



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE

XXV° CICLO

TESI DI DOTTORATO

Sviluppo di nano vettori intelligenti per il targeting sito-specifico di sistemi terapeutici

Supervisore: Dott. Stefano Salmaso

Direttore della Scuola: Prof. Antonino Polimeno

Dottoranda: Elena Ravazzolo

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

ABBREVIAZIONI	6
RIASSUNTO	7
1. INTRODUZIONE	10
1.1 Nanomedicina	12
1.1.1 Sistemi di drug delivery per il targeting tumorale	14
1.1.2 Principali sistemi di <i>targeted drug delivery</i>	16
1.1.3 Liposomi	18
1.1.3.1 <i>Classificazione dei liposomi</i>	20
1.1.3.2 <i>Interazione dei liposomi con target biologici</i>	23
1.1.3.3 <i>Principali applicazioni terapeutiche dei liposomi</i>	24
1.1.4 Biomateriali impiegati nei sistemi di drug delivery	26
1.2 La neoplasia e la terapia antitumorale	28
1.2.1 Fisiopatologia del tumore	28
1.2.1.1 <i>Angiogenesi tumorale ed effetto EPR</i>	29
1.2.1.2 <i>Ipermetabolismo e acidosi tumorale</i>	32
1.2.1.3 <i>Ipossia</i>	34
1.2.1.4 <i>Equilibrio redox</i>	35
1.2.2 Modalità di intervento terapeutico nei tumori	36
1.2.3 Biodisponibilità di farmaci antitumorali	37
1.2.3.1 <i>Farmaci antitumorali: doxorubicina</i>	39
1.2.3.2 <i>Metodo di caricamento di doxorubicina in liposomi attraverso gradiente di ioni ammonio</i>	41
1.3 Descrizione generale di materiali e metodiche impiegate nel progetto per la preparazione di liposomi pH sensibili a base di sulfadimetossina	43
1.3.1 Polietilenglicole	43
1.3.2 Sulfadimetossina	46
1.3.3 Polimerizzazione radicalica	48
1.3.3.1 <i>Controlled/living radical polymerization (CRP)</i>	50

1.3.3.2 <i>Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)</i>	53
1.3.3.3 <i>AGET-ATRP</i>	58
2 MATERIALI E METODI	61
2.1 Materiali	61
2.1.1 Reagenti	61
2.1.2 Strumentazione	62
2.2 Metodi	64
2.2.1 Test di Snyder per la determinazione di gruppi amminici primari	64
2.2.2 Test allo iodio per la determinazione quantitativa del polietilenglicole	65
2.2.3 Determinazione del rapporto PEG:SDM nel polimero stearoil-PEG-poli(SDM)	66
2.2.4 Test della BCA per la quantitativa cellulare	67
2.2.5 Analisi cromatografica mediante HPLC per la quantificazione di doxorubicina	68
2.2.6 Analisi fluorimetrica per la determinazione di doxorubicina	69
2.2.7 Determinazione quantitativa di 5(6)-carbossilfluoresceina mediante spettroscopia UV-Vis	70
2.2.8 Coniugazione di PEG-diammino con stearoil cloruro e sulfadimetossina metacrilata	71
2.2.8.1 Sintesi di sulfadimetossina metacrilata	71
2.2.8.2 Modifica di PEG-diammino con stearoil cloruro	72
2.2.8.3 <i>Modifica di stearoil-PEG-NH₂ con bromo isobutirilbromuro</i>	73
2.2.8.4 <i>Polimerizzazione radicalica di SDM mediante AGET-ATRP</i>	74
2.2.9 Determinazione del punto di aggregazione del coniugato stearoil-PEG- poli(SDM)	75
2.2.10 Preparazione e caratterizzazione di liposomi	75
2.2.11 Studio di stabilità di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG- poli(SDM)	77
2.2.12 Studio di stabilità di liposomi acido sensibili st. con PEG ₅₀₀₀ KDa DSPE	78
2.2.13 Cinetica di aggregazione pH dipendente di liposomi acido sensibili stearoil- PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25%	78

2.2.14	Studio di stabilità di liposomi acido sensibili stearoil-PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25% in RPMI e FBS.	79
2.2.15	Studio di caricamento di liposomi con 5(6)-carbossifluoresceina	79
2.2.16	Studio di leakage di 5(6)-carbossifluoresceina da liposomi acido sensibili	80
2.2.17	Studio di rilascio di 5(6)-carbossifluoresceina da liposomi acido sensibili in condizioni sink	81
2.2.18	Studio di caricamento di liposomi con doxorubicina	81
2.2.19	Studio di rilascio di doxorubicina da liposomi acido sensibili in condizioni sink	82
2.2.20	Caratterizzazione biologica in vitro	83
2.2.20.1	Coltivazione di cellule tumorali MCF-7	83
2.2.20.2	Studio di citotossicità in vitro di liposomi acido sensibili	83
2.2.20.3	Studio di uptake di liposomi su linea cellulare MCF-7	84
2.2.20.4	Studio citofluorimetrico su cellule MCF-7 incubate con liposomi acido sensibili	85
2.2.20.5	Studio di microscopia confocale	85
2.2.20.6	Studio di biodistribuzione in vivo	86
3	RISULTATI	88
3.1	Sintesi del coniugato stearoil-PEG-poli(SDM)	88
3.1.1	Sintesi di sulfadimetossina metacrilata	88
3.1.2	Sintesi del coniugato stearoil-PEG-NH ₂	91
3.1.3	Sintesi di stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH ₂) ₂ -Br	92
3.1.4	Polimerizzazione radicalica AGET-ATRP di sulfadimetossina su stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH ₃) ₂ -Br	94
3.2	Analisi turbidimetrica e determinazione del pH di aggregazione di stearoil-PEG-poli(SDM)	95
3.3	Studio di stabilità di liposomi acido sensibili	96
3.4	Cinetica di aggregazione di liposomi acido sensibili stearoil-PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25%	99
3.5	Studio di stabilità in RPMI e FBS	103
3.6	Studio di permeabilità di 5(6)-carbossifluoresceina da liposomi acido sensibili	105

3.7	Determinazione dell'efficienza di caricamento di doxorubicina in liposomi stearoil-PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25% mol/mol	107
3.8	Studio di rilascio di doxorubicina da liposomi acido sensibili in condizioni sink	108
3.9	Studio di citotossicità in vitro di liposomi acido sensibili	109
3.10	Cinetica di associazione cellulare di liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) su cellule MCF-7	111
3.11	Analisi di microscopia confocale	114
3.12	Studio di biodistribuzione	116
4	DISCUSSIONE	118
5	CONCLUSIONI	129
6	BIBLIOGRAFIA	131

ABBREVIAZIONI

- ACN	Acetonitrile
- CAC	Critical Aggregation Concentration
- CDCl ₃	Cloroformio deuterato
- CF	5(6)-carbossifluoresceina
- CMC	Critical Micellar Concentration
- DCM	Diclorometano
- DDS	Drug Delivery Systems
- DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
- DMF	Dimetilformammide
- DMSO-d ₆	Dimetilsolfossido deuterato
- DXR	Doxorubicina
- EPR	Effect Permeability Retention
- MCF-7	Linea cellulare di adenocarcinoma mammario
- MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
- NMR	Nuclear Magnetic Resonance
- PBS	Phosphate Buffer Saline
- PEG	Polietilenglicole
- RP-HPLC	Hight Performance Liquid Chromatography
- SDM	Sulfadimetossina metacrilata
- TEA	Trietilammina
- TFA	Acido trifluoroacetico
- TNBS	Acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico
- UV-Vis	Ultravioletto-Visibile

RIASSUNTO

Il progetto di ricerca sviluppato ha visto lo sviluppo di un nuovo sistema nanovettoriale intelligente per uso farmaceutico con composizione e architettura tali da consentire una risposta adeguata qualora vengano a contatto con condizioni fisiopatologiche alterate.

E' noto da studi riportati in letteratura, che tessuti affetti da particolari patologie manifestano alterazioni molto definite. Nello specifico, i tessuti tumorali in genere manifestano variazioni di pH, temperatura, potenziale ossidoriduttivo, corredo enzimatico rispetto ai tessuti sani. È quindi possibile disegnare nano sistemi combinando chimicamente o fisicamente materiali di diversa natura che rispondano con alterazioni morfologiche o superficiali solo quando vengono a contatto con il microambiente specifico per cui sono stati disegnati. Ciò consentirà di ottenere sistemi sito-specifici. Le variazioni morfologiche di tali sistemi sono volte a migliorare l'interazione con le cellule del sito bersaglio, promuoverne la penetrazione, intrappolarli nel tessuto e innescare il rilascio di farmaci con cui possono essere previamente caricati.

I sistemi macromolecolari intelligenti oggetto della ricerca sono dei liposomi acido-sensibili per la presenza di un PEG lineare bifunzionale coniugato da un lato con un fosfolipide o una catena alchilica di lunghezza variabile e dall'altro con molecole pH-sensibili polimerizzate. Diammino-PEG (3.4 kDa) è stato coniugato da un lato con stearoil cloruro mentre il secondo gruppo amminico è stato invece coniugato con bromo-isobutirrilbromuro, al fine di introdurre nel polimero un gruppo chimico in grado di fungere da iniziatore per la polimerizzazione radicalica AGET-ATRP di sulfadimetossina metacrilata. La sulfadimetossina è stata scelta poiché presenta un

carattere idrofobico o idrofilico a seconda del pH del mezzo in cui si trova mentre il PEG conferisce solubilità al sistema e proprietà stealth in vivo. Tutti gli intermedi e il coniugato finale sono stati adeguatamente purificati e caratterizzati con le tecniche spettroscopiche più adeguate. Il sistema ottenuto ha quindi la capacità di cambiare struttura e proprietà chimico-fisiche in funzione del pH e potrà quindi essere impiegato per un rilascio sito specifico di farmaci in tessuti in cui il pH è alterato. La presenza di unità ripetitive di sulfadimetossina sulla superficie dei liposomi garantisce l'acido sensibilità del sistema e permettono di avere un'associazione con il tessuto tumorale preferenziale una volta che il sistema è stato stimolato dalla caduta di pH associata al tessuto tumorale rispetto a quello sano. Studi analitici hanno evidenziato come, in seguito a diminuzione del pH del medium circostante si manifesti l'aggregazione fisica del nanosistema e come tale evento sia condizionato dal numero di molecole di sulfadimetossina legate. Nel presente progetto è stato selezionato un coniugato con undici molecole di SDM. La stabilità della formulazione liposomiale è stata in seguito implementata attraverso l'aggiunta di PEG5000 KDa-DSPE, un polimero neutro che non possiede proprietà acido sensibili ma che grazie alla sua struttura anfifilica è in grado di inserirsi nel doppio strato fosfolipidico dei liposomi andando così ad incrementarne la stabilità nel tempo. Attraverso analisi DLS (dynamic light scattering) si è potuto osservare l'aumento dimensionale dei liposomi in funzione della diminuzione di pH. Questi dati sono la prima prova evidente che i liposomi rispondono a stimoli ambientali cambiando il loro stato fisico. La diminuzione di pH ne induce infatti aggregazione e precipitazione. Studi di citofluorimetria e di microscopia confocale eseguiti incubando cellule MCF-7 di tumore mammario a pH neutro e a pH 6.5 hanno evidenziato che il sistema in esame penetra nelle cellule in modo più consistente a pH

acido confermando la responsività a stimoli fisio-patologici. Al fine di approfondire il comportamento del sistema quale sistema di drug delivery, sono stati inoltre eseguiti degli studi di biodistribuzione in vivo utilizzando topi BALB/c inoculati con un modello tumorale appropriato.

1- INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni la ricerca tecnologica-farmaceutica si è interessata con un grande impegno di energie allo sviluppo di piattaforme nanotecnologiche per il *drug delivery* che hanno portato alla realizzazione di numerosi prodotti in grado di migliorare il profilo terapeutico dei farmaci.

Un prodotto nano tecnologico è stato definito dall'Unione Europea come:

“A natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm - 100 nm.

In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety or competitiveness the number size distribution threshold of 50 % may be replaced by a threshold between 1 and 50 %.

By derogation from the above, fullerenes, graphene flakes and single wall carbon nanotubes with one or more external dimensions below 1 nm should be considered as nanomaterials.”

Sulla scia dei risultati ottenuti in vari settori delle nanotecnologie come ad esempio quello chimico, energetico, dei materiali, agricolo, medico, farmaceutico ecc, numerose agenzie governative ed organizzazioni private hanno mostrato un considerevole interesse scientifico ed economico per il mondo *nanotech*. Per questo sono stati stanziati considerevoli investimenti per finanziarne le ricerche di questo settore e per sviluppare nuove tecnologie (Hulmann A., 2006). Il *National Nanotechnology Initiative* (NNI,

<http://www.nano.gov/about-nni>) è un programma di ricerca statunitense fondato nel 2000 che opera nel campo delle nanoscienze attraverso la collaborazione di 25 agenzie federali, delle quali 15 finanziano attivamente progetti di ricerca e sviluppo (*Research and Development*, R&D) nel campo delle nanoscienze e delle nanotecnologie. Il Fondo Federale statunitense ha stanziato per il 2013 1800 milioni di dollari per il *National Nanotechnology Initiative* (NNI, <http://www.nano.gov/about-nni>), cifra che dimostra il notevole interesse sia del mondo scientifico sia di quello industriale. Le nanoscienze e le nanotecnologie rappresentano infatti una realtà ormai affermata nel mondo scientifico in quanto permettono di studiare e produrre materiali, strutture e dispositivi con proprietà e funzionalità innovative. Esse si basano su un insieme di tecnologie e processi che richiedono un approccio multidisciplinare coinvolgendo numerosi ambiti di ricerca che vanno dalla chimica supramolecolare alla fisica quantistica, dalla scienza dei materiali alla biologia molecolare, dall'ingegneria meccanica a quella chimica o elettronica. Le prospettive rivoluzionarie associate alle nanotecnologie derivano dal fatto che comportamenti e caratteristiche della materia allo stato colloidale sono drasticamente diverse da quelle che si osservano in dimensioni macro. Gli approcci maggiormente seguiti dai ricercatori per sviluppare sistemi nanotecnologici si suddividono essenzialmente in due tipologie: i metodi '*top-down*' (dall'alto verso il basso) e quelli '*bottom-up*' (dal basso verso l'alto). I metodi '*top-down*' si propongono di raggiungere dimensioni nanometriche riducendo con metodi fisici, chimici e meccanici le dimensioni di sistemi già esistenti, mentre i metodi '*bottom-up*' sfruttano l'impiego di componenti atomici o molecolari che vengono utilizzati come '*building blocks*' e che sono in grado di organizzarsi, mediante interazioni fisiche o legami chimici, in sistemi supramolecolari sia di tipo inorganico sia organico. Allo stato attuale

le tecniche *'top-down'* sono generalmente quelle più consolidate nel campo della nanoelettronica e della nano ingegneria. Queste tecniche consentono di ottenere materiali di composizione semplice sfruttando processi comunemente propri della microelettronica, come ad esempio la litografia a fascio di elettroni o a raggi X, per ridurre le dimensioni dei dispositivi fino a livello nanometrico. Per quanto riguarda invece applicazioni di tipo farmaceutico, i prodotti colloidali hanno una struttura più complessa e per questo vengono usualmente ottenuti attraverso tecniche *'bottom-up'*. Tali metodiche sono più complesse rispetto a quelle top-down e per questa ragione i risultati sono spesso ancora confinati a livello

1.1- Nanomedicina

Attualmente l'interesse per la nanomedicina e le nanotecnologie in campo farmaceutico a livello mondiale sta rapidamente crescendo ed, in seguito ad una indagine effettuata dall'Istituto inglese per le Nanotecnologie in collaborazione con l'Agenzia Internazionale per l'Economia, il Commercio e lo Sviluppo delle Nazioni (OECD), ha identificato come protagonisti nello sviluppo di nuove applicazioni industriali in campo farmaceutico, quali sistemi avanzati di direccionamento di farmaci, nuove terapie, e sviluppi nell'ambito dell'*imaging* per la diagnostica e dei biosensori, gli Stati Uniti (48%), l'Inghilterra (20%), la Germania (17%), la Svizzera (8%), la Svezia (4%) e il Giappone (3%).

La nanomedicina nel 2004 ha prodotto sistemi terapeutici per un fatturato di 6,8 miliardi di dollari, con oltre 200 aziende e 38 prodotti nel mondo. Nell'aprile 2006 la rivista Nature Materials stimava che fossero stati sviluppati nel mondo circa 130 tra farmaci e

sistemi di veicolazione di farmaci basati sulla nanotecnologia, ma questi dati sono destinati comunque a crescere.

La nanomedicina si occupa nello specifico di sviluppare le nanotecnologie per applicazioni farmacologiche e mediche. La European Technology Platform of Nanomedicine ha definito la nanomedicina come la nanotecnologia applicata alla salute. La European Science Foundation nel 2004 ha definito la nanomedicina come la scienza e la tecnologia di diagnosi, trattamento e prevenzione di patologie e traumi, di alleviamento del dolore e di preservazione e miglioramento della salute umana attraverso l'uso di sistemi e delle conoscenze molecolari del corpo umano.

In accordo con la definizione di un prodotto nano tecnologico, in campo farmaceutico l'espressione 'nano' di solito viene utilizzata per identificare sistemi inferiori ai 200 nm, tuttavia spesso si indicano impropriamente prodotti nano tecnologici farmaceutici in modo ampio arrivando a comprendere sistemi di dimensioni inferiori a 1 μ m.

L'obiettivo della nanomedicina è di ottenere farmaci e dispositivi di struttura e composizione esattamente controllate e con dimensioni comparabili a quelle delle biomolecole con cui devono interagire. La nanomedicina si sta affermando in molti settori della medicina, grazie allo sviluppo di nuovi materiali che stanno cambiando le metodiche operative con nuove applicazioni in ambito chirurgico fornendo protesi sempre meglio tollerate e più biocompatibili. L'utilizzo di sistemi di dimensioni paragonabili a quelle di un virus capaci di penetrare nelle cellule con facilità consente lo sviluppo di sistemi per diagnosi più precoci e accurate. In terapia le nanotecnologie possono portare a benefici per quanto riguarda l'impiego di farmaci con inadeguate proprietà chimico-fisiche e biofarmaceutiche (farmaci di classe biofarmaceutica II, III e

IV). Ad esempio è possibile ottenere farmaci con migliorate caratteristiche di solubilità o incapsulare il farmaco in un rivestimento lipidico e polimerico adeguato che permetta di superare le barriere gastrointestinali e di raggiungere rapidamente il circolo.

In nessun campo gli effetti delle nanotecnologie sono stati così rilevanti come in quello oncologico perché esse permettono di sfruttare alcune peculiarità del tessuto tumorale, tra cui permeabilità dei vasi e la ritenzione nei tessuti tumorali. Proteine modificate, liposomi, micelle polimeriche, nanoparticelle e nanogel sono già entrate in commercio o sono in fase di sperimentazione clinica. Il *drug delivery* è infatti uno dei settori più rilevanti e vivaci in cui la nanomedicina mostra le sue potenzialità. (Freitas Jr, R. 2003, Wagner, V 2005).

1.1.1 Sistemi di drug delivery per il targeting tumorale

Come già accennato, per la maggior parte dei farmaci attualmente in uso l'attività terapeutica è determinata dalla loro concentrazione nel sito, compartimento subcellulare, cellula, tessuto o organo, in cui deve agire.

Dopo somministrazione, la distribuzione dell'agente terapeutico nell'organismo dipende, oltre che dalla via di somministrazione, dalle sue caratteristiche chimico-fisiche e dalle caratteristiche anatomiche e fisio-patologiche dei vari distretti. Tuttavia, in genere, il farmaco si distribuisce più o meno estesamente a livello sistemico e pertanto, affinché venga raggiunta una concentrazione di farmaco efficace nel sito d'azione per il periodo di trattamento terapeutico, è necessaria la somministrazione in dosi elevate e ripetute con il conseguente instaurarsi di effetti tossici secondari.

