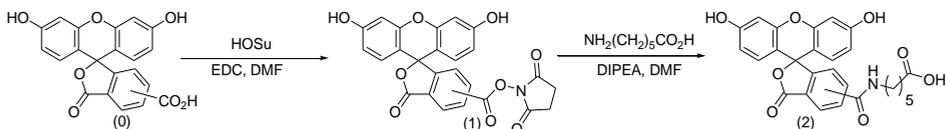


## ANNEX I

## Preparazione del peptide GE11-Fluorescente

Il peptide GE11 è stato marcato con la 5(6)-carbossifluoresceina (MW 376,32,  $\geq 95\%$ , Sigma Aldrich), utilizzando l'acido  $\epsilon$ -amminocapronico come spaziatore tra la catena peptidica e il probe fluorescente.

## Preparazione del probe fluorescente

1. Attivazione della 5(6)-carbossifluoresceina (0)

Per attivare la 5(6)-carbossifluoresceina è stato seguito il protocollo descritto da Adamczyk (BioconChem, 1997, 8, 253).

In breve, **(0)** è stato solubilizzato in DMF anidra sotto atmosfera di gas inerte; EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide) (1.2 equiv) e HOSu (N-idrossisuccinimide) (1.2 equiv) sono stati aggiunti alla soluzione e lasciati sotto agitazione per 24h, mantenendo la soluzione al riparo dalla luce ricoperta con un foglio di alluminio. La reazione è stata monitorata con TLC a fase inversa (RP18). La soluzione è stata diluita con DMF, acetone e tampone fosfato (0.05 M, pH 6) e successivamente estratta 3 volte con una miscela dietilere (Et2O)/etilacetate (EtOAc) (2:1 v:v). La fase organica è stata lavata con acqua e una soluzione satura di NaCl. i residui di acqua sono stati

eliminati con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e i solventi organici sono stati allontanati sotto vuoto ottenendo così il composto 5(6)-carbossifluoresceina succinimidil **(1)** estere attivo.

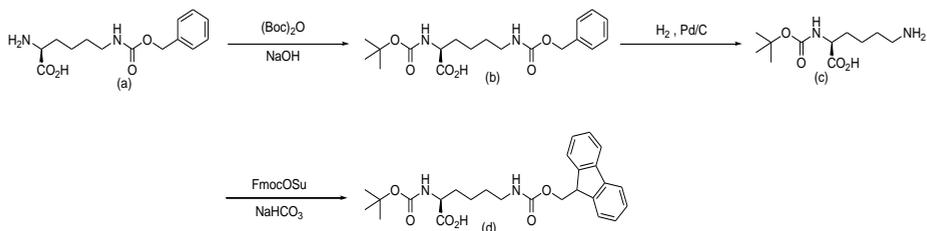
NB Si è deciso di non isolare i due diastereoisomeri e il prodotto non purificato è stato utilizzato per i passaggi successivi

## 2. Reazione con acido $\epsilon$ -aminocaproico

Acido  $\epsilon$ -aminocaproico (1.2 equiv) e DIPEA (2.4 equiv) sono stati aggiunti ad una soluzione di **(1)** in DMF anidra e lasciati sotto agitazione in atmosfera di gas inerte per 24h. La reazione è stata monitorata con TLC in fase inversa (RP18). Successivamente la soluzione è stata diluita con una soluzione di HCl 1M ed estratta 3 volte con una miscela di dietiletere (Et2O)/etilacetate (EtOAc) (2:1 v:v). La fase organica è stata lavata con acqua e una soluzione satura di NaCl, i residui di acqua sono stati eliminati con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e i solventi organici sono stati allontanati sotto vuoto ottenendo così il composto **(2)**.

NB per questa reazione sono stati utilizzati i due diastereoisomeri senza separarli.