Il “*drug targeting*”, definito come la capacità di trasportare in modo selettivo e quantitativo un farmaco nel sito d’azione indipendentemente dal compartimento e dal metodo di somministrazione, rappresenta una soluzione a queste problematiche.

Il concetto di *drug targeting* fu inizialmente suggerito da Paul Ehrlich con la teoria del “*magic bullet*”. Ehrlich descrisse un ipotetico “*magic bullet*” in grado di agire selettivamente sul bersaglio farmacologico. Questo concetto è stato sviluppato in diversi modi. Da un punto di vista strettamente chimico-farmaceutico, il concetto di Ehrlich ha portato allo studio e allo sviluppo di nuovi agenti terapeutici ad attività selettiva in grado di riconoscere i bersagli farmacologici su cui agire e non agire sulle strutture o sulle funzioni non coinvolte nella patologia. Questo approccio ha trovato uno sviluppo di particolare interesse nell’ambito delle biotecnologie che hanno permesso di produrre farmaci ad elevata selettività funzionale quali anticorpi, citochine, enzimi. In ambito tecnologico farmaceutico il concetto di Ehrlich ha portato alla definizione di prodotti in grado di trasportare e rilasciare in modo selettivo i farmaci nel sito d’azione attraverso il coordinamento di tre componenti: (a) farmaco; (b) molecola *targeting*; (c) nanocarrier necessario ad amplificare il numero di molecole di farmaco associate ad ogni singola molecola *targeting*

Il concetto formulato da Ehrlich rappresenta una struttura semplice caratterizzata dalla minima complessità strutturale. Da questo concetto di base sono stati sviluppati numerosi sistemi di *drug targeting* molto più sofisticati e complessi. Tali sistemi sono strutture colloidali, multifunzionali quali: liposomi, micelle, dendrimeri, nanoparticelle polimeriche e metalliche, cocleati, nanocarbotubi, bioconiugati polimerici, nano-idrogeli,.

Le caratteristiche che determinano il profilo in vivo di quali sistemi sono: degradabilità, dimensioni e proprietà superficiali.

Per quanto riguarda le caratteristiche superficiali, i nanosistemi possono essere modificati in superficie, ricoperti (*coated*) o decorati (*decorated*) in modo da conferire loro caratteristiche di biocompatibilità o di elusione dei sistemi biologici di riconoscimento (RES), oppure derivatizzati con ligandi biologici per il direccionamento attivo. Infine, possono essere modificati con componenti funzioni molecolari che rispondono a stimoli interni o esterni caricati che favoriscono il rilascio del farmaco nel sito d'azione.

1.1.2 Principali sistemi di *targeted drug delivery*

I principali sistemi di *drug targeting* si avvalgono di alcuni approcci che possono essere riassunti come segue:

- a) targeting attivo di riconoscimento attraverso: sistemi funzionalizzati con ligandi specifici (piccole molecole, citochine, anticorpi) che possiedono elevata affinità per un recettore espresso esclusivamente o in prevalenza in un particolare sito biologico.
- b) targeting attivo chimico-fisico con sistemi intelligenti che rispondono ad anormali valori di pH e/o temperatura del tessuto tumorale.
- c) accumulo passivo del farmaco mediante effetto di enhanced permeation and retention (EPR) garantito da una vascolarizzazione di tipo "leaky".

- d) impiego di carrier paramagnetici che vengono direzionati sul sito bersaglio per applicazione di un campo magnetico esterno.

I sistemi di *drug delivery* possono essere progettati in modo da combinare in parte o tutte queste funzioni per creare nanosistemi multifunzionali ad ampia sito-specificità per l'ambiente fisiopatologico dell'organismo a cui sono diretti. Questo permette ai nanosistemi carichi con uno o più farmaci di circolare nel sangue per tempi sufficientemente lunghi senza essere rimossi rapidamente dal sistema reticolo endoteliale (RES) e quindi di accumularsi in maniera specifica nei siti bersaglio e rispondere a stimoli microambientali (o applicati dall'esterno) che ne inducano il rilascio di farmaci.

I tessuti tumorali solidi presentano alcune peculiari caratteristiche fisiopatologiche che possono essere opportunamente sfruttate per la veicolazione e il rilascio selettivo di farmaci. Le cellule tumorali spesso presentano, esprimono o sovraesprimono specifici recettori di membrana ed hanno un potenziale redox e un corredo enzimatico alterati. Inoltre, a causa dell'elevato metabolismo, i tumori solidi presentano le tipiche caratteristiche di un tessuto infiammato con una temperatura superiore e un pH inferiore rispetto ai tessuti sani. I sistemi direzionati possono pertanto sfruttare queste caratteristiche per rilasciare in modo specifico il farmaco nella massa tumorale.

I sistemi acido-sensibili sfruttano il basso pH dei tessuti tumorali per il direzionamento e rilascio sito specifico di farmaci. Tra questi vi sono bioconiugati chimici che rilasciano il farmaco per idrolisi acida del legame farmaco-trasportatore e sistemi assemblati fisici, quali liposomi e micelle, la cui struttura, superficie e dimensione cambiano al variare del pH.

I liposomi sono vescicole *reservoir* costituite da un doppio strato di fosfolipidi e colesterolo in grado sia di incorporare molecole lipofile nel doppio strato fosfolipidico, sia di incapsulare composti idrofilici nel *core* acquoso.

I bioconiugati polimerici sono sistemi ottenuti legando molecole bioattive a supporti inerti di tipo polimerico. Un esempio di bioconjugato biodegradabile *stimuli responsive* è dato da un backbone derivato dalla polimerizzazione tra 1,4-butanediolo diacrilato (BDA) e 1-(2-aminoetil)piperazino (AEPZ) sul quale vengono legate catene di NIPAAm, derivato dall'N-isopropilacrilammide dalle proprietà responsive. (Wu, D.C., et al, 2007). I primi liposomi pH sensibili sono stati ottenuti con fosfatidiletanolamina coniugata a catene aciliche insature in grado di destabilizzare la struttura vescicolare al diminuire del pH (Wang C.Y. et al, 1989). Un altro esempio è dato dalla funzionalizzazione di liposomi con copolimeri costituiti dal PEG e catene pH sensibili di N-isopropilacrilammide o acido metacrilico (E. Roux et al, 2004).

1.1.3 Liposomi

I liposomi sono stati scoperti nel 1961 da Alec D. Bangham quando osservò che fosfolipidi in acqua riarrangiano per formare vescicole cave disponendo ordinatamente le loro teste polari e le loro code lipofile a doppio strato (*bilayer* fosfolipidico) (Bangham, A. D., and Horne, R. W., 1964). Sebbene i liposomi possano essere ottenuti assemblando solo fosfolipidi, lipidi sintetici o sfingolipidi, usualmente viene utilizzato anche colesterolo. La composizione lipidica dei liposomi conferisce al sistema peculiari caratteristiche strutturali e comportamenti *in vitro* e *in vivo* (Torchilin, V. P., 2006).

I liposomi hanno dimensioni variabili comprese tra i 50 ed i 1000 nm e, come riportato in Figura 1, vengono classificati in base al loro diametro (*ultra-small*, *small*, *medium* e *large*) ed alla struttura (*unilamellar*, *multilamellar*, *multivesicle vesicles*). Queste caratteristiche influiscono in modo significativo sulla loro emivita plasmatica e sul grado di caricamento di farmaci.

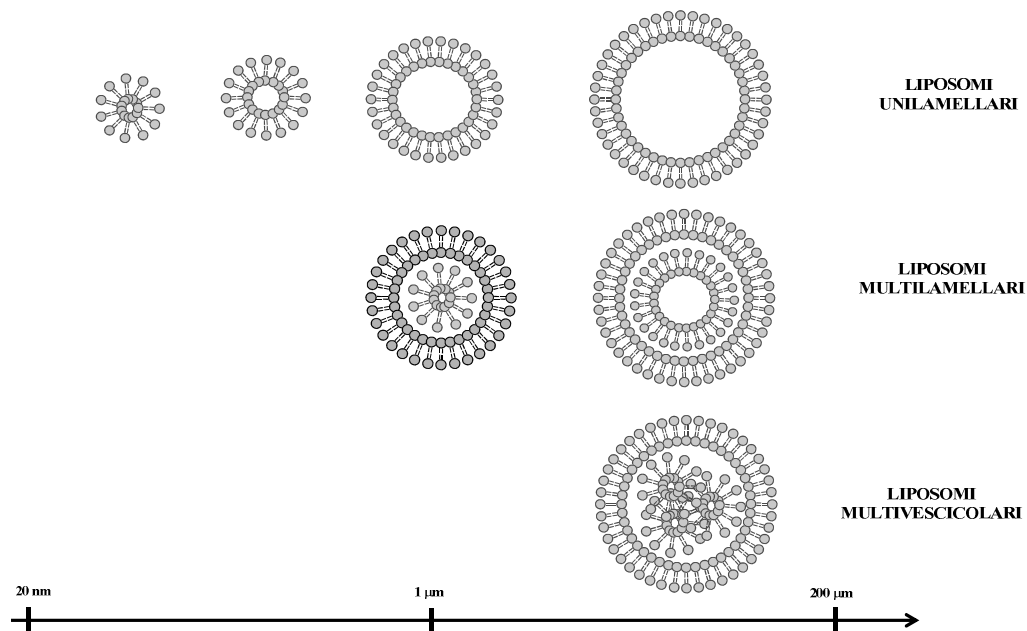


Figura 1: Classificazione di liposomi.

I liposomi unilamellari sono formati da un unico doppio strato fosfolipidico e racchiudono al loro interno un *core* acquoso, i liposomi multilamellari sono formati da vari doppi strati fosfolipidici concentrici mentre i liposomi multi vescicolari sono costituiti da una vescicola esterna che ne contiene altre non concentriche.

I liposomi sono in grado di caricare molecole farmacologicamente attive e possono quindi essere utilizzati come validi sistemi di *drug delivery*. Farmaci idrofilici possono essere caricati nel core acquoso o nella fase acquosa del doppio strato fosfolipidico

mentre farmaci lipofili si distribuiscono nella fase lipidica del doppio strato fosfolipidico. Inoltre i farmaci possono adsorbirsi sulla superficie dei liposomi attraverso la formazione di legami di carica, ponti idrogeno, idrofobici ecc.

I liposomi si comportano da ‘sistemi mascheranti’ in grado di creare pacchetti di farmaco incapsulato che risulta pertanto fisicamente isolato dall’ambiente circostante e di proteggere il principio attivo da eventuali processi di degradazione chimica o enzimatica prima che raggiunga il tessuto bersaglio (Torchilin, V., 2007). Inoltre la manipolazione della loro composizione e della loro struttura, insieme all’ottimizzazione dei metodi di preparazione, permettono di ottenere prodotti con caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche specifiche per scopi terapeutici e formulativi (Drummond, D. C., 1999). Allo stato attuale, i liposomi non sono preclusi a nessuna via di somministrazione in quanto, essendo essi costituiti da fosfolipidi che sono componenti naturali di tutte le membrane cellulari, rappresentano un sistema sicuro dal punto di vista biologico. Inoltre permettono di veicolare molecole lipofile senza dover ricorrere all’uso di tensioattivi, adiuvanti o co-solventi che potrebbero rivelarsi tossici

La prima classe di liposomi studiati sono stati i liposomi unilamellari nudi con dimensione compreso tra 100 e 500 nm

1.1.3.1 Classificazione dei liposomi

Al fine di controllare il comportamento biofarmaceutico dei liposomi e per ottenere vescicole con elevata sito-selettività nei confronti di specifici tessuti è possibile modulare alcune caratteristiche quali dimensione, composizione lipidica, carica superficiale oppure decorarne la superficie con molecole come polimeri naturali o

sintetici, proteine ed anticorpi monoclonali, polisaccaridi ed in generale agenti di *targeting* (Figura 2).

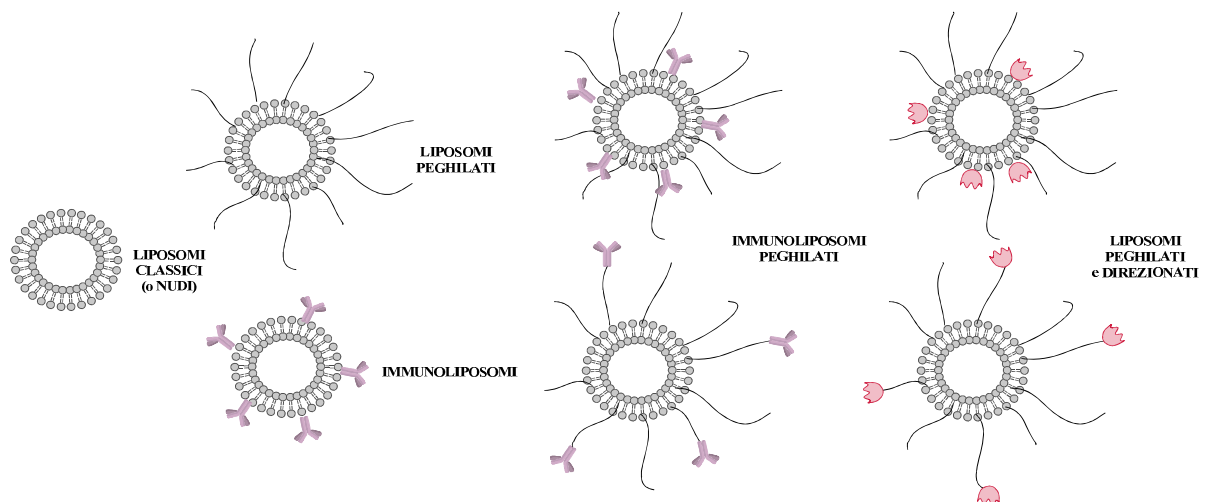


Figura 2: Differenti tipologie di liposomi unilamellari decorati sulla loro superficie con agenti direzionanti o componenti che modulano le loro caratteristiche fisiche e biofarmaceutiche.

Studi eseguiti con alcune formulazioni liposomiali hanno dimostrato come l'emivita plasmatica ed altri parametri farmacocinetici e biofarmaceutici siano strettamente legati alla loro dimensione, composizione e proprietà superficiali. I liposomi con diametro inferiore a 100 nm, costituiti da doppi strati di fosfolipidi e colesterolo, hanno un'emivita significativamente più lunga di liposomi con la stessa composizione lipidica e dimensioni maggiori (Senior, J. et al, 1985). Liposomi con un elevato contenuto di colesterolo e fosfolipidi idrogenati rilasciano il farmaco più lentamente rispetto ad una formulazione ricca di fosfolipidi insaturi a causa di una ridotta permeabilità del doppio strato. Inoltre liposomi neutri hanno in genere emivita più lunga e permangono in circolo rispetto a quelli con carica elettrostatica negativa, ma vengono rimossi dal circolo soprattutto a livello della milza e del fegato per azione dei

macrofagi del sistema reticoloendoteliale (RES) soprattutto perché tendono a formare aggregati ((Drummond, D. C. et al, 1999).

La dimensione dei liposomi è importante per quanto riguarda la loro biodistribuzione, sia che si tratti di liposomi classici sia di liposomi ricoperti con PEG, detti anche liposomi PEGilati (Gabizon, A., 2001). Il polietilen glicole (PEG) derivatizzato ad una estremità con un fosfolipide è in grado di ancorarsi attraverso il lipide al *doppio strato* formando una corona idrofilia esterna, che limita l'opsonizzazione e quindi il rapido *uptake* da parte del RES. Rispetto ai liposomi normali, i liposomi PEGilati somministrati per via endovenosa in topi e ratti presentano un'emivita plasmatica fino a circa 20 ore maggiore e nell'uomo circa 45 ore maggiore (Allen, T. M., 1998). L'aumento dell'emivita plasmatica è particolarmente elevata per liposomi di dimensioni comprese tra 70 e 200 nm con un alto grado di omogeneità (Liu, D. et al, 1992). I liposomi PEGilati con dimensioni di 300-400 nm non si accumulano nel fegato, ma tendono a concentrarsi nel midollo e in alcune aree della milza (Litzinger, D. C et al, 1994).

Liposomi funzionalizzati con agenti direzionanti o modificanti le proprietà chimico-fisiche e biofarmaceutiche sulla superficie sono stati preparati per la veicolazione di farmaci al sito d'azione. Sono note due metodiche principali di ancoraggio di questi agenti al liposoma, una che prevede il legame covalente tra agente direzionante e fosfolipide, in genere attraverso uno *spacer* polimerico, ed il secondo che prevede l'incorporamento fisico all'interno del doppio strato fosfolipidico della parte idrofobica dell'agente modificante la superficie (Park, Y. S. 2002).

Per quanto riguarda i liposomi sensibili alle condizioni micro-ambientali fisiopatologiche tipiche dei tessuti tumorali o infiammati sono di particolare interesse i

liposomi pH-sensibili e quelli termosensibili (Mills, J. K., Smallbone, K. Et al, 2005). Nel caso dei liposomi termosensibili, un'induzione dell'aumento della temperatura può essere perseguito a livello loco-regionale anche grazie a stimoli esterni.

1.1.3.2 Interazione dei liposomi con target biologici

Il rilascio di farmaci caricati in liposomi nelle cellule avviene in seguito all'interazione con la superficie cellulare (Simoes, S., et al 2001).

Sono state studiate quattro tipologie d'interazione tra liposomi e cellule che vengono schematizzate e riportate nella Figura 3:

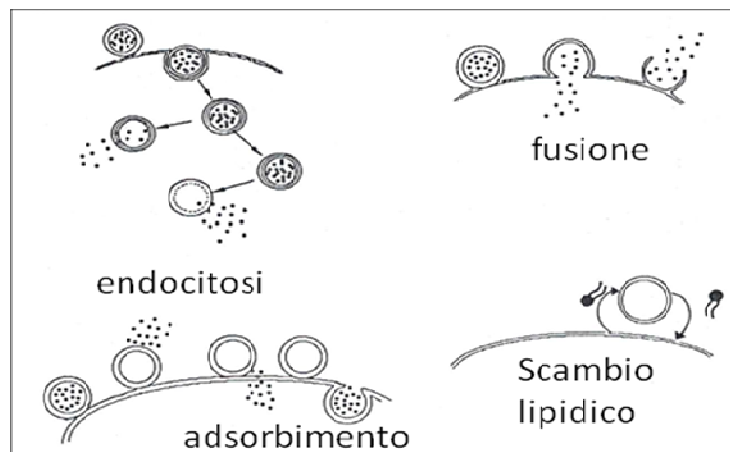


Figura 3: Meccanismi secondo cui i liposomi possono interagire con cellule.

- Scambio e trasferimento di lipidi tra il *carrier* liposomiale e la membrana citoplasmatica. Questo meccanismo non garantisce un efficace trasferimento del farmaco dal liposoma al comparto citosolico.
- Adsorbimento del liposoma sulla superficie della membrana citoplasmatica, senza fusione del *bilayer* del *carrier* e quello cellulare. Tale interazione può modificare

la permeabilità delle cellule e del liposoma favorendo una serie di eventi quale il rilascio di farmaco nell'ambiente extracellulare o il trasferimento all'interno della membrana.

- Fusione del liposoma con la membrana citoplasmatica con il conseguente versamento del farmaco in esso contenuto nel citosol.
- Fagocitosi del liposoma ad opera di un processo attivo da parte della cellula con migrazione del *carrier* in strutture subcellulari (endosomi e lisosomi). All'interno dei lisosomi l'elevata acidità in genere promuove la dissociazione dei lipidi liposomiali con conseguente rilascio del farmaco contenuto.

1.1.3.3 Principali applicazioni terapeutiche dei liposomi

Le peculiarità dei sistemi liposomiali fin qui descritte consentono numerose applicazioni terapeutiche alcune delle quali già in uso clinico (tabella I).