### Preparazione della Lisina protetta

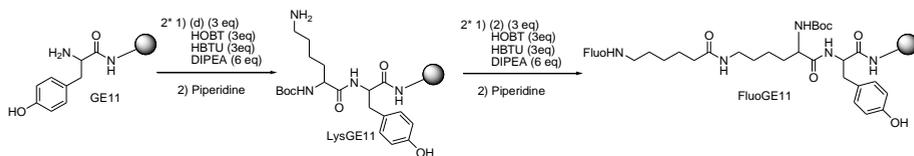


Per poter aggiungere il probe fluorescente alla struttura del peptide abbiamo dovuto aggiungere un residuo di lisina opportunamente protetto al N terminale del GE11; i gruppi protettivi sono stati scelti al fine di favorire l'inserimento del probe quando il peptide si trova ancora legato alla resina. Il residuo di lisina è stato preparato grazie a una procedura ben nota. La lisina disponibile in commercio  $\text{NH}_2\text{-Lis(Z)-OH}$  (**a**) è stata protetta sul gruppo amminico primario in  $\alpha$  usando  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ; la reazione è stata condotta in mezzo acquoso fortemente basico ottenendo così il composto bi-protetto (**b**) (Oskar Keller et al. *Organic Syntheses*, **1985**, 63, 160). Il gruppo Z è stato eliminato per idrogenolisi usando Pd/C (10% Pd content) come catalizzatore (**c**). In ultimo, il gruppo Fmoc è stato introdotto utilizzando FmocOSu in un mezzo acquoso debolmente basico ottenendo così la lisina bi-protetta (**d**).

**NB** La protezione con Boc è sensibile agli acidi mentre la protezione con Fmoc può essere rimossa solo utilizzando ammine secondarie. Questo ci permette di eliminare la protezione con Fmoc dalla lisina senza staccare il peptide dalla resina. Successivamente, il gruppo amminico in  $\alpha$  può essere deprotetto insieme ai gruppi protettivi degli altri amminoacidi nel momento in cui il peptide viene staccato dalla resina.

#### Preparazione del GE11 fluorescente (Ge11-Fluo)

Utilizzando il composto (**d**) come N terminale del peptide GE11, possiamo sfruttare la sintesi peptidica in fase solida (SPPS) con Fmoc come gruppo protettivo per attaccare il probe fluorescente (2) alla catena peptidica. Lo schema seguente riassume gli ultimi passaggi della SPPS del GE11-Fluo.



GE11-Fluo può essere successivamente staccato dalla resina e deproteetto utilizzando TFA, con Triisopropil silano e fenol come scavenger.

## BIBLIOGRAFIA

- Albericio F., 2000. Orthogonal Protecting Groups for Na-Amino and C-Terminal Carboxyl Functions in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Biopolymers (Peptide Science)*, 55: 123–139
- Allen, T.M. 2002. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2: 750-763
- Amblard, M., J.A. Fehrentz, J. Martinez and G. Subra. 2006. Methods and Protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology* 33: 239-254.
- Anderson, J.M. and M.S. Shive. 2012. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64: 72-82.
- Benn, S.C., I. Ay, E. Bastia, R.J. Chian, S.A. Celia, R.B. Pepinsky, et al. 2005. Tetanus toxin fragment C fusion facilitates protein delivery to CNS neurons from cerebrospinal fluid in mice. *Journal of Neurochemistry* 95: 1118-1131.
- Betancourt, T., J.D. Byrne, N. Sunaryo, S.W. Crowder, M. Kadapakkam, S. Patel, et al. 2009. PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 91A: 263-276.
- Bilati, U., E. Allemann and E. Doelker. 2005. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 24: 67-75..
- Braeckmans, K., K. Buyens, W. Bouquet, C. Vervaet, P. Joye, F. De Vos, et al. 2010. Sizing Nanomatter in Biological Fluids by Fluorescence Single Particle Tracking. *Nano Letters* 10: 4435-4442.