Nome prodotto	Titolare AIC	Principio Attivo	Indicazioni Terapeutiche	Vie di somministrazione
Abelcet®	Janssen-Cilag SpA	amfotericina B	antifungino	Infusione endovenosa
AmBisome®	Gileas Sciences s.r.l.	amfotericina B	antifungino	Infusione endovenosa, orale
Pevaryl® lipogel	Janssen-Cilag SpA	Econazolo	antifungino	Topica
Epaxal Berna®	Istituto Sieroterapico Berna	Vaccino	Epatite A	Infusione intramuscolo.
Dauxonome®	Gilead Science srl	Daunorubicina	sarcoma di Kaposi	Infusione endovenosa
Caelyx®	SP Europe	Doxorubicina	Sarcoma di Kaposi	Infusione endovenosa
Myocet®	Cephalon Europe	Doxorubicina	Tumore polmonare	Infusione endovenosa

Tabella 1. Formulazioni liposomiali di uso clinico.

L'impiego di formulazioni liposomiali ha permesso di veicolare doxorubicina e daunorubicina, antracicline glicosidiche molto efficaci come antineoplastici ma con numerosi effetti tossici a carico del cuore. La cardiotoxicità è fortemente ridotta nel caso di formulazioni liposomiali consentendo così di aumentare l'indice terapeutico del principio attivo e promuovere l'accumulo a livello del tessuto tumorale. Il primo prodotto commerciale a ricevere l'approvazione dalle agenzie regolatorie è stato il Doxil®, formulazione di doxorubicina con emivita plasmatica otto volte superiore a quella del farmaco in soluzione fisiologica. L'allungamento dell'emivita plasmatica di doxorubicina è dovuta non solo all'incapsulazione in nanosistemi liposomiali rigidi, ma anche al fatto che i liposomi sono modificati superficialmente con PEG che li rende *stealth*, invisibili al RES e quindi in grado di circolare a lungo nel torrente sanguigno.

Grande successo ha riscosso l'utilizzo di liposomi nella terapia antifungina. L'amfotericina B è un farmaco d'elezione nella terapia antifungina. Le formulazioni a base di emulsioni causano però gravi effetti nefrotossici, tromboflebite ed anemia. Questi effetti collaterali si riducono drasticamente impiegando Ambisome®, la formulazione liposomiale dello stesso principio attivo, pur conservando la medesima attività.

I liposomi sono studiati ed utilizzati anche per la veicolazione di antigeni virali. Le formulazioni prendono il nome di virosomi e sono studiate per ottenere vaccini più sicuri. Le eccellenti caratteristiche di queste formulazioni come adiuvanti sono confermate dall'esistenza di due vaccini registrati contro l'epatite A (Epaxal®, Berna Biotech, Berna, Switzerland) e contro l'influenza (Inflexal V® , Berna Biotech, Berna Switzerland).

1.1.4 Biomateriali impiegati nei sistemi di drug delivery

La selezione e la progettazione di un polimero da impiegare nei sistemi di *drug delivery* (DDS), richiedono una conoscenza specifica delle proprietà chimiche, biologiche e meccaniche del materiale.

Il carattere idrofilico/lipofilico il peso molecolare e l'energia libera, del polimero e le caratteristiche superficiali dei sistemi colloidali polimerici determinano la biocompatibilità con tessuti e sangue oltre ad influenzarne la durata di permanenza in circolo, la distribuzione in organi e tessuti e la degradabilità (Angelova N. et al, 1999). .

E' stata sintetizzata una vasta gamma di polimeri in grado di fornire ottimi sistemi per il rilascio controllato di macromolecole, proteine ed enzimi. Alcuni tra i materiali approvati dall'FDA e correntemente impiegati a tale scopo in biofarmaceutica sono riportati in Tabella 1. In particolare, è molto diffuso l'utilizzo di PLA e PGA la cui applicazione iniziale era come materiali da sutura riassorbibili. La loro ottima biocompatibilità è garantita dal fatto che sono costituiti da monomeri biologicamente presenti nell'organismo e che possono essere escreti secondo le vie metaboliche esistenti (Ikada Y 2000). I destrani attivamente sono stati studiati per il rilascio di agenti terapeutici e di *imaging* soprattutto in formulazioni iniettabili e nei sistemi di delivery al colon (Mehavar R., 2000). Polietilene ossido (PEO o PEG) e polioossipropilene (POP) sono una delle classi di copolimeri più interessanti per la sintesi di nanoparticelle. In particolare, copolimeri PEG-PLA possono auto assemblarsi a formare strutture supramolecolari e per questo sono ampiamente studiati per il delivery di farmaci antitumorali, proteine e DNA plasmidico (Kwon G.S. et al., 1999).

Polymers	Abbreviations	Repeating Unit Structure
Hydrophilic		
Poly(ethylene glycol)	PEG, PEO	
Poly(N-vinyl pyrrolidone)	PVP	
Poly(N-isopropyl acrylamide)	pNIPAM, NIPAM	
Hydrophobic		
<i>Polyethers</i>		
Poly(propylene oxide)	PPO	
<i>Polyesters</i>		
Poly(L-lactide), Poly(D, L-lactide)	PLA, PDLLA	
Poly(lactide-co-glycolide)	PLGA	
Poly(ε-caprolactone)	PCL	
Poly(β-amino ester)		
<i>Polyamides</i>		
Poly(L-histidine)	pHis	
Poly(L-aspartic acid) derivatives	pAsp	
Poly(L-glutamic acid) derivatives	pGlu	

Tabella2: principali polimeri utilizzati per la costruzione di sistemi di drug delivery.

I materiali citati in Tabella 2 trovano applicazione anche per la preparazione di sistemi micellari per impieghi farmaceutici in quanto permettono l'ottenimento di strutture estremamente flessibili ed offrono un'ampia possibilità di manipolazione chimica e di applicazioni biologiche.

Polimeri in grado di formare micelle sono generalmente costituiti da una catena di PEG, che rappresenta la frazione idrofilica, coniugata a molecole lipidiche biocompatibili o ad un'altra catena polimerica idrofobica come poliisopropilene nel caso dei Pluronic o

Polossameri, una catena polipeptidica idrofobica (poliLeu, poliPro), una catena polivinilica, poliacrilica (poliNIPMA), o una catena poliesterea (PLA, PGA, PLGA).

Le micelle possono essere ottenute anche utilizzando come porzione idrofobica materiali non polimerici coniugati a PEG o altri polimeri aventi carattere idrofilico. Alcuni esempi di catene idrofobiche non polimeriche sono rappresentati dai fosfolipidi (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), mono, di, e tri-gliceridi a media o lunga catena (acido caprilico, oleico e linoleico) e derivati PEGilati dell'olio di ricino (Cremofor).

1.2 La neoplasia e la terapia antitumorale

1.2.1 Fisiopatologia del tumore

Il *tumore* o *neoplasia* si manifesta come proliferazione incontrollata di un tessuto a seguito di mutazioni a carico di sequenze genomiche che controllano la crescita cellulare (geni che codificano per fattori di crescita o relativi recettori, per trasduttori di segnali intracellulari e per fattori di trascrizione nucleare).

Le alterazioni biochimiche possono conferire alle cellule la capacità di degradare i costituenti della lamina basale quali collagene, proteoglicani e glicosaminoglicani, di eludere il controllo del sistema immunitario e di ignorare i segnali di contatto con cellule tissutali limitrofe. In questi casi si realizzano le caratteristiche tipiche di *invasività* nei tessuti circostanti e *diffusione* lontano dal sito di origine, tipiche della malignità del tumore. All'interno del tessuto tumorale inoltre si può riconoscere una sottopopolazione di cellule note come "staminali". Esse sono caratterizzate dalla

capacità di dare origine a ripetuti cicli proliferativi e migrare in altri organi dando così luogo alla formazione di metastasi.

La progressione neoplastica è accompagnata da anomalie di varie vie metaboliche e dall'instaurarsi di tipi subcellulari con caratteristiche morfologiche e fenotipiche peculiari.

In assenza di adeguati trattamenti, che consentano l'eradicazione del tumore, la presenza di una neoplasia rappresenta un fattore di malattia che può condurre a morte.

La maggior parte dei tumori solidi possiede una fisiopatologia caratteristica osserva diversa da quella dei tessuti e organi sani. Si nota infatti un'estesa angiogenesi che si manifesta in ipervascolarizzazione, difettosa architettura vascolare, alterazione del drenaggio linfatico e un considerevole aumento della produzione di una serie di mediatori della permeabilità. Il fenomeno, noto come effetto-EPR (enhanced permeability and retention) è stato osservato nelle varie forme di tumore solido (Maeda H. et al, 2000).

1.2.1.1 Angiogenesi tumorale ed effetto EPR

L'angiogenesi è un meccanismo fisiologico di rimodellamento attraverso il quale si ha crescita di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi pre-esistenti. Normalmente si instaura durante la cicatrizzazione e la riparazione di tessuti lesi, durante la formazione della placenta e la rigenerazione tissutale ma rappresenta anche uno step fondamentale nella transizione dei tumori dallo stadio primario a quello maligno.

Nelle prime fasi della crescita, il tumore con un diametro inferiore ai 2 millimetri (Jones A., 1998), utilizza sia per il rifornimento di ossigeno e sostanze nutritive, sia per

l'eliminazione di cataboliti, il letto di capillari proprio del tessuto di origine. Tale condizione è “*dormiente*” in quanto non vi è crescita volumetrica e può permanere a lungo a seconda del tipo di tumore e comunque fino al momento in cui uno stato di ipossia non crea la necessità di una propria vascolarizzazione. Per obietti vola loro evoluzione i tumori vanno incontro a un processo detto “*switch angiogenico*” con liberazione di mediatori (produzione di segnali che stimolano l'angiogenesi) che deriva dallo squilibrio tra i fattori pro-angiogenici e quelli anti-angiogenici. La vascolarizzazione tumorale che ne deriva è differente da quella dei tessuti sani e presenta anomalie strutturali e funzionali come si può notare dalla schematizzazione riportata in Figura 4.

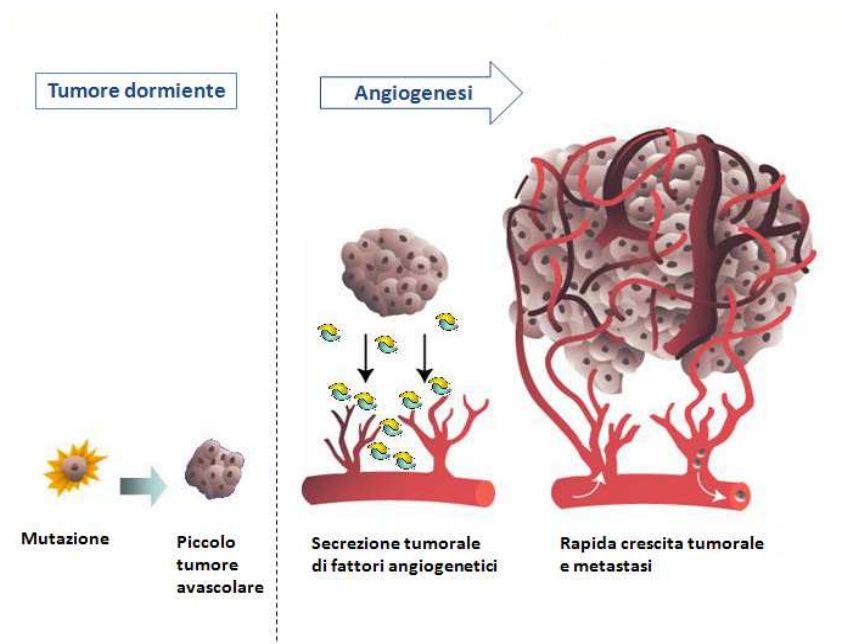


Figura 4 : rappresentazione schematica dell'evoluzione angiogenetica nel tumore

Un ruolo importante nell'angiogenesi è svolto dal fattore di crescita endoteliale, VEGF, che è responsabile della differenziazione della struttura dei vasi endoteliali. Nei tumori

il VEGF promuove una rapida e casuale crescita dei vasi che però risultano incompleti, con fenestrazioni piuttosto ampie tra le cellule endoteliali. Queste caratteristiche strutturali permettono una estesa extravasazione. Il processo di rimodellamento e la permeabilità vascolare è controllato da una serie di mediatori tra cui la bradichinina (Matsumura, Y. 1991), NO (Wu, J. et al, 1998), VPF, VEGF ed altre citochine (Senger, D.R 1983, Leung D.W. 1989), le prostaglandine con coinvolgimento delle cicloossigenasi (Wu, J. 1998) e le metalloproteasi (Wu, J. 2004). Le dimensioni delle fenestrazioni tra le cellule endoteliali del tumore variano in un range compreso tra 100 e 780 nm a seconda del tipo di tumore (Hobbs, S.K. et al, 1998). Per confronto, le *tight junctions* presenti nei vasi normali hanno tipicamente dimensioni tra i 5 e i 10 nm. Questa abbondante ed anomala vascolarizzazione, unita ad un ridotto drenaggio linfatico dagli spazi interstiziali (Matsumura Y., 1986), consentono l'accumulo nei tessuti tumorali di macromolecole secondo l'effetto EPR (enhanced permeability retention effect) di cui viene riportata l'immagine in Figura 5. Viene inoltre favorita la ritenzione, soprattutto di farmaci, per un periodo di tempo relativamente superiore ai tessuti sani (Iwai K, Maeda H., 1984). Secondo l'effetto EPR, macromolecole di diversa natura extravasano in prevalenza nei tessuti tumorali piuttosto che nei tessuti normali o negli organi. La richiesta minima affinché avvenga tale accumulo è un peso molecolare apparente superiore a 50 kDa (Maeda H. 1986).

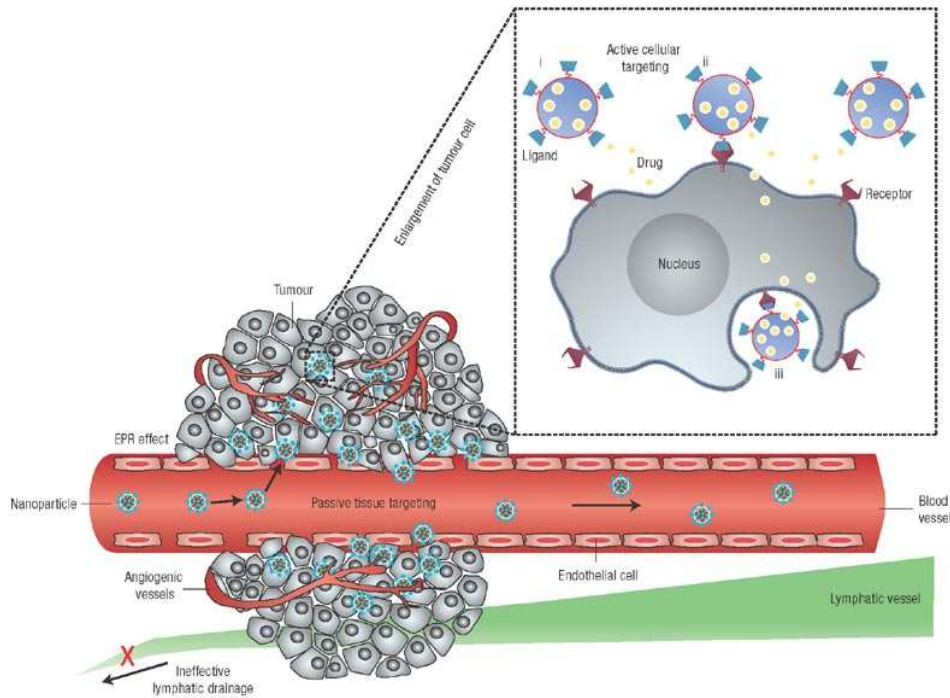


Figura 5: Effetto EPR. La figura mostra come le fenestrazioni tra le cellule endoteliali del vaso sanguigno abbiano dimensioni tali da permettere a sistemi macromolecolari e nanoparticellari di accumulare mediante targeting passivo a livello della massa tumorale. Tali nanosistemi possono essere assemblati in modo da avere componenti direzionanti o responsive che consentiranno la penetrazione cellulare

1.2.1.2 Ipermetabolismo e acidosi tumorale

Una delle differenze peculiari tra i tumori solidi e i tessuti sani è l'ambiente nutrizionale e metabolico. Come già accennato, la vascolarizzazione funzionale del tumore è spesso inadeguata per soddisfare i bisogni nutrizionali della massa tumorale in crescita. Ciò provoca uno stato di ipossia e di carenza di principi nutritivi che stimola le cellule del tumore a sfruttare prevalentemente la via glicolitica per la produzione di energia. La glicolisi è quel processo metabolico mediante il quale, in condizioni di anaerobiosi non stretta, una molecola di glucosio viene scissa in due molecole di piruvato al fine di generare molecole a più alta energia come ATP e NADH. La glicolisi

è il mezzo per ottenere energia più sfruttato in natura, soprattutto per la sua anaerobiosità.

Warburg per primo misurò la produzione di acido lattico nei tessuti rilevandone una aumentata produzione nel tessuto tumorale. (Warburg O., 1923). Sulla base di questa osservazione, avanzò l'ipotesi che le cellule ricorressero alla glicolisi come fonte metabolica per sopperire ad un sistema respiratorio alterato.

In realtà, diversi studi hanno dimostrato che le cellule tumorali sono in grado di utilizzare la respirazione come fonte di energia (McKeehan, W.L., 1982) per garantirsi una crescita incontrollata (Pouyssegur J.A., 1981) che necessita indubbiamente di un consumo maggiore di glucosio. Studi di tomografia ad emissione di positroni hanno infatti evidenziato una correlazione diretta tra crescita tumorale e consumo di glucosio (Haberkmorn U. et al, 1991).

Va detto comunque che alcuni tipi di cellule, pur avendo metabolismo aerobio, utilizzano comunque la glicolisi per produrre la maggior parte dell'ATP necessario. Questo è dovuto all'instaurarsi di regioni di ipossia nelle masse tumorali che determinano la necessità di attivare la via glicolitica per far fronte alle esigenze del loro metabolismo.

Grazie all'avvento della spettroscopia di risonanza del ^{31}P (MRS), è stato possibile determinare sia il pH intracellulare (pHi) che quello extracellulare (pHe) in modo accurato e non invasivo.

Le osservazioni fatte comparando il tessuto tumorale con quello sano hanno portato a determinare per entrambi un valore di pHi pari a 7.2. Il pHe è risultato essere 7.4 nei tessuti normali mentre è compreso tra 6.8 e 7.2 nel tessuto neoplastico. Il gradiente di pH nel tumore ha valore inferiore di 0,2 - 0,6 unità di pH rispetto al dato fisiologico di

tessuti sani (Adams D.J., 2005).

Seppur piccola, questa differenza può condizionare altri eventi che possono essere sfruttati terapeuticamente non ultimo, ad esempio, la permeabilità di membrana di farmaci la cui carica è determinata da pH del microambiente.

1.2.1.3 Ipossia

La maggior parte dei tumori presenta zone di ipossia acuta e/o cronica conseguente all'anomala vascolarizzazione che in genere non garantisce un adeguato apporto di sangue e ossigeno (Brown J., et al, 2004).

L'ipossia tumorale è associata ad un aumento della malignità della neoplasia in quanto non permette a farmaci antitumorali di svolgere la loro funzione farmacologica. Infatti, molti trattamenti chemioterapici basano il loro meccanismo d'azione su un ciclo cellulare in progressione, che viene invece represso dalla mancanza di ossigenazione (Helmlinger, G., 1997).

Esiste una stretta correlazione tra ipossia e acidosi tumorale. Un ruolo fondamentale è svolto dalla proteina HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), i cui livelli sono regolati dalla presenza di ossigeno (Semenza G. L. 2003). HIF-1 è un fattore trascrizionale in grado di regolare più di 60 geni alcuni dei quali codificano per enzimi glicolitici e per trasportatori del glucosio (Stubbs M. et al, 2003). Permette inoltre di regolare anche fattori angiogenici, in particolare il VEGF. Pertanto la carenza di ossigeno scatena la produzione di questo singolo fattore di trascrizione che a cascata può regolare l'intera conduzione al caratteristico fenotipo della massa tumorale.

1.2.1.4 Equilibrio redox

Rispetto alle loro normali controparti, molti tipi di cellule tumorali presentano alti livelli di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), molecole altamente reattive.

Esistono due tipi di ROS: a) il tipo radicalico che ha uno o più elettroni spaiati nell'orbitale molecolare esterno dell'ossigeno e b) il tipo non-radicalico che non possiede elettroni spaiati ma, per la sua elevata reattività, può convertirsi in radicale. I ROS sono comunemente presenti nelle cellule poiché sono essenziali per le funzioni biologiche. Essi regolano molti percorsi biochimici di trasduzione di segnali reagendo direttamente con proteine (o modificandone la struttura) e geni.

Nelle neoplasie si riscontrano in genere elevati livelli di molecole danneggiate dai componenti ossidanti prodotti dal metabolismo del tumore come basi azotate ossidate e lipidi per ossidati (Halliwell, B., 2007). I sistemi scavenger e glutazione perossidasi in genere non sono adeguati a tenere sotto controllo tali eventi.

Sebbene le vie biochimiche che regolano lo stress ossidativo delle cellule tumorali non siano ancora state chiarite, in letteratura sono descritti vari meccanismi in base ai quali questo disequilibrio può instaurarsi. Attivazione di oncogeni, metabolismo aberrante, disfunzioni mitocondriali e perdita della funzionalità del gene p53 sono fattori intrinseci che incrementano la produzione di ROS nei tessuti neoplastici. La proteina p53 ha un ruolo cruciale nel rimuovere il danno ossidativo a livello di DNA nucleare. Agisce infatti come fattore di trascrizione per regolare l'equilibrio di espressione tra geni pro-ossidanti e antiossidanti.

Soprattutto nello stadio avanzato della malattia, le cellule tumorali mostrano una forte instabilità genetica. L'aumento dei livelli di ROS è determinato in parte da un

circolo vizioso che induce mutazioni genetiche (soprattutto a carico del genoma mitocondriale) che portano a malfunzionamenti metabolici e conseguente generazione di specie radicaliche.

1.2.2 Modalità di intervento terapeutico nei tumori

L'estensione ed il grado di progressione della malattia vengono descritte, per la maggior parte dei tumori, dal sistema di stadiazione TNM messo a punto dall'*American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. Secondo questo protocollo, una neoplasia viene caratterizzata in base a parametri ben definiti. Il parametro T si riferisce al grado di estensione del tumore primitivo e può assumere i valori da 0 a 4 a seconda della sua grandezza. Il parametro N invece indica lo stato dei linfonodi presenti in prossimità della massa tumorale. Infine, il parametro M indica la presenza di metastasi a distanza. Sulla base della designazione TNM il tumore viene classificato in uno stadio da 0 a IV sulla base del quale viene scelto l'approccio terapeutico da seguire.

In genere, si può affermare che l'asportazione chirurgica della massa tumorale costituisce il trattamento primario dei tumori solidi localizzati, combinato con protocolli radioterapici o chemioterapici per diminuire il rischio di recidive.

La radioterapia è utile in caso di neoplasie localmente avanzate, meglio se affiancata a somministrazione di farmaci radiosensibilizzanti che ne aumentano l'efficacia.

A tutt'oggi la ricerca in ambito farmaceutico per il trattamento di neoplasie è indirizzata allo sviluppo di alcuni approcci terapeutici principali:

- 1) sviluppo di molecole ad attività antiproliferativa a basso peso molecolare ottenute principalmente mediante chimica combinatoriale e screening dell'attività farmacologia di prodotti naturali e semisintetici (Hill B.T. et al, 1996).
- 2) identificazione di nuovi target biologici per la chemioterapia, quali recettori, antigeni, attivatori dell'angiogenesi, mediatori biochimici (Folkman J., 1985, Lundberg A.S. et al, 1999).
- 3) sviluppo della terapia genica e impiego di nucleotidi antisenso (siRNA) (Sandhu J.S 1997).
- 4) sviluppo di sistemi di direccionamento e rilascio di farmaci atti a rendere sito specifica la terapia per il tessuto tumorale.

Farmaci antineoplastici ideali dovrebbero essere quelli capaci di colpire soltanto le cellule neoplastiche, senza danneggiare le cellule dei tessuti sani. Solo pochi farmaci tra quelli attualmente disponibili ottemperano a questo criterio e l'uso clinico di questi farmaci deve essere preceduto da una scrupolosa valutazione del rapporto tra effetti favorevoli e tossicità, al fine di ottenere il migliore indice terapeutico possibile.

1.2.3 Biodisponibilità di farmaci antitumorali

Gli agenti chemioterapici sono tra i farmaci a più basso indice terapeutico. Sono potenzialmente in grado di causare gravi effetti collaterali che da una parte ne limitano l'uso e dall'altra impongono caratterizzazione una accurata valutazione del profilo

farmacocinetico, farmacodinamico e delle eventuali interazioni con altri farmaci per poterli impiegare in modo sicuro.

Uno dei problemi che pregiudicano l'efficacia di un trattamento chemioterapico è proprio quello delle manifestazioni tossiche dei farmaci che, nei casi più gravi, possono portare anche alla morte del paziente. Le alte dosi frequentemente somministrate e la scarsa selettività dei farmaci nei confronti del tessuto tumorale provocano inevitabilmente altissimi livelli di farmaco in quasi tutti gli organi, con conseguenti danni cellulari e tissutali. Gli effetti che si manifestano più frequentemente sono a carico del sistema immunitario e dei tessuti comunemente proliferativi, perdita di funzionalità degli organi in particolare fegato e rene, ulcerazione delle mucose della bocca, fibrosi polmonare, occlusione venosa, danni al miocardio, alopecia, nausea e vomito.

Per limitare questi effetti collaterali si ricorre ad una terapia di sostegno che prevede trasfusione di piastrine, l'uso di antiemetici come gli antagonisti 5-HT₃ e l'impiego di antibiotici a largo spettro.

Oltre agli effetti secondari legati alla tossicità sistemica dei farmaci antitumorali, la loro efficacia è fortemente legata alla loro biodisponibilità. Non è raro infatti che farmaci in fase di studio manifestino una attività farmacodinamica potente ma una attività terapeutica nulla a causa di una inefficiente biodisponibilità.

I principi attivi che hanno limitata biodisponibilità possiedono, in genere, una o più delle seguenti caratteristiche:

- a) elevata lipofilia e conseguente scarsa solubilità nei fluidi fisiologici acquosi;
- b) bassa permeabilità alle barriere o membrane biologiche;
- c) assorbimento regolato da un processo di trasporto facilitato o attivo saturabile;

d) instabilità metabolica enzimatica o idrolitica in particolare per farmaci somministrati per via orale e sensibili all'ambiente gastrico.

Queste difficoltà lasciano prevedere come la biodisponibilità di farmaci antitumorali sia un parametro da valutare attentamente e su cui si può incidere con un'attenta formulazione. Per questo, gli sviluppi moderni della tecnologia farmaceutica hanno permesso di ottenere formulazioni che aumentano la solubilità nei fluidi fisiologici dei farmaci scarsamente solubili e formulazioni a rilascio modificato in grado di modulare la cinetica e/o il sito di rilascio dei principi attivi.

1.2.3.1 Farmaci antitumorali: doxorubicina

Le antracicline sono farmaci antitumorali appartenenti alla categoria degli antibiotici citotossici, ovvero un gruppo di farmaci, isolati per lo più da fonti naturali, la cui azione antineoplastica è dovuta ad interazione con il DNA, con conseguente introduzione di danni all'acido nucleico che innescano l'apoptosi.

I primi derivati antraciclinici ad essere scoperti ed utilizzati in terapia, sono stati la daunorubicina (o daunomicina) e la doxorubicina (o adriamicina) che, nei primi anni '60, vennero isolati da ceppi di *Streptomyces peucetius*. La daunorubicina è attualmente commercializzata con i nomi di Daunoblastina e Daunoxome, mentre la doxorubicina come Adriblastina, Caelyx e Myocet. Dal punto di vista strutturale, gli antibiotici antraciclinici sono caratterizzati da una porzione tetraciclica planare, legata glicosidicamente ad un amminozucchero (daunosamina). Le strutture molecolari della daunorubicina e della doxorubicina differiscono solamente per uno dei sostituenti terminali. Seppure piccola, tale differenza strutturale ha importanti conseguenze sullo

spettro di attività dei due antibiotici citotossici. La doxorubicina, infatti, ha applicazioni cliniche di rilievo soprattutto nei tumori solidi (carcinoma mammario, dell'endometrio, delle ovaie, dei testicoli, della tiroide, dei polmoni), mentre la principale indicazione clinica della daunorubicina è la leucemia acuta. Doxorubicina è la denominazione comune internazionale per (8S, 10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxohexopyranosyl)oxy]-8-glycolyl-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-5,12-naphthacenedione hydrochloride. Il farmaco agisce nella fase S del ciclo cellulare attraverso una molteplicità di meccanismi: si intercala tra le paia di basi di DNA adiacenti alterando la funzione della topoisomerasi II, induce la formazione di radicali liberi, provoca la chelazione di ioni metallici con la formazione di radicali idrossilici. Doxorubicina incapsulata in liposomi *stealth*[®] *long circulating* è correntemente utilizzata in terapia come DOXIL[®],

L'incapsulazione in liposomi della doxorubicina rappresenta un tentativo di preservarne l'attività antitumorale, ma di diminuirne significativamente l'azione cardiotossica che ne limita la dose cumulativa. In particolare il gruppo amminico primario, combinato con le caratteristiche anfipatiche del farmaco, lo rendono un buon candidato per il caricamento remoto in liposomi preformati.

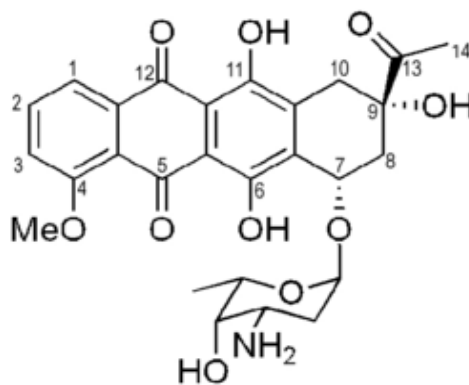


Figura 6: struttura chimica di doxorubicina HCl

1.2.3.2 Metodo di caricamento di doxorubicina in liposomi attraverso gradiente di ioni ammonio

Sono state sviluppate diverse metodiche per ottenere un caricamento efficiente di farmaci all'interno di strutture liposomiali. Il metodo più semplice è l'intrappolamento passivo di farmaci idrosolubili nel film idrolipidico al momento della reidratazione in ambiente acquoso. In questo caso, l'efficienza di caricamento è bassa poiché è strettamente dipendente dal volume vescicolare interno nonché dalla concentrazione di lipidi utilizzati. La selezione del metodo di caricamento ottimale può essere basata su un rationale scientifico. Le diverse molecole attive possono essere classificate in tre gruppi basandosi sul coefficiente di ripartizione olio/acqua (K_p). REF

Il primo gruppo include agenti idrofili con un K_p molto basso. Il secondo gruppo include invece molecole anfipatiche con un K_p variabile controllato dal pH e dalla forza ionica del medium. Un esempio di questo gruppo sono le antracicline. Infine il terzo gruppo include agenti idrofobici aventi K_p alto, che generalmente associano al bilayer del liposoma, anche se la loro efficienza di incapsulazione è piuttosto bassa. Le molecole appartenenti al gruppo I non interagiscono con il bilayer e la loro incapsulazione è dipendente da, e principalmente limitata, al volume del core acquoso interno. Farmaci appartenenti al gruppo II hanno migliori probabilità di essere caricati alle dosi necessarie per la terapia in vivo. Alcune basi deboli anfipatiche del gruppo II possono diffondere attraverso il bilayer come specie non protonate, le quali possono venire in seguito intrappolate nella fase acquosa intraliposomiale grazie al gradiente protonico che le sposta al gruppo I. Il farmaco non può quindi attraversare il bilayer e viene accumulato nel core acquoso interno. Un metodo semplice ed economico

per ottenere un'elevata efficienza di caricamento di molecole idrofile attraverso gradiente transmembrana consiste nel creare un gradiente di ioni ammonio (NH_4^+). Il sistema può in seguito essere manipolato attraverso diluizione, rimozione o scambio degli ioni ammonio presenti nel tampone esterno al fine di ottenere un caricamento più o meno elevato. Questo metodo può essere applicato a diverse preparazioni liposomiali ottenibili tramite le consuete tecniche di preparazione. Per ogni molecola di NH_3 che abbandona il liposoma, un protone viene lasciato al suo interno. Viene così ad instaurarsi un gradiente di pH nel quale la fase acquosa interna è più acida rispetto il tampone esterno. La forza di questo gradiente è determinata dal rapporto $[\text{NH}_4^+]_{\text{esterno}}/[\text{NH}_4^+]_{\text{interno}}$. Basi deboli anfipatiche dovrebbero essere in grado di permeare la membrana liposomiale, normalmente non permeabile, se il pH del compartimento intraliposomiale è più acido rispetto l'ambiente esterno. Questo sistema tenderà naturalmente ad equilibrarsi fino a raggiungere lo stesso pH ad entrambi i lati della membrana. I liposomi possono quindi essere formati in un tampone adeguato come un sale a base d'ammonio (ad esempio ammonio solfato o fosfato) il cui catione ammonio dissocerà in ammoniaca e un protone. L'ammoniaca (neutra) è permeabile alla membrana liposomiale e può essere scambiato con un farmaco anfipatico deprotonato che penetrerà all'interno del liposoma dove verrà protonato dall' H^+ precedentemente liberato dallo ione ammonio. In questo modo il farmaco si troverà all'interno del core acquoso nella sua forma protonata e non sarà in grado di permearvi all'esterno fino al momento in cui non verrà ad instaurarsi un gradiente opposto. Per ottenere il gradiente d'ammonio transmembrana dall'interno del liposoma verso l'esterno sarà sufficiente rimuovere l'ammonio esterno per diluizione oppure per scambio ionico con un altro catione (Barenholz et al, 1994).

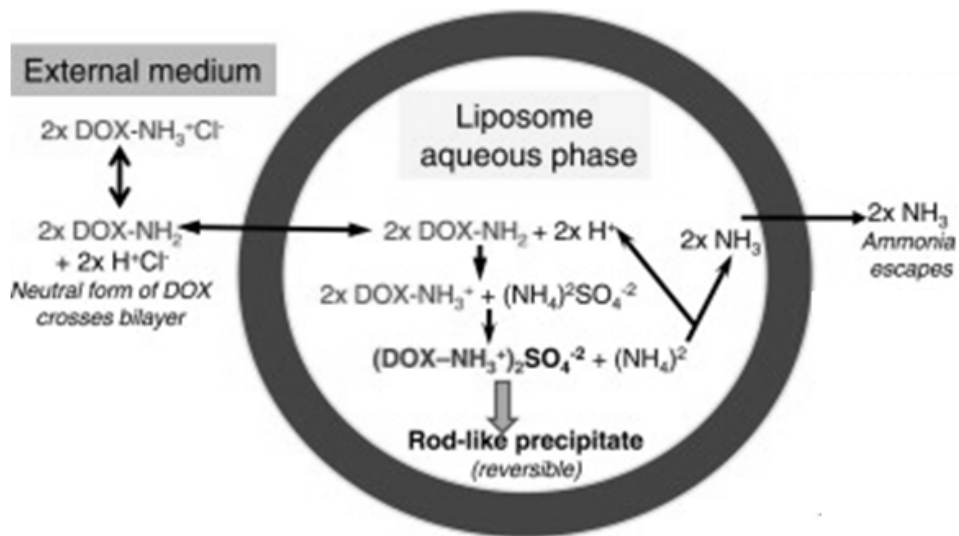


Figura 7: schema di caricamento di doxorubicina secondo gradiente ammonio solfato

1.3 Descrizione generale di materiali e metodiche impiegate nel progetto di tesi per la preparazione di liposomi pH sensibili a base di sulfadimetossina

1.3.1 Polietilenglicole (PEG)

Il polietilenglicole è un polimero sintetico che si ottiene per polimerizzazione anionica dell'ossido di etilene (Figura 8).

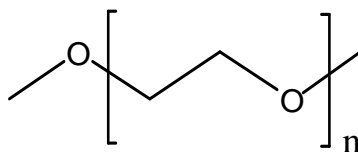


Figura 8 : Struttura chimica del polietilenglicole (PEG)

L'impiego dell'anione idrossilico quale iniziatore (-OH) genera un PEG-diolo, HO-[CH₂-CH₂-O]_n-H, mentre l'uso di un iniziatore metossilico (CH₃O-) consente la formazione di derivati mono-metossiPEG (mPEG), CH₃O-[CH₂-CH₂-O]_n-H. Iniziatori multidentati e polivalenti vengono invece impiegati per ottenere strutture ramificate multivalenti.

In condizioni di reazione controllate è possibile ottenere polimeri con indici di polidispersività (PDI) di 1.01 per i PEG a basso peso molecolare (<5 kDa) e di 1.1 per quelli ad elevato peso molecolare (>50 kDa). Pertanto, rispetto ad altri polimeri, i PEG utilizzati nella modifica di molecole proteiche e di colloidali sono dimensionalmente omogenei e con struttura ben definita, proprietà che sono richieste per lo sviluppo di prodotti farmaceutici.

La ripetizione di monomeri ossietilenici garantisce al PEG una elevata solubilità in solventi organici quali diclorometano o cloroformio, che in solventi acquosi. In acqua il PEG coordina 2-3 molecole di solvente per ciascun monomero ossietilenico. Per questo motivo il suo volume idrodinamico risulta essere almeno tre volte superiore a quello calcolato per il polimero non idratato. La natura anfifilica del PEG lo rende solubile anche in molti solventi organici polari e, per bassi pesi molecolari, anche non-polari a tutto vantaggio dei processi di manipolazione e di purificazione.

Il PEG è un polimero neutro, biocompatibile, non biodegradabile, atossico, non immunogenico. Solo lo 0.2% della popolazione sviluppa anticorpi anti-PEG, che comunque non portano ad effetti collaterali tali da impedirne l'impiego farmaceutico.

Sebbene non sia biodegradabile, esso può essere eliminato per via renale ed epatica senza subire sostanziali modifiche strutturali ma la cinetica di eliminazione dipende dal

suo peso molecolare che condiziona il volume idrodinamico. In genere, il PEG fino ad un peso molecolare di 20000-Da può essere eliminato facilmente per via renale.

Per queste caratteristiche e per la bassa tossicità il PEG è stato approvato dall'European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA) per l'impiego nella preparazione di sistemi farmaceutici da somministrare per via parenterale come liposomi *stealth*, nano- e microsferi, dendrimeri, idrogeli, bioconiugati di peptidi, proteine e farmaci a basso peso molecolare (Bhadra D., 2002).

Il PEG utilizzato in questo progetto di tesi è di tipo omo-bifunzionale. Si tratta di PEG diammino con peso molecolare di 3400kDa ($\text{NH}_2\text{-PEG}_{3400 \text{ kDa}}\text{-NH}_2$) la cui struttura è riportata in Figura 9.

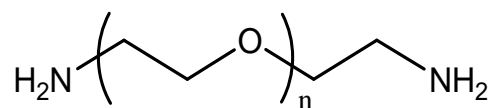


Figura 9: struttura chimica di $\text{NH}_2\text{-PEG}_{3400 \text{ kDa}}\text{-NH}_2$

Il PEG diammino è stato scelto poiché, oltre a costituire la parte idrofilica degli unimeri che formeranno le micelle in fase di studio, ha due gruppi amminici che possono essere coniugati a diversi gruppi chimici seguendo strategie sintetiche e condizioni di reazione adeguate. Ad uno dei due gruppi amminici sarà infatti legata una catena alchilica che comporrà il core idrofobico delle micelle mentre l'altro gruppo amminico verrà impiegato per legare un iniziatore su cui polimerizzare un'antenna "chimica" acido sensibile.