- Braeckmans, K., K. Buyens, B. Naeye, D. Vercauteren, H. Deschout, K. Raemdonck, et al. 2010. Advanced fluorescence microscopy methods illuminate the transfection pathway of nucleic acid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 148: 69-74.
- Braeckmans, K., D. Vercauteren, J. Demeester and S.C. De Smedt. 2010. Single Particle Tracking. In: A. Diaspro, editor *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy*. Crc Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Butoescu, N., O. Jordan, P. Burdet, P. Stadelmann, A. Petri-Fink, H. Hofmann, et al. 2009. Dexamethasone-containing biodegradable superparamagnetic microparticles for intra-articular administration: Physicochemical and magnetic properties, in vitro and in vivo drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72: 529-538.
- Costantino, L., F. Gandolfi, G. Tosi, F. Rivasi, M.A. Vandelli and F. Forni. 2005. Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release* 108: 84-96.
- Dawes, G.J.S., L.E. Fratila-Apachitei, K. Mulia, I. Apachitei, G.J. Witkamp and J. Duszczuk. 2009. Size effect of PLGA spheres on drug loading efficiency and release profiles. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 20: 1089-1094.
- De Jong, M., W.A.P. Breeman, D.J. Kwekkeboom, R. Valkema and E.P. Krenning. 2009. Tumor Imaging and Therapy Using Radiolabeled Somatostatin Analogues. *Accounts of Chemical Research* 42: 873-880.
- Dinarvand, R., N. Sepehri, S. Manoochehri, H. Rouhani and F. Atyabi. 2011. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine* 6: 877-895.
- Dwek, R.A. 1996. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chemical Reviews* 96: 683-720.

- Eigenbrot, C. 2002. Structure, function, and activation of coagulation factor VII. *Current Protein & Peptide Science* 3: 287-299.
- Faraj, J.A., R. Dorati, A. Schoubben, D. Worthen, F. Selmin, Y. Capan, et al. 2007. Development of a peptide-containing chewing gum as a sustained release antiplaque antimicrobial delivery system. *Aaps Pharmscitech* 8: 9.
- Fernandez-Carballido, A., P. Puebla, R. Herrero-Vanrell and P. Pastoriza. 2006. Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: Protective effects of low temperature during gamma-irradiation. *International Journal of Pharmaceutics* 313: 129-135.
- Frick, E.M., A.S. Zalusky and M.A. Hillmyer. 2003. Characterization of polylactide-b-polyisoprene-b-polylactide thermoplastic elastomers. *Biomacromolecules* 4: 216-223.
- Gaumet, M., A. Vargas, R. Gurny and F. Delie. 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69: 1-9.
- Ghassemi, A.H., M.J. van Steenberg, H. Talsma, C.F. van Nostrum, D.J.A. Crommelin and W.E. Hennink. 2010. Hydrophilic Polyester Microspheres: Effect of Molecular Weight and Copolymer Composition on Release of BSA. *Pharmaceutical Research* 27: 2008-2017.
- Ghassemi, A.H., M.J. van Steenberg, H. Talsma, C.F. van Nostrum, W. Jiskoot, D.J.A. Crommelin, et al. 2009. Preparation and characterization of protein loaded microspheres based on a hydroxylated aliphatic polyester, poly (lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid). *Journal of Controlled Release* 138: 57-63.
- Godin-Heymann, N., L. Lilkus, B.W. Brannigan, U. McDermott, J. Lamb, S. Maheswaran, et al. 2008. The T790M "gatekeeper" mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 874-879.

- Gogolewski, S. and P. MainilVarlet. 1997. Effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides .2. Poly(L/D-lactide) and poly(L/DL-lactide). *Biomaterials* 18: 251-255.
- Gomez-Graete, C., N. Tsapis, M. Besnard, A. Bochot and E. Fattal. 2007. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 331: 153-159.
- Gompels, L.L., N.M. Malik, L. Madden, P. Jin, M. Feldmann, H.M. Shepard, et al. 2011. Human epidermal growth factor receptor bispecific ligand trap RB200: abrogation of collagen-induced arthritis in combination with tumour necrosis factor blockade. *Arthritis Research & Therapy* 13: 13.
- Gupta, A.P. and V. Kumar. 2007. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide: A critique. *European Polymer Journal* 43: 4053-4074.
- Guzman, F., S. Barberis and A. Illanes. 2007. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 279-314.
- Han, J.H., Y.K. Oh, D.S. Kim and C.K. Kim. 1999. Enhanced hepatocyte uptake and liver targeting of methotrexate using galactosylated albumin as a carrier. *International Journal of Pharmaceutics* 188: 39-47.
- Hermanson G. T. *Bionconjugate techniques*. Second edition. Academic press. 2008
- Higaki, M., T. Ishihara, N. Izumo, M. Takatsu and Y. Mizushima. 2005. Treatment of experimental arthritis with poly(D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64: 1132-1136.
- Horisawa, E., T. Hirota, S. Kawazoe, J. Yamada, H. Yamamoto, H. Takeuchi, et al. 2002. Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit. *Pharmaceutical Research* 19: 403-410.