1.3.2 Sulfadimetossina

La sulfadimetossina è un derivato sulfonamidico la cui struttura di base è analoga a quella dell'acido para-aminobenzoico (PABA). In clinica, i sulfamidici rappresentano una categoria di farmaci antimicrobici che, in base all'analogia strutturale con il PABA, bloccano la sintesi dell'acido diidrofolicco nei procarioti attraverso l'inibizione dell'enzima diidropteroato sintetasi. L'acido diidrofolicco è fondamentale per le reazioni di metilazione di omocisteina in metionina (ciclo del metile). Lo spettro d'azione antimicrobica dei sulfamidici è molto ampio e copre sia ceppi batterici di tipo Gram positivo che Gram negativo.

Sulfamidici con diverse caratteristiche fisiche, chimiche, farmacologiche e antibatteriche sono prodotti per modifica chimica al gruppo sulfonamidico ($-\text{SO}_2\text{-NH-R}$) o al gruppo aminico ($-\text{NH}_2$) del nucleo sulfanilamidico.

Le sulfonamidi sono molecole debolmente acide e presentano valori di pKa che dipendono dal gruppo sostituito legato all' N^4 . Esistono infatti più di 15000 derivati ognuno dei quali presenta diversa pK_a in un range che va da 3 a 11.

Generalmente i derivati sulfamidici sono solubili in ambiente basico; in base al valore di pKa, al di sotto di un certo pH, ogni derivato si trova spostato verso la forma deionizzata che presenta un carattere più idrofobico rispetto la corrispondente forma ionizzata anionica (Figura 10).

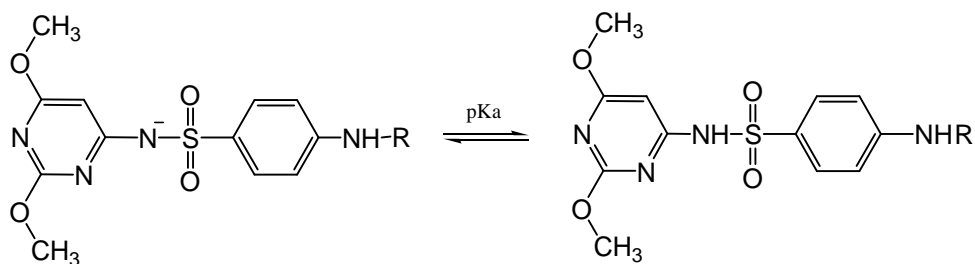


Figura 10: equilibrio di dissociazione acido-base di sulfadimetossina

Polimeri pH-sensibili possono essere ottenuti per introduzione lungo il loro backbone di gruppi sulfonamidici (ma anche gruppi carbossilici, gruppi solfato e sulfonato e ammine primarie e terziarie). La sensibilità a variazioni di pH di questi polimeri si manifesta attraverso cambiamenti nella struttura tridimensionale collegati alle proprietà dielettriche e alle interazioni tra le catene. Si verifica infatti una riduzione reversibile di solubilità del polimero modificato e conseguente precipitazione nel range di pH relativo alla pKa del residuo sulfamidico legato. Questo accade perché in ambiente acido prevale la forma non ionizzata delle unità sulfonamidiche e questo determina un netto cambiamento nel rapporto idrofilicità/idrofobicità lungo tutta la catena polimerica.

In questo lavoro di tesi, la sulfadimetossina è stata utilizzata come unità di base per la sintesi di un derivato metacrilico, la sulfadimetossina metacrilato, utilizzato per modificare superficialmente micelle a base di PEG. Il gruppo metacrilico introdotto nella molecola della sulfadimetossina è stato inserito per avere una porzione della molecola che partecipi a polimerizzazione radicalica: il doppio legame infatti reagisce velocemente con una specie radicalica creando a sua volta un altro radicale che consente la propagazione della reazione e l'elongazione del backbone polimerico (Figura 11). Tale derivato, polimerizzato, svolgerà azione di sensore di pH impartendo alle micelle nuove proprietà responsive. La sulfadimetossina è un composto insolubile in ambiente

acquoso acido mentre molto solubile in ambiente basico; le stesse caratteristiche di solubilità sono mantenute nel derivato metacrilato. Le pKa riportate per la sulfadimetossina e per il suo derivato metacrilato sono 6.10 e 6.17 rispettivamente.

Un aspetto importante delle macromolecole che hanno solubilità pH-dipendente è che i profili di solubilità dipendono dalla percentuale di monomero sulfamidico legato in sequenza al polimero. Polimeri con un elevato rapporto di monomeri sulfamidici legati necessitano di un alto grado di ionizzazione per poter sciogliersi in acqua e di conseguenza la solubilizzazione avviene a pH più elevati rispetto a polimeri con un basso rapporto di monomeri solfonamidici incorporati.

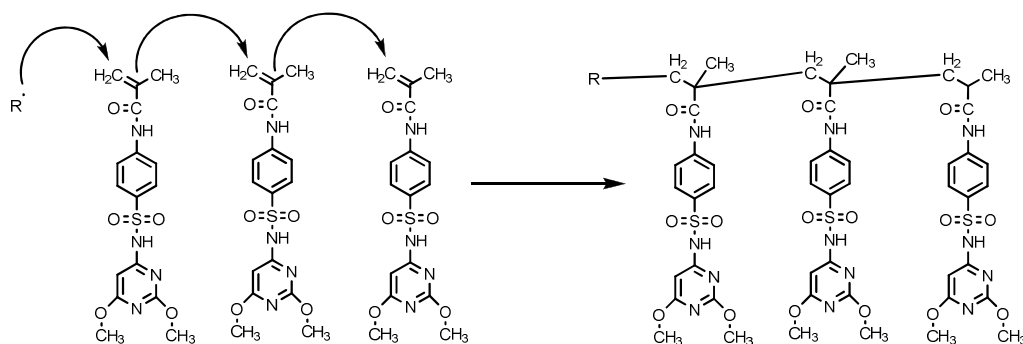


Figura 11: Schema di reazione di polimerizzazione radicalica per ottenere la catena acido sensibile di sulfadimetossina

1.3.3 Polimerizzazione radicalica

La polimerizzazione è il processo che consente la sintesi di un polimero a partire dai monomeri costituenti. Esistono essenzialmente due tipi di polimerizzazione, distinti secondo la struttura chimica dei monomeri di partenza: la poliaddizione e la policondensazione. La prima è una reazione a catena molto rapida che consiste nella

coniugazione di specie chimiche contenenti doppi o tripli legami e avviene senza l'eliminazione di prodotti secondari. La seconda è una reazione chimica più lenta che prevede invece l'eliminazione di prodotti secondari, principalmente acqua.

Per comprendere i meccanismi coinvolti nell'innovativo sistema di polimerizzazione radicalica utilizzata in questo progetto di tesi è necessario definire alcuni concetti fondamentali.

Molte polimerizzazioni radicaliche classiche vengono effettuate in mezzo acquoso e consentono la formazione di polimeri altamente polidispersi. Attraverso tali tecniche non è quindi possibile sintetizzare polimeri aventi composizioni, architetture e pesi molecolari ben definiti. Ciò è dovuto in parte all'elevata reattività del radicale propagante e alla presenza di reazioni di trasferimento e di terminazione di catena. Secondo gli studi cinetici noti in letteratura (REF), una reazione radicalica consta di tre fasi: iniziazione, propagazione e terminazione. La *living polymerization* (REF) è un processo in cui la percentuale di catene nello stato di iniziazione è molto più elevata della percentuale di catene in fase di propagazione. Ne risulta che le catene polimeriche crescono con una cinetica più costante rispetto alla polimerizzazione classica, mantenendo un indice di polidispersività ridotto rispetto alle metodiche classiche. La nascita di questo tipo di polimerizzazione radicalica, con particolare riferimento alla "polimerizzazione anionica vivente", è stata messa a punto da Michael Szwarc che, nel 1956, pubblicò due articoli in cui si parlava per la prima volta nella storia della chimica moderna di "*living polymer*" (Szwarc M., 1956).

Lo sviluppo di questa una nuova tecnica di polimerizzazione radicalica denominata "*controlled/living radical polymerization*" (CRP) ha aperto un capitolo completamente nuovo nella sintesi dei polimeri. Questa tecnica racchiude in sé sia i

vantaggi della polimerizzazione radicalica che delle polimerizzazioni viventi, ampliando i campi di applicazione della prima e permettendo di ottenere polimeri a struttura definita tipici della seconda (Braunecker W. A., Matyjaszewski K., 2007).

1.3.3.1 Controlled/living radical polymerization (CRP)

La CRP è una polimerizzazione radicalica effettuata in presenza di specie in grado di reagire in modo reversibile con il radicale della catena crescente. Nella CRP l'equilibrio dinamico che si instaura tra le specie radicaliche propaganti e le varie specie dormienti ha un ruolo fondamentale (Greszta D et al., 1994).

I radicali coinvolti nella reazione possono essere reversibilmente “intrappolati” in un processo di deattivazione/attivazione come riportato in Figura 12. Dopo una prima fase di iniziazione, il radicale generato al termine della catena polimerica, $P_n\bullet$ (“specie attiva”), può reagire con il monomero M, consentendo l'allungamento della catena, oppure con la specie C (“controllore”) e formare la “specie dormiente” P_n-C . Quest'ultima, in determinate condizioni di reazione, può “liberare” nuovamente il radicale $P_n\bullet$ (si tratta infatti di uno stato reversibile) che potrà quindi reagire nuovamente con M e proseguire la polimerizzazione. Grazie quindi alla presenza di una specie controllore, si ottiene la “protezione” della specie attiva da disattivazione collaterale. In virtù della formazione della specie radicalica attiva in concentrazione molto bassa, si riduce la probabilità che essa possa dare origine a terminazioni di catena, come invece avviene in una polimerizzazione radicalica classica. Questa condizione prende il nome di *persistent radical effect* (PRE) (Goto A. et al, 2004).

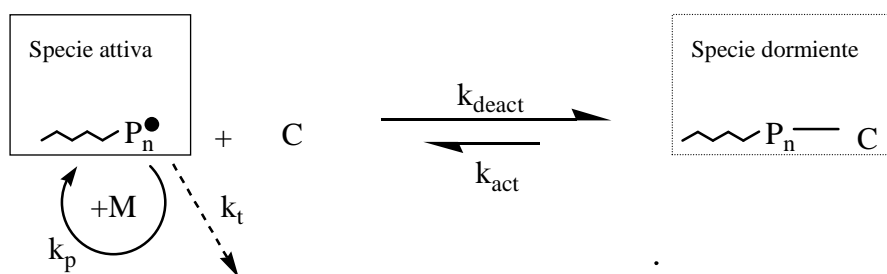


Figura 12: schema generale della polimerizzazione radicalica vivente. P_n^\bullet : polimero iniziatore; M: monomero; C: controllore. k_{deact} : costante cinetica di deattivazione; k_{act} : costante cinetica di attivazione; k_p : costante cinetica di propagazione; k_t : costante cinetica di terminazione.

Il PRE è una caratteristica cinetica che permette il controllo sui sistemi di polimerizzazione radicalica. Le specie radicaliche attive P_n^\bullet vengono rapidamente intrappolate dalla specie C in un processo di deattivazione regolato da una costante k_{deact} . Le specie dormienti vengono riattivate a radicale secondo un processo regolato da una costante k_{act} , per via termica, irraggiamento UV o per aggiunta di un attivatore metallico (come accade nella polimerizzazione ATRP), al fine di ricreare il centro attivo di polimerizzazione. I radicali possono propagare, secondo una costante k_p , ma anche terminare con una costante cinetica k_t . La natura della specie C è ovviamente di importanza fondamentale per guidare l'andamento della reazione nella direzione voluta, ed è su di essa che verte tutta la ricerca del settore.

Nei sistemi che sottostanno al PRE, lo steady-state delle specie radicaliche crescenti è stabilito dal processo deattivazione/attivazione appena descritto, piuttosto che dai processi iniziazione/terminazione tipici della polimerizzazione radicalica classica.

Alcuni esempi di *living polymerization* attualmente applicate in ambito industriale sono la polimerizzazione per trasferimento di gruppo (*Group Transfer*

Polymerization, GTP) (Webster O. W. et al, 1983), la polimerizzazione radicalica a trasferimento di atomo (*Atom Transfer Radical Polymerization*, ATRP) (Matyjaszewski K. et al, 2001), la polimerizzazione controllata da catione nitrosile (*Nitroxide-Mediated Polymerization*, NMP) (Hawker C. J. et al, 2001) ed il processo di trasferimento di catena per addizione-frammentazione reversibile (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*, RAFT) (Chiefari J. et al, 1998).

Tutte queste tecniche si differenziano per la natura del controllore di reazione (C) e permettono di ottenere catene polimeriche con caratteristiche chimico-fisiche e strutturali ben definite e garantite dalle condizioni di reazione controllate. Uno dei vantaggi peculiari di queste tecniche consiste nella possibilità di far reagire in successione la catena radicalica con un monomero differente, rispetto a quelli di cui è composta, con conseguente formazione di *block copolymers* (Figura 13) oppure di isolare il prodotto e farlo reagire successivamente con lo stesso monomero (ricrescita della catena) per ottenere polimeri con peso molecolare variabile ma perfettamente controllato.

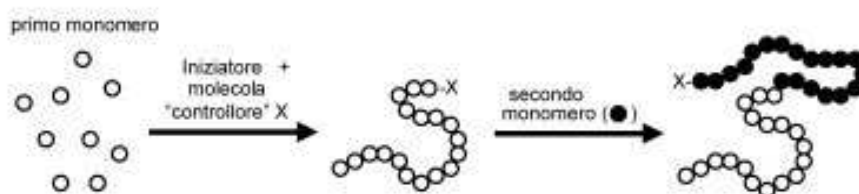


Figura 13 : formazione di *block copolymers* mediante "living polymerization".

1.3.3.2 Atom Transfer Radical Polymerization

K. Matyjaszewski e M. Sawamoto sono stati tra i primi scienziati a studiare la tecnica di *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP), un processo di polimerizzazione controllata molto versatile che permette di sintetizzare omopolimeri e copolimeri da derivati monomerici dell'acido acrilico e metacrilico utilizzando iniziatori radicalici di tipo alchilalogenuri (R-Br o R-Cl).

Il sistema di reazione prevede inoltre un attivatore rappresentato da un metallo di transizione (il rame è uno dei più efficaci) associato ad un opportuno agente chelante (ligando). Il radicale, o specie attiva, viene generato attraverso un processo reversibile ossido-riduttivo catalizzato dal metallo di transizione complessato con il ligando. In questo caso il "controllore" è l'atomo di alogeno che si trasferisce inizialmente dall'iniziatore e, successivamente, dalla catena radicalica, al complesso metallico in modo reversibile. (Figura 14)

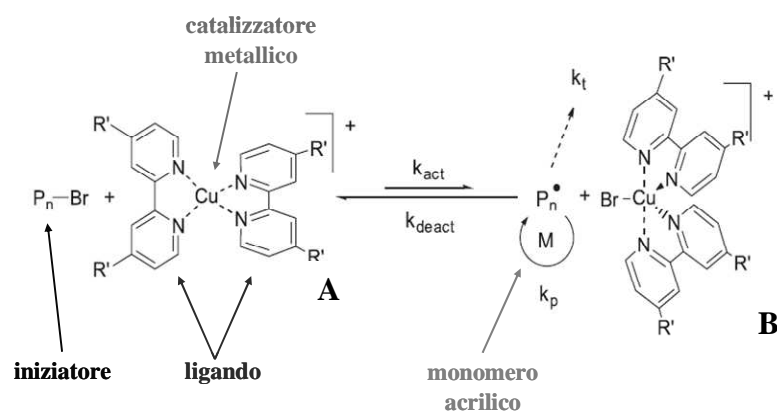


Figura 14: rappresentazione schematica di una polimerizzazione ATRP in presenza dell'attivatore metallico complessato costituito da Cu(I)/bis 2,2'-bipiridina. Nella specie A il rame è presente come Cu(I) mentre nella specie B è presente come Cu(II).

La costante di equilibrio della reazione di polimerizzazione è data dal rapporto tra la costante di attivazione e la costante di deattivazione ($K_{eq} = k_{act}/k_{deact}$) e la sua grandezza determina la percentuale di polimerizzazione. La reazione di ATRP avviene con alta efficienza in modo lento e controllato se la costante di equilibrio (K_{eq}) è molto piccola. Al contrario, una costante di equilibrio elevata provocherà una grande percentuale di terminazione dovuta all'alta concentrazione di radicali in soluzione che reagiscono tra loro bloccando la progressione della polimerizzazione. Parallelamente all'aumento delle specie radicaliche attive in soluzione, si ha anche l'aumento del complesso metallico nel suo stato di ossidazione maggiore il quale sposterà l'equilibrio verso le specie dormienti rallentando la velocità di polimerizzazione favorendone di conseguenza il controllo (Queffelec, J. et al, 2000).

I monomeri che vengono solitamente utilizzati per sintetizzare polimeri mediante tecnica ATRP sono gli acidi acrilici e metacrilici e rispettivi esteri, esteri cianoacrilati, diesteri di malato e fumarato, dipiridine viniliche, tiazoli e ossazoli vinilici, vinilchetoni e stireni. Usando le stesse condizioni di reazione e utilizzando lo stesso attivatore metallico, per ogni monomero è possibile individuare una specifica costante di equilibrio (K_{eq-m}) che ne governa il rapporto tra specie attiva/dormiente (K.Matyjaszewski et al, 2001). Generalmente, acrilati e metacrilati presentano K_{eq} elevate che, unite alla loro buona capacità di polimerizzare, permettono l'impiego di un'ampia gamma di attivatori metallici quali rutenio, rame, nichel, palladio e rodio. La polimerizzazione ATRP di derivati metacrilati mediata da complessi del rame ha mostrato tuttavia una costante di equilibrio significativamente elevata e questo permette di condurre la reazione in condizioni diluite usando basse concentrazioni di attivatore metallico. In commercio è inoltre disponibile un'ampia gamma di iniziatori da cui far

partire la polimerizzazione ATRP. La quantità di iniziatore determina il peso molecolare del polimero finale sintetizzato; iniziatori multifunzionali possono permettere la crescita di catene ramificate. Una rapida iniziazione della reazione è indispensabile per ottenere polimeri con struttura definita e bassa polidispersività. Tra i principali iniziatori troviamo alcani alogenati, alogenuri benzilici, α -aloesteri, α -alochetoni, α -alonitrili e alogenuri sulfonilici (Figura 15).

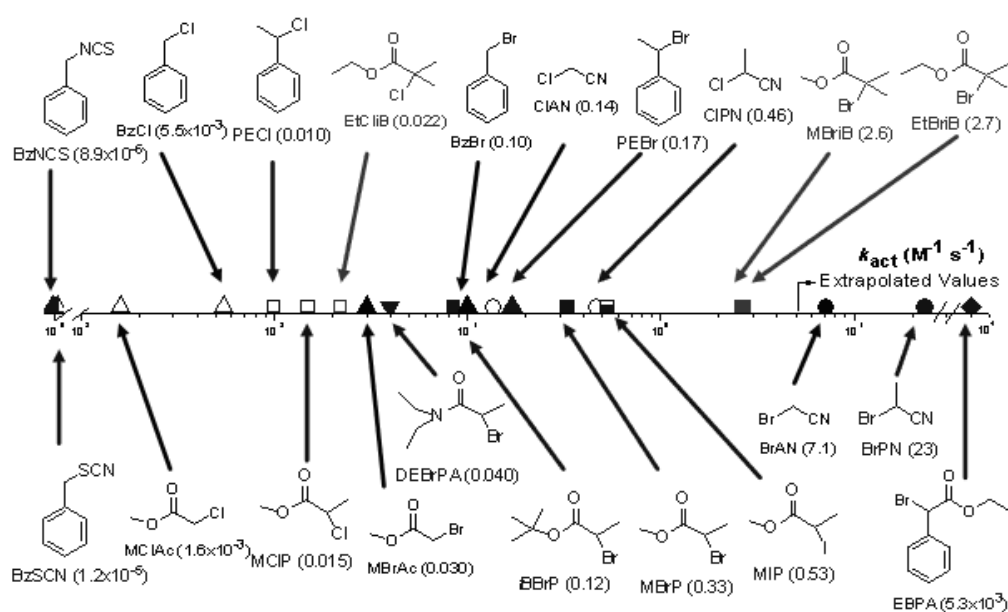


Figura 15: Iniziatori radicalici impiegati nella polimerizzazione ATRP e loro costati di attività.