- Horneff, G., G.R. Burmester, F. Emmrich and J.R. Kalden. 1991. TREATMENT OF RHEUMATOID-ARTHRITIS WITH AN ANTI-CD4 MONOCLONAL-ANTIBODY. *Arthritis and Rheumatism* 34: 129-140.
- Hynes, N.E. and G. MacDonald. 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 177-184.
- Jain, R.A. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21: 2475-2490.
- Javadzadeh, Y., F. Ahadi, S. Davaran, G. Mohammadi, A. Sabzevari and K. Adibkia. 2010. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 81: 498-502.
- Kumar, C.C. 2003. Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Current Drug Targets* 4: 123-131.
- Laroui, H., L. Grossin, M. Leonard, J.F. Stoltz, P. Gillet, P. Netter, et al. 2007. Hyaluronate-covered nanoparticles for the therapeutic targeting of cartilage. *Biomacromolecules* 8: 3879-3885.
- Larsen, C., J. Ostergaard, S.W. Larsen, H. Jensen, S. Jacobsen, C. Lindegaard, et al. 2008. Intra-Articular Depot Formulation Principles: Role in the Management of Postoperative Pain and Arthritic Disorders. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97: 4622-4654.
- Li, Z.H., R.J. Zhao, X.H. Wu, Y. Sun, M. Yao, J.J. Li, et al. 2005. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *Faseb Journal* 19: 1978-1985.
- Liu, P.F., Z.H. Li, M.J. Zhu, Y. Sun, Y.G. Li, H.Z. Wang, et al. 2010. Preparation of EGFR monoclonal antibody conjugated nanoparticles and targeting to hepatocellular carcinoma. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 21: 551-556.

- Low, P.S., W.A. Henne and D.D. Doorneweerd. 2008. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for Imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Accounts of Chemical Research* 41: 120-129.
- Lupold, S.E., B.J. Hicke, Y. Lin and D.S. Coffey. 2002. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research* 62: 4029-4033.
- Master, A., A. Malamas, R. Solanki, D.M. Clausen, J.L. Eiseman and A. Sen Gupta. 2013. A Cell-Targeted Photodynamic Nanomedicine Strategy for Head and Neck Cancers. *Molecular Pharmaceutics* 10: 1988-1997.
- Master, A.M., Y. Qi, N.L. Oleinick and A. Sen Gupta. 2012. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: in vitro studies. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 8: 655-664.
- Maya, S., B. Sarmiento, V.K. Lakshmanan, D. Menon, V. Seabra and R. Jayakumar. 2014. Chitosan cross-linked docetaxel loaded EGF receptor targeted nanoparticles for lung cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 69: 532-541.
- Milane, L., Z. Duan and M. Amiji. 2011. Development of EGFR-Targeted Polymer Blend Nanocarriers for Combination Paclitaxel/Lonidamine Delivery To Treat Multi-Drug Resistance in Human Breast and Ovarian Tumor Cells. *Molecular Pharmaceutics* 8: 185-203.
- Milane, L., Z. Duan and M. Amiji. 2011. Therapeutic Efficacy and Safety of Paclitaxel/Lonidamine Loaded EGFR-Targeted Nanoparticles for the Treatment of Multi-Drug Resistant Cancer. *Plos One* 6.
- Milane, L., Z.-f. Duan and M. Amiji. 2011. Pharmacokinetics and biodistribution of lonidamine/paclitaxel loaded, EGFR-targeted nanoparticles in an orthotopic animal model of multi-drug resistant breast cancer. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 7: 435-444.

- Moghimi, S.M., A.C. Hunter and J.C. Murray. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews* 53: 283-318.
- Moghimi, S.M., A.C. Hunter and J.C. Murray. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb Journal* 19: 311-330.
- Montanari, L., F. Cilurzo, B. Conti, I. Genta, A. Groppo, L. Valvo, et al. 2002. Gamma irradiation effects and EPR investigation on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine. *Farmaco* 57: 427-433.
- Morales, J.O. and J.T. McConville. 2011. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77: 187-199.
- Nahta, R. and F.J. Esteva. 2006. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters* 232: 123-138.
- Nicolas, J., S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz and P. Couvreur. 2013. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews* 42: 1147-1235.
- Noga, D.E., T.A. Petrie, A. Kumar, M. Weck, A.J. Garcia and D.M. Collard. 2008. Synthesis and modification of functional poly(lactide) copolymers: Toward biofunctional materials. *Biomacromolecules* 9: 2056-2062.
- Raquez, J.M., Y. Habibi, M. Murariu and P. Dubois. 2013. Poly(lactide) (PLA)-based nanocomposites. *Progress in Polymer Science* 38: 1504-1542.
- Rocha-Lima, C.M., H.P. Soares, L.E. Ruez and R. Singal. 2007. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 14: 295-304.
- Romberg, B., J.M. Metselaar, L. Baranyi, C.J. Snel, R. Bunger, W.E. Hennink, et al. 2007. Poly(amino acid)s: Promising enzymatically degradable

- stealth coatings for liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 331: 186-189.
- Ruoslahti, E. 2012. Peptides as Targeting Elements and Tissue Penetration Devices for Nanoparticles. *Advanced Materials* 24: 3747-3756.
- Russell-Jones, G., K. McTavish, J. McEwan, J. Rice and D. Nowotnik. 2004. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *Journal of Inorganic Biochemistry* 98: 1625-1633.
- Russelljones, G.J., S.W. Westwood and A.D. Habberfield. 1995. VITAMIN-B-12 MEDIATED ORAL DELIVERY SYSTEMS FOR GRANULOCYTE-COLONY-STIMULATING FACTOR AND ERYTHROPOIETIN. *Bioconjugate Chemistry* 6: 459-465.
- Scott, D.L., F. Wolfe and T.W.J. Huizinga. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376: 1094-1108.
- Serrano-Pozo, A., C.M. William, I. Ferrer, E. Uro-Coste, M.B. Delisle, C.A. Maurice, et al. 2010. Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain* 133: 1312-1327.
- Seyednejad, H., A.H. Ghassemi, C.F. van Nostrum, T. Vermonden and W.E. Hennink. 2011. Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release* 152: 168-176.
- Seyednejad, H., T. Vermonden, N.E. Fedorovich, R. van Eijk, M.J. van Steenbergen, W.J.A. Dhert, et al. 2009. Synthesis and Characterization of Hydroxyl-Functionalized Caprolactone Copolymers and Their Effect on Adhesion, Proliferation, and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Biomacromolecules* 10: 3048-3054.
- Sullivan, T., C.G. Benjamin, P.W. Kempf and J.F. Deeken. 2010. Cetuximab in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Jcr-Journal of Clinical Rheumatology* 16: 32-33.

- Swanson, C.D., E.H. Akama-Garren, E.A. Stein, J.D. Petralia, P.J. Ruiz, A. Edalati, et al. 2012. Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Ameliorates Collagen-Induced Arthritis. *Journal of Immunology* 188: 3513-3521.
- te Boekhorst, B.C.M., L.B. Jensen, S. Colombo, A.K. Varkouhi, R.M. Schiffelers, T. Lammers, et al. 2012. MRI-assessed therapeutic effects of locally administered PLGA nanoparticles loaded with anti-inflammatory siRNA in a murine arthritis model. *Journal of Controlled Release* 161: 772-780.
- Theryo, G., F. Jing, L.M. Pitet and M.A. Hillmyer. 2010. Tough Polylactide Graft Copolymers. *Macromolecules* 43: 7394-7397.
- Wanamaker, C.L., W.B. Tolman and M.A. Hillmyer. 2009. Hydrolytic Degradation Behavior of a Renewable Thermoplastic Elastomer. *Biomacromolecules* 10: 443-448.
- White, K.L., T. Rades, R.H. Furneaux, P.C. Tyler and S. Hook. 2006. Mannosylated liposomes as antigen delivery vehicles for targeting to dendritic cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58: 729-737.
- Yarden, Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* 37: S3-S8.
- Zhang, H.T., A. Berezov, Q. Wang, G. Zhang, J. Drebin, R. Murali, et al. 2007. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *Journal of Clinical Investigation* 117: 2051-2058.
- Zille, H., J. Paquet, C. Henrionnet, J. Scala-Bertola, M. Leonard, J.L. Six, et al. 2010. Evaluation of intra-articular delivery of hyaluronic acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees. *Bio-Medical Materials and Engineering* 20: 235-242.