Vi sono diverse considerazioni generali che permettono di scegliere l'iniziatore più adeguato per la reazione ATRP. La forza del legame degli alogenuri alchilici segue il seguente ordine decrescente: R-Cl > R-Br > R-I. Pertanto, i derivati iodurati dovrebbero essere i composti di prima scelta poiché la dissociazione del legame R-I è quella che richiede il minor contributo di energia. Il loro uso però prevede speciali precauzioni per l'operatore in relazione alla tossicità intrinseca di questi composti. I

derivati del bromo e del cloro sono quindi i più diffusi. In generale, nella metodica ATRP, lo stesso alogeno può essere impiegato sia come componente dell'iniziatore che come componente del sale metallico (es: R-Br/CuBr). Tuttavia, in alcuni casi l'impiego di alogeni diversi può migliorare il controllo della polimerizzazione (Matyjaszewski, K. et al, 1998). In un sistema di iniziazione che prevede alogeni misti per l'iniziatore e il sale metallico, come ad esempio R-X/Mt-Y dove X e Y corrispondono a Cl o Br, la maggior parte delle catene polimeriche termina con un atomo di cloro in virtù della forza del legame R-Cl. Nella reazione di ATRP possono essere usati anche pseudoalogeni come il gruppo SCN che possiede una reattività caratteristica (Kotani, Y. et al, 1999). I complessi dei metalli di transizione giocano un ruolo chiave nelle reazioni di ATRP ma va ricordato che la loro attività catalitica e la loro selettività sono fortemente ligando-dipendenti. Come già menzionato in precedenza, per generare "growing radicals" il centro metallico deve partecipare ad una reazione di trasferimento elettronico con rimozione dell'atomo di alogeno dell'iniziatore ed espansione della propria sfera di coordinazione. Inoltre, a differenza delle polimerizzazioni convenzionali iniziate da un processo redox, il metallo di transizione nello stato di ossidazione maggiore deve essere in grado di disattivare la crescita della catena polimerica per formare le specie dormienti. L'ATRP è stata impiegata con successo utilizzando come attivatori diversi metalli, quali Ti, Mo, Re, Fe, Ru, Rh, Ni, anche se i complessi di rame $[Cu(I)]^+$ si sono dimostrati i più efficienti (Patten, T. E., Matyjaszewski, K. 1999). Inoltre, l'utilizzo di derivati amminici multidentati, quali bipyridina (bpy), dietilentriamina (DETA), tris-(2-amino-etil)amina (TREN), tris-[2-(dimetilamino)etil]amina (Me_6TREN) come ligandi, (Figura 16) in associazione con il

Cu(I), permette di ottenere catalizzatori dotati di una maggiore attività e specificità nel generare specie radicaliche attive (Brauneker W A, Matyjaszewski K., 2007).

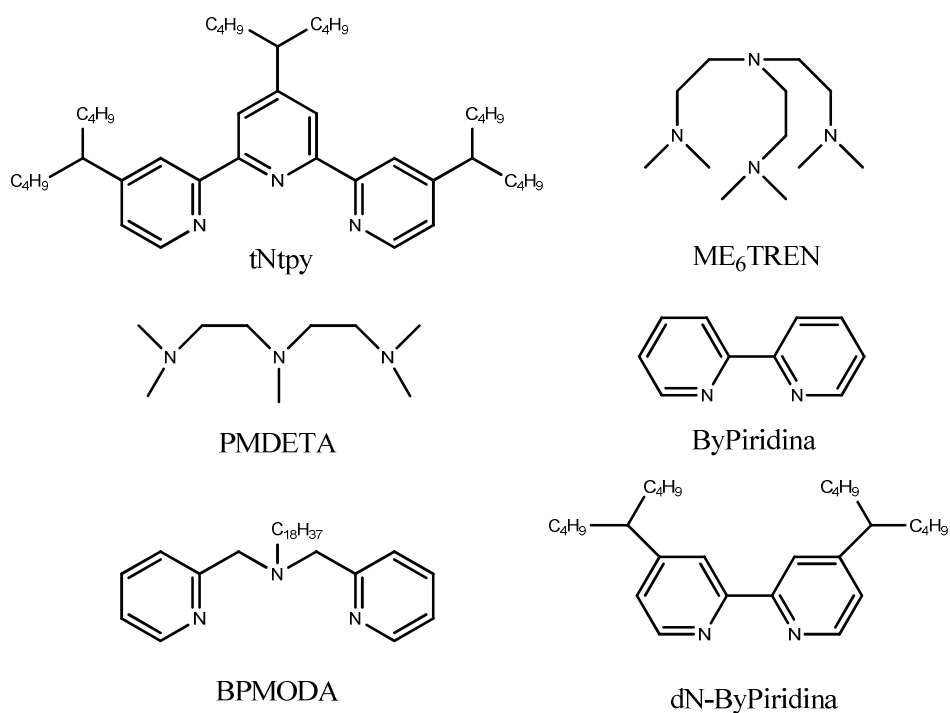


Figura 16: Alcuni ligandi utilizzati nelle reazioni di ATRP

Il ruolo del ligando è fondamentale nel garantire sia la solubilizzazione del sale del metallo di transizione nel solvente in cui avverrà la polimerizzazione che di modulare il potenziale redox del centro metallico per ottenere una reattività adeguata per il trasferimento di atomo (Xia, J. et al, 2000).

1.3.3.3 AGET-ATRP

Nonostante lo straordinario controllo che la tecnica ATRP consente di esercitare sulla topologia, la composizione e la microstruttura dei polimeri, la sua applicazione è limitata. Indubbiamente, le complesse e necessarie operazioni richieste per la rimozione dell'ossigeno e di specie chimiche ossidanti dal sistema di reazione (in cui sono impiegati attivatori metallici allo stato ridotto) rappresentano il fattore limitante principale. Infatti, le reazioni di polimerizzazione radicalica condotte in solvente acquoso difficilmente deossigenabile, provocano l'ossidazione irreversibile del complesso metallico attivatore. A questo si unisce la necessità di usare quantità basse di metallo per facilitarne l'eliminazione durante la purificazione del polimero ottenuto, riducendo parallelamente l'impatto ambientale di queste metodiche se applicate su scala industriale.

L'ATRP classica prevede un sistema iniziatore costituito da un alogenuro alchilico, da cui parte la polimerizzazione, ed un attivatore metallico presente al suo più basso stato di ossidazione. La reazione di AGET ATRP, (*Activator Generated by Electron Transfer ATRP*) utilizza invece un agente riducente per convertire Cu(II) in Cu(I). (Figura 17) (Xia J, Matyjaszewski K., 1997).

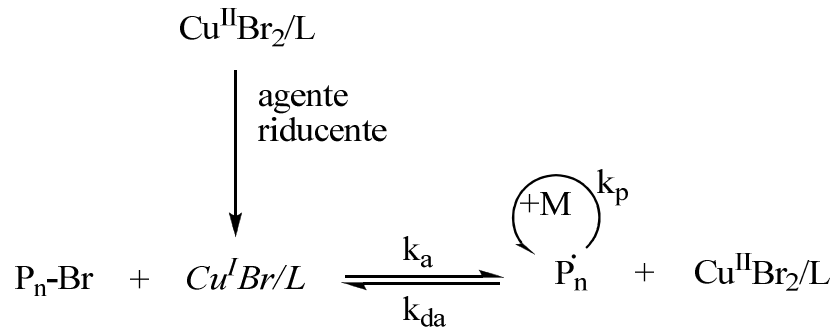


Figura 17: schema di reazione di AGET ATRP. Cu(I)Br/L inizialmente non è presente, è generato *in situ* tramite riduzione di Cu(II)Br/L

L'agente riducente inoltre impedisce l'attività ossidante dell'ossigeno presente in soluzione, aumentando la tolleranza del sistema all'aria, sebbene ciò comporti un aumento della quantità di riducente necessario alla reazione. L'acido ascorbico viene comunemente utilizzato sia in miniemulsione, nel caso in cui la reazione venga eseguita in solventi organici, sia in acqua. La concentrazione dell'agente riducente è il fattore critico per la buona riuscita della reazione. Risultati migliori infatti si ottengono quando il rapporto tra acido ascorbico/Cu(II) è compreso tra 0,1 e 0,5/1 (l'acido ascorbico può ridurre due equivalenti di Cu(II)), ma la presenza di ossigeno in soluzione richiede un rapporto molare più elevato).

La cinetica della reazione di AGET ATRP quindi può essere controllata in ultima analisi dal rapporto Cu(I)/Cu(II) modulato dall'aggiunta dell'agente riducente. L'equazione di seguito riportata descrive il grado di polimerizzazione:

$$(R_p)R_p = k_p K_{\text{atrp}} [M] [RX]_0 \left(\frac{[M_t^n]}{[M_t^{n+1}]} \right)$$

in cui $[M_t^n]$ rappresenta la concentrazione dell'attivatore (metallo allo stato ridotto), $[M_t^{n+1}]$ è la concentrazione del deattivatore (metallo allo stato ossidato), $[RX]_0$ e $[M]$

sono la concentrazione dell'iniziatore e del monomero rispettivamente. L'equazione mostra come il grado di polimerizzazione (*rate of polymerization* R_p) sia proporzionale alla quantità molare di attivatore, M_t , ed inversamente proporzionale al deattivatore, M_t^{n+1} e non è dipendente perciò in modo esclusivo dalla quantità di attivatore metallico presente nell'ambiente di reazione ma piuttosto è proporzionale al rapporto tra attivatore e deattivatore. A causa della terminazione radicalica (che avviene quando due radicali reagiscono tra loro) l'attivatore può essere convertito a deattivatore e ciò comporta una diminuzione del rapporto tra attivatore/deattivatore con conseguente diminuzione della velocità di reazione fino all'eventuale blocco. Per ovviare a questo limite, nelle reazioni di ATRP convenzionale viene aggiunto un eccesso di attivatore per sopperire al problema del blocco della reazione in seguito all'esaurimento dell'attivatore. Ma questo chiaramente richiede successivamente di adottare procedure adeguate per eliminare i complessi metallici dal polimero finale. Per risolvere questi limiti sono state sviluppate metodiche di polimerizzazione alternative, quali appunto la AGET-ATRP, che consente di ridurre la quantità di attivatore metallico da utilizzare.

2- MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

2.1.1 Reagenti

PEG-diammino 3400 Da (H_2N -PEG- NH_2) è stato acquistato da Laysan Bio Inc (Arab, AL). 4-Amino-N-(2,6-dimethoxy-4-pyrimidinyl)benzenesulfonamide (sulfadimetossina, SD), stearoil cloruro, metacriloil cloruro, iodio (I_2), pirene, Triton® X-100, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine fluorescein-labeled (DSPE-FITC) sono stati acquistati da Fluka Analytical (Buchs SG, Switzerland). 2-bromo-isobutirril-bromuro, polyoxyethylene (100) stearyl ether (Brij®-700), acido ascorbico, cloruro di rame (II) [$CuCl_2$], trietilammina (Et_3N), acido trifluoroacetico (TFA), 5(6)-carbossifluoresceina, acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico all'1% in DMF (TNBS), Hoechst 33342, tris(2-piridilmetil)amina (TPMA) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Vectashield® mounting medium con DAPI è stato acquistato da Vector Laboratories Inc (Burlingame, CA). Doxorubicina HCl è stata acquistata da LC Laboratories (Woburn, MA). Membrana da dialisi MW-CO 3500 Da è stata acquistata da Delchimica Scientific glassware srl. La resina Sephadex G-25 superfine è stata fornita da Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine, triethylammonium salt e 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide sono stati acquistati da Invitrogen. Tutti i prodotti e i reagenti per biologia cellulare (terreno RPMI-1640 medium, L-glutammina, tripsina, soluzione di antibiotico

e antimicotico, acido bicinconinico, soluzione di solfato di rame (II), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), siero bovino fetale (FBS), tampone PBS con e senza Ca/Mg) e le plastiche Greiner sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tutte le soluzioni acquose sono state preparate utilizzando acqua deionizzata (milliQ-grade, 18.2 M Ω) ottenuta mediante sistema Millipore MilliQ (MA, USA). I sali impiegati per la preparazione dei tamponi sono stati acquistati da Riedel-de-Haen (Seelze, Germany), Fluka Analytical (Buchs SG, Switzerland) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tutti i solventi ed i rimanenti reattivi utilizzati sono stati scelti tra quelli specifici per HPLC o con maggiore grado di purezza tra quelli disponibili in catalogo da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) o da Carlo Erba (Milano, Italy).

2.1.2 Strumentazione

- La purificazione dei coniugati intermedi e di quello finale è stata realizzata con una colonna per cromatografia a bassa pressione caricata con resina Sephadex G-25 *superfine*.
- Le determinazioni spettrofotometriche sono state effettuate con spettrofotometro UV-Vis Lambda 25 della Perkin-Elmer (Northwolk, CT, USA).
- Le analisi cromatografiche sono state condotte con sistema *High Performance Liquid Chromatography* Jasco (Tokyo, Japan), costituito di due pompe PU-2080, rivelatore UV-2075, interfaccia LC-NetII/ADC e software ChromNav per l'elaborazione dei dati.
- Gli spettri di risonanza magnetica del protone ($^1\text{H-NMR}$) sono stati registrati con Spectrospin AMX 300 MHz Bruker (Fallanden, Switzerland) utilizzando solventi deuterati contenenti tetrametilsilano (TMS) come riferimento interno.

- Le analisi di fluorescenza sono state condotte con fluorimetro Jasco FP-6500 (Tokyo, Japan).
- Le dimensioni particellari sono state determinate mediante light scattering dinamico Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd, UK).
- Le misure di pH sono state eseguite con pHmetro Mettler Toledo Seven Easy S20-K equipaggiato con elettrodo Mettler Toledo Inlab 413 (Schwerenbach, Switzerland).
- Le analisi di citofluorimetria sono state eseguite utilizzando citofluorimetro FACSCalibur Becton, Dickinson (USA) dotato di software CellQuest Pro.
- Le immagini di microscopia confocale sono state ottenute usando microscopio confocale Leica TCS SP5 Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Germany) e software Leica Application Suite advanced fluorescence 2.0.2 per l'elaborazione dei dati.
- Le misure di *bioimaging in vivo* sono state condotte con Caliper Xenogen IVIS 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA).
- Per le analisi di biologia cellulare sono stati utilizzati cappa sterile Space e incubatore PBI International e microscopio ottico Axiovert 40CFL Zeiss.
- Per la lettura delle piastre di coltura cellulare è stato utilizzato il sistema Microplate Autoreader acquistato da Biotek Instruments inc., mod. EL311SK (Highland, Vermont U.S.A).
- Durante le procedure di sintesi e preparazione dei campioni sono stati inoltre utilizzati Rotavapor mod. R114 BÜCHI Labortechnik AG (Postfach, Switzerland), liofilizzatore Vacuum Centrifuge HETO Lab. Equipment (Birkerød, Danimarca), sistema ad ultrasuoni Ultrasonic Cleaner mod. 5210 Branson (Dambury, USA), centrifughe CENTRIKON T-42K Kontron Instruments e Z300 Hemle.

- Per la filtrazione dei tamponi sono stati usati sistemi Millipore (Bendford, MA, USA) con filtro da 0,22 μm .

2.2 Metodi

2.2.1 Test di Snyder per la determinazione di gruppi amminici primari

La determinazione quantitativa dei gruppi amminici liberi dei prodotti derivanti dai vari step previsti per la sintesi del polimero è stata eseguita mediante il test colorimetrico di Snyder con acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS).

Il TNBS viene fatto reagire in condizioni basiche con i prodotti da analizzare ed il cromoforo che si forma in seguito ad accoppiamento con i gruppi amminici liberi viene determinato per via spettrofotometrica a 420 nm (Snyder SL, Sobocinsky PZ. 1975). I campioni da analizzare vengono preparati sciogliendo i composti in 970 μL di tampone borato 0.1 M, pH 9.3. A ciascun campione si aggiungono, successivamente, 30 μL di TNBS (1% p/v in DMF). Il riferimento viene preparato con 970 μL dello stesso tampone e 30 μL di TNBS. La Figura 18 mostra la reazione tra il TNBS ed un generico composto amminico R-NH₂ e il relativo addotto cromogenico.

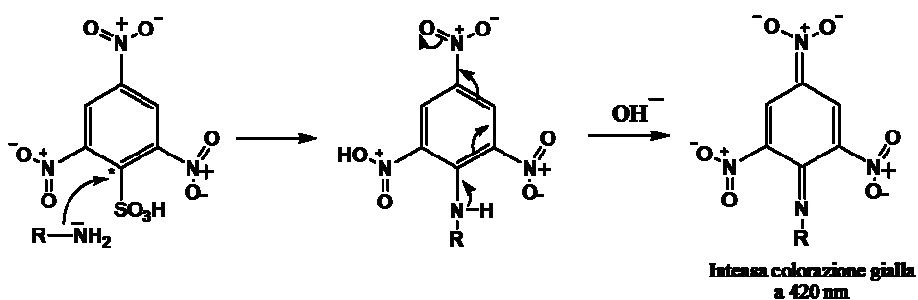


Figura 18 : Meccanismo di reazione dell'acido 2,4,6-trinitrobenzenesolfonico (TNBS) con gruppi amminici primari.

L'assorbimento a 420 nm del campione è direttamente proporzionale alla quantità di gruppi amminici in soluzione la cui concentrazione viene calcolata sulla base di una retta di taratura ottenuta con soluzioni a titolo noto di glicil-glicina (Gly-Gly). La retta di taratura risultante è pari a $y = 14,679x + 0,0038$; $R^2 = 0,9997$. (Figura 19)

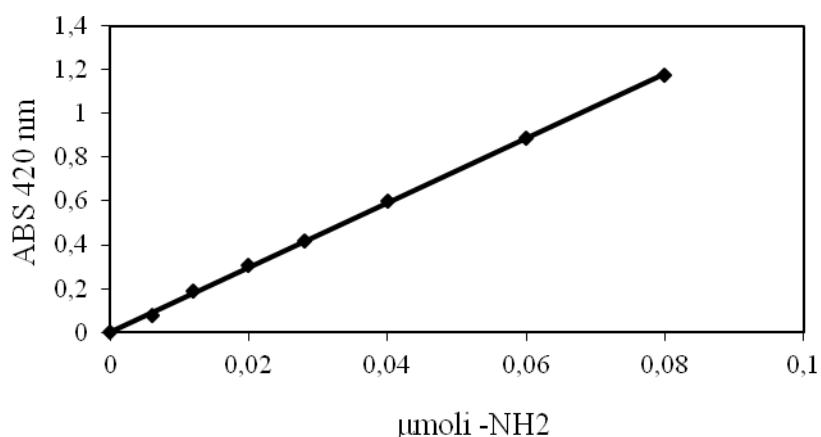


Figura 19: retta di taratura di Gly-Gly a diluizioni note aggiunta di TNBS.

2.2.2 Test allo iodio per la determinazione quantitativa del polietilenglicole

La determinazione della concentrazione di polietilenglicole (PEG) in soluzioni a titolo ignoto è stata ottenuta con il saggio allo iodio, seguendo la metodica descritta da Sims e Snape (Sims G E, Snape T J., 1980).

Ad 1 mL di soluzione acquosa contenente PEG si aggiungono 250 µL di una soluzione di cloruro di bario (5% p/v in HCl 1 N) e 250 µL di una soluzione di iodio (1.27% p/v in KI al 2% in acqua). Dopo 15 minuti si determina spettrofotometricamente l'assorbanza dei campioni a 535 nm da cui si ricava la concentrazione di PEG nel campione sulla base di una retta di taratura ottenuta con campioni a concentrazione nota

di PEG. La retta di taratura risultante è pari a $y = 0,0594x + 0,0093$; $R^2 = 0,9962$

(Figura 20).

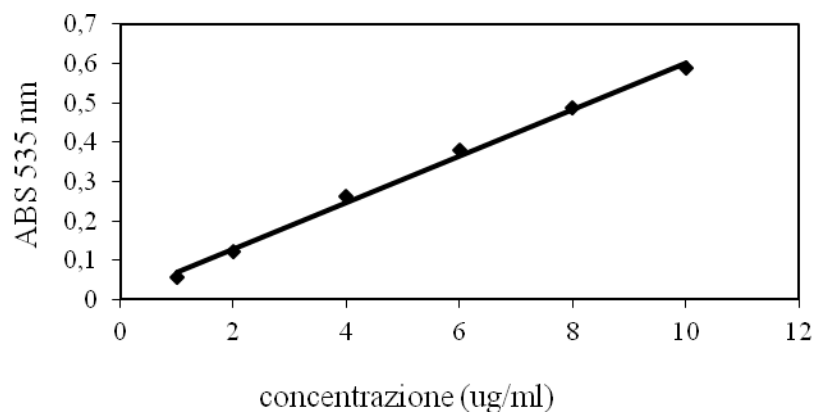


Figura 20 : retta di taratura di PEG 5000 eseguita secondo la metodica di Sim e Snapes.

2.2.3 Determinazione del rapporto PEG/SDM nel polimero stearoil-PEG-poli(SDM)

Viene preparata una soluzione madre 2 mg/mL di stearoil-PEG-poli(SDM) in NaOH 0.1 M. La soluzione viene opportunamente diluita a 20 $\mu\text{g/mL}$ in NaOH 0.1 M e analizzata per via spettrofotometrica per determinare la concentrazione di sulfadimetossina misurando l'assorbanza a 265 nm (ϵ molare = 27.017 mol/L x cm). L'analisi spettrofotometrica viene eseguita in triplo. La Figura 21 riporta lo spettro UV-Vis di SDM.

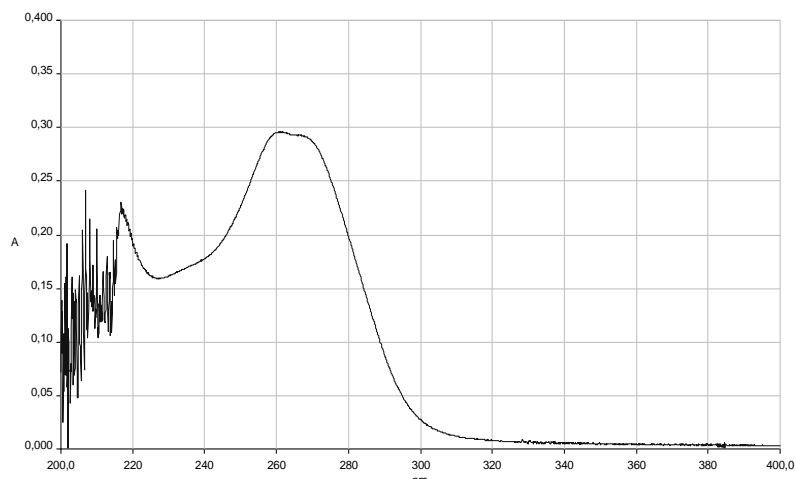


Figura 21: Spettro UV-Vis di SDM in NaOH 0.1N

La soluzione madre di SDM è stata analizzata mediante saggio allo iodio come riportato nel paragrafo 2.2.2 per la determinazione del PEG. I risultati ottenuti dall'analisi spettrofotometrica della sulfadimetossina e del saggio allo iodio sono stati elaborati per ricavare il rapporto molare PEG/SDM nel coniugato stearoil-PEG-poli(SDM).

2.2.4 Test della BCA per la quantificazione cellulare

Il saggio BCA è un'analisi colorimetrica usata per determinare la concentrazione totale di proteine in soluzione.

Si prepara una retta di taratura predisponendo in piastre da 96 pozzetti soluzioni seriali di lisato cellulare a titolo noto alle quali sono stati aggiunti 200 μ L di reattivo costituito da 50 parti di acido bicinconinico e 1 parte di solfato di rame (II). La piastra è stata incubata a 37° C per 30 minuti e in seguito è stata determinata l'assorbanza a 570 nm. In Figura 22 è riportato la retta di taratura di una sospensione di cellule determinata sulla base del contenuto proteico.

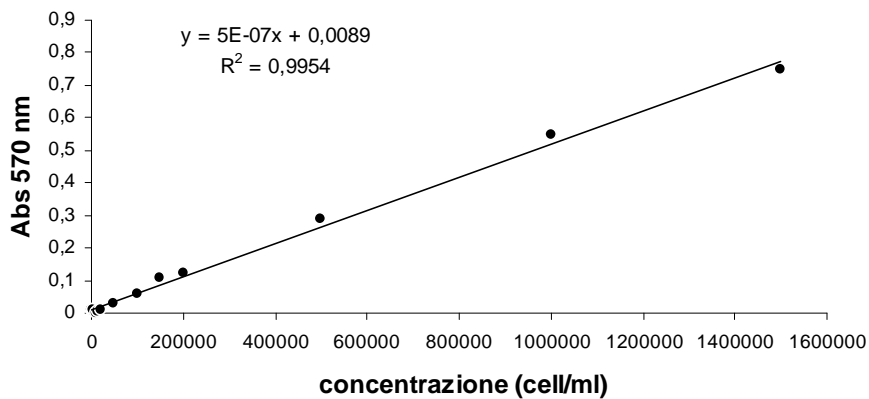


Figura 22: Retta di taratura della concentrazione cellulare di MCF-7 ottenuta mediante test della BCA.

2.2.5 Analisi cromatografica mediante *high performance liquid chromatography* per la quantificazione di doxorubicina.

Doxorubicina intraliposomiale è stata determinata dopo diluizione 1:2 dei liposomi con DMSO. Il farmaco è stato quantificato con sistema RP-HPLC con colonna Phenomenex Luna C18 eluita con acqua e acetonitrile addizionati dello 0.05 % di TFA. La corsa cromatografica viene eseguita in modo isocratico al 30% di acetonitrile. Il rivelatore UV-Vis è stato fissato a 485 nm. La concentrazione di doxorubicina nella sospensione colloidale è stata determinata dal valore dell'area del picco di eluizione facendo riferimento alla retta di taratura ottenuta dall'analisi di diluizioni seriali di doxorubicina in DMSO e riportata in Figura 23. La retta di taratura risultante è pari a $y = 9751,2x + 4122,1; R^2 = 0,9997$.

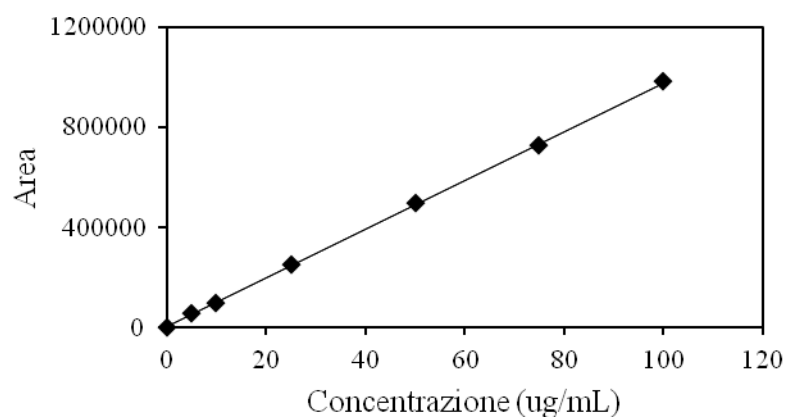
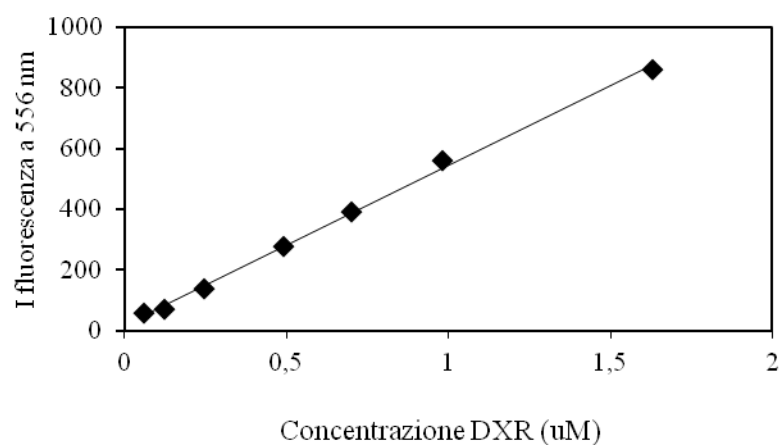


Figura 23: Retta di taratura di Doxorubicina mediante RP-HPLC

2.2.6 Analisi fluorimetrica per la determinazione di doxorubicina

Diluizioni seriali di doxorubicina in tampone fosfato 10 mM pH 7.4 e 6.5 sono state analizzate per via fluorimetrica alla lunghezza d'onda di eccitazione di 490 nm e di emissione a 556 nm. In Figura 24 sono stati riportati i valori di intensità di fluorescenza in funzione della concentrazione concentrazione di doxorubicina. Ottenuti a pH 6.5 e 7.4. Le rette di taratura risultanti sono pari a $y = 524,69x + 18,564; R^2 = 0,9976$ e $y = 495,7x + 3,6019; R^2 = 0,9994$ per i due pH rispettivamente.

A)



B)

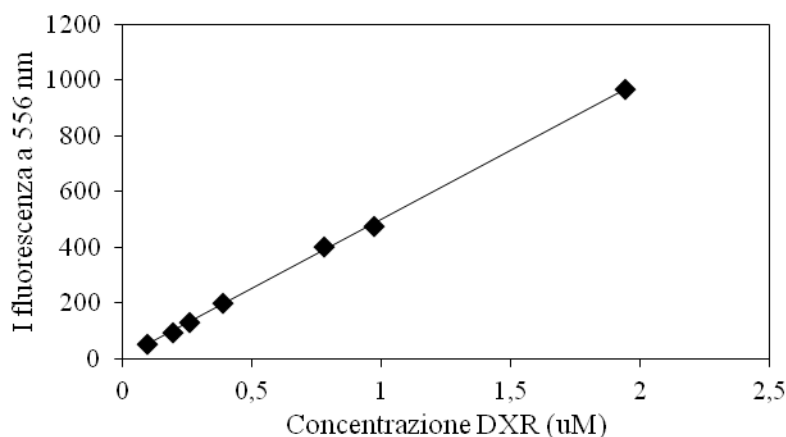


Figura 24: Retta di taratura di doxorubicina per via fluorimetrica in tampone fosfato 10 mM a pH 6.5 (A) e 7.4 (B)

2.2.7 Determinazione quantitativa di 5(6)-carbossifluoresceina mediante spettroscopia UV-Vis

Diluizioni seriali di 5(6)-carbossifluoresceina in tampone fosfato 10 mM pH 7.4 e 6.5 sono state preparate e analizzate attraverso spettroscopia UV-Vis. Il massimo del picco di assorbimento è stato registrato a 490 nm. In Figura 25 sono stati riportati i valori di assorbanza a 490 nm in funzione della concentrazione della 5(6)-carbossifluoresceina. Le rette di taratura risultanti sono pari a $y = 0,0241x + 0,0065; R^2 = 0,9992$ e $y = 0,0166x - 0,0123; R^2 = 0,9929$ a pH 7.4 e 6.5 rispettivamente.

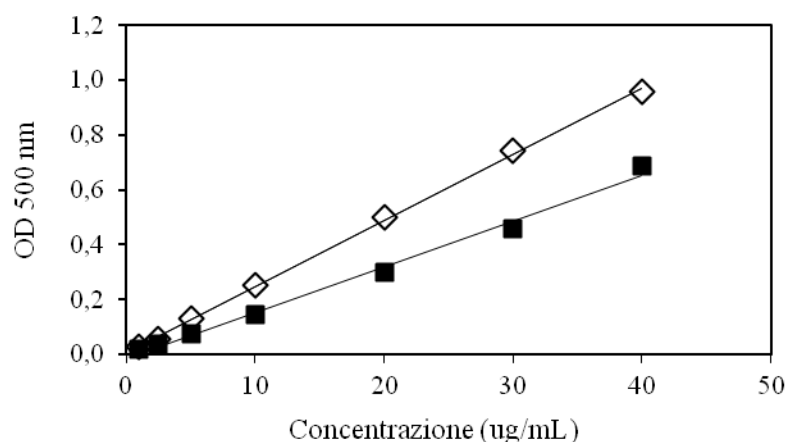


Figura 25: Retta di taratura di 5(6)-carbossifluoresceina in tampone fosfato 10 mM a pH 7.4 (◇) e pH 6.5 (■).

2.2.8 Coniugazione di PEG-diammino con stearoil cloruro e sulfadimetossina metacrilata

2.2.8.1 Sintesi di sulfadimetossina metacrilata

Sulfadimetossina (1.5 g, 5 mmoli) è stata sciolta in 10 mL di miscela H₂O/Acetone (1:1) in presenza di NaOH 0.25 N in pallone. La soluzione è stata posta in bagno di ghiaccio e successivamente sono stati aggiunti goccia a goccia 484 µL di metacriloil cloruro (0.523 g, 5 mmoli) (Naa K, et al, 2004). Il precipitato, che si forma istantaneamente, è stato recuperato tramite filtro di vetro sinterizzato, lavato per 4 volte con H₂O per eliminare l'eventuale residuo di NaCl e successivamente liofilizzato. Il prodotto finale è stato caratterizzato tramite IR, ¹H-NMR in DMSO-d₆ e analisi di massa ESI-TOF. Lo schema di reazione è riportato in Figura 26:

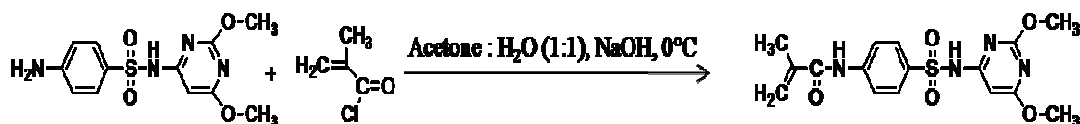


Figura 26: Schema di reazione per la modifica di sulfadimetossina con gruppo metacrilico

2.2.8.2 Modifica di PEG-diammino con stearoil cloruro

500 mg di PEG-diammino 3.4 kDa (1.47×10^{-4} mol) sono stati sciolti in 2 mL di DCM anidro e posti in pallone di vetro con tappo a due vie. La soluzione è stata mantenuta in agitazione con stirrer e sotto flusso di azoto. Stearoil cloruro (44.5 mg, 1.47×10^{-4} moli) sciolto in 200 μ L di DCM anidro è stato aggiunto goccia a goccia al PEG-diammino. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente per una notte.

La Figura 27 riporta lo schema di reazione di coniugazione..

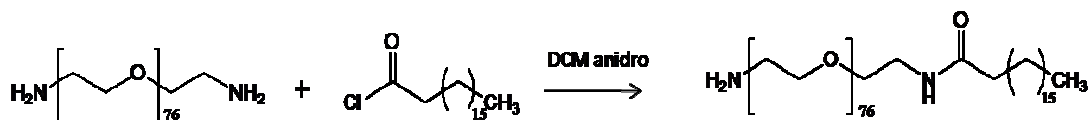


Figura 27: Schema di reazione tra PEG-diammino e stearil cloruro

La miscela di reazione è stata quindi precipitata in 30 mL di etere freddo per due volte e il precipitato è stato lavato una volta con lo stesso solvente freddo e posto sottovuoto

Sul campione è stata eseguita l'analisi $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 e la determinazione dei gruppi amminici primari liberi mediante saggio di Snyder.

2.2.8.3 Modifica di stearoil-PEG-NH₂ con bromo-isobutirrilbromuro

NH₂-PEG_{3,4} kDa-stearoil (500 mg, 1.36x10⁻⁴ mol) è stato sciolto in 100 mL di toluene e trattato mediante l'apparecchio di Dean-Stark ad ebollizione per eliminare l'acqua presente. Il residuo di toluene è stato rimosso mediante Rotavapor e il film residuo è stato ridisciolti in 2 mL di DCM anidro. La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione e in condizioni anidre con tubo al calcio cloruro. Alla soluzione è stata aggiunta trietilammina (19 µL, 1.36x10⁻⁴ mol) e bromo-isobutirrilbromuro (168 µL, 1.36x10⁻³ mol) in modo da avere rispettivamente un rapporto finale con il polimero di 1:1 e 1:10. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. La Figura 28 riporta lo schema di reazione.



Figura 28: Schema di reazione tra NH₂-PEG-stearil e bromo-isobutirrilbromuro in presenza di TEA

Il prodotto essiccato sottovuoto viene analizzato mediante spettroscopia di risonanza del protone ¹H-NMR in CDCl₃ e i gruppi amminici primari vengono quantificati secondo la metodica prevista dal test di Snyder. La miscela di reazione è stata precipitata in 30 mL di etere freddo per due volte e il precipitato è stato lavato una volta con lo stesso solvente e posto sottovuoto.

2.2.8.4 Polimerizzazione radicalica di SDM mediante AGET-ATRP

200 mg (5.24×10^{-5} moli) di Br-PEG-stearoile e 178 mg (4.71×10^{-4} moli) di sulfadimetossina metacrilata (SDM) disciolti sono stati sciolti in 2 mL di NaOH 157 mM e posti in vial di vetro. Si prepara una soluzione madre 0.26 mM di tris(2-piridilmetil)amina e CuCl_2 in rapporto molare 1:1 in NaOH 157 mM. 200 μL di tale soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia alla miscela di polimero e SDM e mantenuta sotto flusso di azoto per un'ora. aggiungono Sono stati 100 μL di una soluzione di acido ascorbico 4.19×10^{-2} M in NaOH 157 mM (rapporto molare 1:0.08 rispetto il polimero Br-PEG-stearoile). La soluzione è stata quindi posta in bagno di glicerina termostato a 35 °C per 16 h. La Figura 29 riporta lo schema di polimerizzazione radicalica AGET-ATRP con sulfadimetossina-metacrilato.

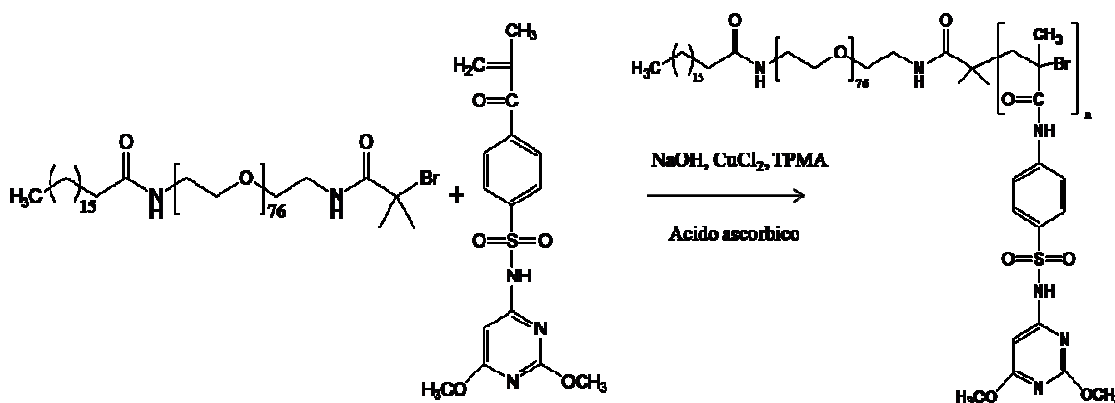


Figura 29 : Schema di polimerizzazione di SDM a partire dall'iniziatore Br-PEG-stearoil

Il solvente di reazione è stato evaporato mediante Rotavapor. Il residuo solido ripreso in 1 mL di DMF è stato precipitato in 15 mL di etere freddo. Il precipitato ridisciolti in DCM è stato precipitato nuovamente in etere freddo. Il prodotto essiccato sottovuoto è

stato purificato attraverso cromatografia per esclusione in colonna a bassa pressione utilizzando una resina G25 superfine. La colonna è stata eluita con acqua basificata per aggiunta di NH_3 fino a pH 8.5. Le frazioni raccolte sono state analizzate per via spettrofotometrica a 265 nm e mediante saggio allo iodio per determinare la presenza di SDM e PEG. Le frazioni risultate positive sia per il PEG che per SDM sono state unite e liofilizzate. Il prodotto ottenuto è stato analizzato mediante $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 .

2.2.9 Determinazione del punto di aggregazione dell'unimero stearoil-PEG-poli(SDM)

5 mg di stearoil-PEG-(poly)SDM sono stati sciolti in 1 mL di acqua milliQ e aggiunti di 2 μL di NaOH 1 N. La soluzione è stata trasferita in cuvetta di quarzo ed è stata aggiunta di aliquote di 2 μL di HCl 0.1 N. Dopo ogni aggiunta è stato registrato il valore di pH della soluzione e quello di assorbanza a 500 nm. I valori di assorbanza sono stati riportati in grafico in funzione dei valori di pH.

2.2.10 Preparazione e caratterizzazione di liposomi

I liposomi sono stati preparati seguendo il metodo della *thin layer hydration* proposto nel 1965 da Bangham.

E' stata preparata una soluzione di 1 mL di fosfatidilcolina (5 mg/mL) / colesterolo (1,2 mg/mL) (rapporto molare 1:0.5) in cloroformio. La soluzione è stata posta in pallone di vetro e il solvente organico è stato evaporato sottovuoto a 40 °C. Il film idrolipidico è stato quindi reidratato in tampone fosfato 10 mM pH 7.6 in modo da ottenere una

soluzione 5 mg/mL. La sospensione è stata messa in agitazione su vortex e quindi estrusa attraverso membrana di policarbonato con cut-off 200 nm e quindi conservata a 4°C al riparo dalla luce.

Liposomi acido sensibili sono stati ottenuti per funzionalizzazione con stearyl-PEG-poli(SDM) mentre i liposomi acido sensibili stabilizzati sono stati ottenuti per funzionalizzazione con stearyl-PEG-poly(SDM) e PEG_{5000 Da}-DSPE. Il processo di funzionalizzazione è stato condotto mediante metodica *post-insertion* che prevede l'aggiunta dei polimeri direttamente ai liposomi già formati a una temperatura di 45°C sotto agitazione a 350 rpm per 1 ora. La soluzione madre di stearyl-PEG-poly(SDM) è stata preparata alla concentrazione di 20 mg/mL in acqua basificata per aggiunta di NH₃ fino a pH 8 mentre la soluzione madre di 20 mg/mL di PEG_{5000 Da}-DSPE è stata preparata in etanolo. Le soluzioni sono state conservate a 0°C fino al momento dell'impiego. La funzionalizzazione con PEG_{5000 Da}-DSPE è stata eseguita quotando aggiungendo aliquote di polimero alla dispersione di liposomi lasciando evaporare l'etanolo a 60°C per circa 3 ore. La sospensione liposomiale è stata quindi aggiunta e mantenuta a 45°C sotto agitazione a 350 rpm per 1 ora.

Sono state preparate diverse formulazioni utilizzando differenti rapporti molari tra i due polimeri:

- *Liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearyl-PEG-poly(SDM) 6% mol/mol*: 1 mL di sospensione liposomiale EPC/Chol 10 mg/mL (0.0152 mmol totali) è stata aggiunta di 154 µL di soluzione madre di stearyl-PEG-poly(SDM) (3.08 mg, 0.00092 mmol).
- *Liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearyl-PEG-poly(SDM) 6% mol/mol stabilizzati con PEG_{5000 Da}-DSPE 0.25% mol/mol*: 1 mL di sospensione

liposomiale EPC/Chol 10 mg/mL (0.0152 mmol totali) è stata addizionata di 77 μ L di soluzione madre di stearyl-PEG-poli(SDM) (1.54 mg, 0.00046 mmol) e di 4 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 60 μ L, 120 μ L di soluzione madre di PEG₅₀₀₀ Da-DSPE per ottenere concentrazioni pari a 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1.5% e 3% mol/mol rispettivamente.

- *Liposomi non acido sensibili funzionalizzati con stearyl-PEG-OH (Brij-700[®]) 6% e PEG₅₀₀₀ Da-DSPE 0.25% mol/mol:* 1 mL di sospensione liposomiale EPC/Chol 10 mg/mL (0.0152 mmol totali) è stata addizionata di 250 μ L di soluzione madre di *stearyl-PEG-OH (Brij-700[®])* (2.6 mg, 0.00052 mmol) e 10 μ L di soluzione madre di PEG₅₀₀₀ Da-DSPE.

I liposomi ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi dimensionali con *Dynamic Light Scattering* (DLS). Con la stessa metodica è stata valutata la stabilità di ciascuna formulazione nel tempo.

2.2.11 Studio di stabilità di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearyl-PEG-poli(SDM)

Sono state preparate diverse formulazioni liposomiali secondo la metodica riportata nel paragrafo precedente.

I film idrolipidici sono stati reidratati con diversi tamponi per ottenere una concentrazione finale di liposomi pari a 2 mg/mL:

1. ammonio solfato 10mM e 250 mM pH 8,
2. ammonio fosfato 10 mM e 250 mM pH 8,

3. tampone fosfato 10, 20 e 30 mM pH 7.6,

I liposomi sono stati funzionalizzati con stearoyl-PEG-poly(SDM) alla concentrazione del 6% mol/mol. Le dimensioni dei liposomi sono state quindi esaminate nel tempo attraverso misure di DLS.

2.2.12 Studio di stabilità di liposomi acido sensibili stabilizzati con PEG₅₀₀₀ Da-DSPE.

I liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearoyl-PEG-poly(SDM) 6% mol/mol sono stati aggiunti di concentrazioni crescenti di PEG₅₀₀₀ Da-DSPE corrispondenti allo 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1.5% e 3% mol/mol secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.2.10 alla concentrazione di 5 mg/mL in tampone fosfato 10 mM pH 7.8 e in tampone ammonio fosfato 10 mM pH 8. Le soluzioni sono state quindi diluite 1:5 nel rispettivo tampone e i liposomi sono stati quindi funzionalizzati con stearoyl-PEG-poly(SDM) alla concentrazione del 6% mol/mol. Le soluzioni sono state suddivise in due aliquote ciascuna e il pH della seconda aliquota è stato abbassato a 6.5 mediante aggiunta di HCl 1M. I campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente e le dimensioni vescicolari sono state determinate a tempi prestabiliti con metodica *DLS*.

2.2.13 Cinetica di aggregazione pH dipendente di liposomi acido sensibili stearoyl-PEG-poly(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25%

Liposomi acido sensibili sono stati preparati secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.2.10 utilizzando tampone fosfato 10 mM pH 7.8 come reidratante ottenendo

una soluzione liposomiale alla concentrazione di 1 mg/ml. Volumi di 1mL a 7.4, 6.5 e 6 sono stati analizzati nel tempo attraverso misurazioni *DLS*.

2.2.14 Studio di stabilità di liposomi acido sensibili stearoyl-PEG-poly(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25% in RPMI e FBS.

Liposomi acido sensibili sono stati preparati secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.2.10. Sospensioni liposomiali alla concentrazione di 1 mg/mL sono state preparate per diluizione in terreno RPMI addizionato di tampone fosfato 10 mM (concentrazione finale) a pH 7.4 o nel medesimo tampone addizionato del 10% di FBS. Volumi di 1mL sono stati analizzati nel tempo attraverso misurazioni *DLS*.

2.2.15 Studio di caricamento di liposomi con 5(6)-carbossifluoresceina

Una soluzione di 1mL di fosfatidilcolina/colesterolo (5 mg/mL fosfatidilcolina e 1.2 mg/mL colesterolo, rapporto molare 1:0.5) in cloroformio è stata posta in pallone di vetro e il solvente organico è stato evaporato sottovuoto a 40 °C. Il film idrolipidico è stato quindi reidratato con una soluzione di 5(6)-carbossifluoresceina 1mg/ml in tampone fosfato 10 mM pH 7.6 in modo da ottenere una dispersione liposomiale di 5 mg/mL. La sospensione è stata posta in agitazione con vortex e quindi estrusa attraverso membrana di policarbonato con cut-off 200 nm e conservata al riparo dalla luce. I liposomi sono stati funzionalizzati con stearoyl-PEG-poly(SDM) 6% e PEG-DSPE 0.25% mol/mol mediante tecnica *post-insertion*. La soluzione è stata quindi trasferita in membrana da dialisi con cut-off 12000 Da e dializzata in tampone fosfato 10 mM pH

7.6 per 24 ore al riparo dalla luce. La stessa procedura è stata eseguita anche per la preparazione di liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-OH 6% e PEG-DSPE 0.25% mol/mol come riferimento. 500 uL di ciascuna formulazione liposomiale preparata sono stati in seguito analizzati per valutarne la capacità di mantenere il caricamento di 5(6)-carbossifluoresceina in presenza di proteine del siero. 100 uL di soluzione sono stati diluiti 1:10 in tampone fosfato 10 mM contenente 10% di FBS e a tempi prestabiliti sono stati centrifugati con Amicon spinning tube[®] (cut-off 30000 Da) a 10000 rpm per 5 minuti. Il filtrato è stato analizzato attraverso spettroscopia UV-Vis per la quantificazione della carbossifluoresceina presente.

2.2.16 Studio di *leakage* di 5(6)-carbossifluoresceina da liposomi acido sensibili

3 mL di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearyl-PEG-poly(SDM) 6% e PEG-DSPE 0.25% e 3 mL di liposomi non acido sensibili funzionalizzati con PEG-DSPE 6.25% e caricati con 5(6)-carbossifluoresceina sono stati preparati alla concentrazione di 5 mg/mL come riportato nel paragrafo 2.2.15. Le soluzioni sono state suddivise in due aliquote e il pH è stato corretto a 7.4 e 6.5 mediante aggiunta di HCl. Le dimensioni delle vescicole sono state quindi determinate attraverso *DLS*. A tempi prestabiliti le soluzioni sono state centrifugate con Amicon spinning tube[®] (cut-off 30000 Da) a 10000 rpm per 5 minuti e il filtrato è stato analizzato attraverso spettroscopia UV-Vis per la quantificazione della carbossifluoresceina presente.

2.2.17 Studio di rilascio di 5(6)-carbossifluoresceina da liposomi acido sensibili in condizioni sink

I liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearyl-PEG-poly(SDM) 6% e PEG-DSPE 0.25% alla concentrazione di 5mg/ml sono stati preparati e caricati con 5(6)-carbossifluoresceina come riportato nel paragrafo 2.2.15. 1500 μ L di soluzione sono stati posti in membrana da dialisi con limite di esclusione molecolare di 14000 Da e dializzati contro 2L di tampone fosfato 10 mM pH 7.4. Altri 1500 μ L sono stati prelevati e il pH è stato corretto a 6.5. 1400 μ L sono stati posti nello stesso tipo di membrana e dializzati contro 2L di tampone fosfato 10 mM pH 6.5. La dialisi è stata condotta a 37°C. A tempi prestabiliti sono stati prelevati 50 μ L di ciascun campione dall'interno della membrana e analizzati all'UV-Vis per la quantificazione della carbossifluoresceina.

2.2.18 Studio di caricamento di liposomi con doxorubicina

Una sospensione di liposomi funzionalizzati con stearyl-PEG-poly(SDM) 6% e PEG-DSPE 0.25% alla concentrazione di 5mg/ml in tampone ammonio fosfato 10 mM pH 8, è stata diluita 1:5 con una soluzione isotonica di sodio cloruro in presenza di doxorubicina (*drug to lipid ratio*: 0.2:1). La soluzione è stata posta in termo mixer 40°C e 300 rpm per un'ora. La soluzione è stata quindi centrifugata a 2000 rpm per 5 minuti e il surnatante è stato trattato con 60 mg di resina a scambio ionico Dowex[®] 50-WX8 (Barenholz). Y. et al. 1992) precedentemente resa in forma sodica per trattamento con NaOH 1M e successivi lavaggi con sodio cloruro 30 mM fino a pH neutro. La soluzione

è stata centrifugata e il surnatante è stato recuperato e caratterizzato attraverso analisi DLS e RP-HPLC per quantificarne il caricamento del farmaco all'interno delle vescicole.

2.2.19 Studio di rilascio di doxorubicina da liposomi acido sensibili in condizioni sink

Liposomi acido sensibili stabilizzati contenenti stearoil-PEG-poli(SDM) 6% e PEG-DSPE 0.25% alla concentrazione di 5mg/ml sono stati caricati con doxorubicina come riportato nel capitolo 2.2.18. 1500 μ L di soluzione liposomiale sono stati posti in membrana da dialisi con limite di esclusione di 14000 Da e immersa in 40mL di tampone fosfato 10 mM pH 7.4. Altri 1500 μ L sono stati prelevati e il pH è stato corretto a 6.5. 1400 μ L sono stati posti nello stesso tipo di membrana e immersa in tampone fosfato 10 mM pH 6.5. Lo studio è stato condotto a 37°C.

A tempi prestabiliti il tampone è stato completamente sostituito con la medesima quantità di tampone fresco. Il tampone è stato analizzato tal quale al fluorimetro per la determinazione di doxorubicina secondo la metodica riportata.

2.2.20 Caratterizzazione biologica in vitro

2.2.20.1 Coltivazione di cellule tumorali MCF-7

Le cellule tumorali sono state mantenute in coltura, secondo le modalità previste per le colture in adesione, in terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotico e antimicotico e contenete il 10 % di siero bovino fetale (FBS) scomplementato. Sono state mantenute in incubatore 37° C e 5 % di CO₂. Per lo splitting, in seguito alla rimozione del terreno, le cellule sono state dapprima lavate con tampone PBS Ca/Mg free e staccate con una soluzione 1x di tripsina in PBS Ca/Mg free.

2.2.20.2 Studio di citotossicità *in vitro* di liposomi acido sensibile stearoil-PEG-poli(SDM)

Cellule MCF-7 in terreno RPMI e 10 % di siero bovino fetale (FBS) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (1.2×10^4 cellule per pozzetto). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore. Il terreno è stato successivamente rimosso e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 µL di RPMI a pH 7.4 o 6.5 contenenti una dispersione di liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poly(SDM) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% mol/mol a concentrazioni scalari. Le cellule sono state incubate per 12 ore a 37 °C. Trascorso il tempo di contatto previsto, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 20 µL di una soluzione 5 mg/mL in PBS di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 4 ore. Il terreno è stato quindi rimosso e a ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 µL di DMSO e la piastra è stata

mantenuta in agitazione fino a completa dissoluzione dei cristalli. La percentuale di vitalità cellulare è stata determinata misurando l'assorbanza dei campioni a 570 nm attraverso sistema Microplate Autoreader. L'esperimento è stato condotto secondo la stessa metodica anche per liposomi funzionalizzati e stearyl-PEG-OH (Brij-700[®]) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% come riferimento.

2.2.20.3 Studio di uptake di liposomi su linea cellulare MCF-7

Sono state seminate 5×10^5 cellule MCF-7 per pozzetto in piastre da 12 pozzetti in terreno RPMI addizionato del 10 % di siero bovino fetale. Le piastre sono state incubate a 37 °C e 5% CO₂ per 24 ore. Il terreno è stato quindi rimosso, le cellule sono state lavate con PBS e incubate con una sospensione di liposomi funzionalizzati stearyl-PEG-(poly)SDM al 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% e stearyl-PEG-OH (Brij-700[®]) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% mol/mol marcati con fluoresceina difosfatidiletanolamina (FITC-DSPE) all'1 % mol/mol e preparati secondo metodica riportata con terreno RPMI contenente 10 mM di fosfato a pH 7.4 e 6.5. e incubate a 37 °C.

Dopo intervalli prefissati le cellule sono state lavate con PBS pH 7.4 e lisate con soluzione di Triton X-100 0.1% v/v per mL per pozzetto. I lisati cellulari sono stati sonicati per 20-30 minuti e analizzati mediante spettrofluorimetria alla lunghezza d'onda di eccitazione di 494 nm e recuperando la fluorescenza associata alla fluoresceina a 525 nm. L'intensità di fluorescenza per ciascun campione è stata normalizzata per il numero di cellule presenti in soluzione sulla base di una retta di taratura eseguita mediante *BCA test protein assay* (vedi paragrafo 2.2.4).

2.2.20.4 Studio citofluorimetrico su cellule MCF-7 incubate con liposomi acido sensibili

Cellule MCF-7 in terreno RPMI e 10% di siero bovino fetale (FBS) sono state seminate in piastre da 12 pozzetti (5×10^5 cellule per pozzetto). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore. Il terreno è stato successivamente rimosso e i pozzetti lavati con PBS sterile. A ogni pozzetto è stato aggiunto 1 mL di RPMI a pH 7.4 o 6.5 contenente 1mg/ml di liposomi formulati con stearoil-PEG-poly(SDM) 6% mol/mol o stearoil-PEG-OH (Brij-700[®]) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% mol/mol. Le cellule sono state incubate per 2 ore a 37 °C. Il terreno è stato quindi rimosso e rimpiazzato con 2 mL di PBS a pH 7.4 e le cellule sono state staccate per trattamento con tripsina. La sospensione cellulare è stata trasferita in eppendorf e centrifugata a 1000 rpm per 4 minuti. Il pellet è stato quindi lavato con PBS (pH 7.4) e risospeso in 300 µL di soluzione di paraformaldeide all'1 % p/v. I campioni cellulari sono stati quindi analizzati mediante citofluorimetro FACScalibur. Sono state analizzate 10000 cellule per ciascun campione.

2.2.20.5 Studio di microscopia confocale

L'analisi al microscopio confocale è stata eseguita su cellule MCF-7 fatte crescere su BD Falcon[™] *chamber slides* da 4 pozzetti. Sono state seminate 1×10^5 cellule per pozzetto in terreno RPMI addizionato del 10 % di siero bovino fetale (FBS) e incubate a 37 °C per 24 ore. Il terreno è stato quindi rimosso e a ogni pozzetto è stato aggiunto 1 mL di sospensione liposomiale di stearoil-PEG-poly(SDM) 6% mol/mol o stearoil-

PEG-OH (Brij-700[®]) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% mol/mol marcate con fluoresceina-DSPE (1 % p/p) in RPMI a pH 7.4 o 6.5. I campioni sono stati incubati per 2 ore a 37 °C. Il terreno è stato quindi rimosso, i pozzetti sono stati lavati delicatamente con PBS a pH 7.4 e aggiunti di 200 µL di soluzione di rodamina-DHPE 5µg/mL in PBS e incubati a temperatura ambiente per 10 minuti. La soluzione è stata quindi rimossa e le cellule sono state fissate per trattamento con 500 µL per pozzetto di soluzione di paraformaldeide all'1 % p/v in PBS per trenta minuti a 4 °C. Dopo rimozione della paraformaldeide, le cellule sono state delicatamente lavate con PBS e aggiunte di 200 µL di Hoechst 33324 0.2µg/mL in acqua. Dopo 15 minuti d'incubazione a temperatura ambiente la soluzione è stata rimossa e le camerette sono state smontate e coperte con appositi vetrini fissati mediante Vectashield mounting medium. I campioni sono stati esaminati con microscopio confocale a un ingrandimento di 63 x.

2.2.20.6 Studio di biodistribuzione in vivo

Sono stati usati 4 topi BALB/c femmina infettati con tumore colon-retto del tipo CT-26. Il tumore è stato impiantato mediante iniezione sottocutanea di 1×10^6 cellule e l'esperimento è stato condotto al 12° giorno dall'iniezione previa misurazione del volume della massa tumorale. I liposomi sono stati preparati secondo la metodica riportata nel paragrafo 2.2.10 in tampone fosfato 10 mM, 5% glucosio a pH 7.5 alla concentrazione di 10 mg/mL. Sono state preparate le seguenti formulazioni:

- **A0:** liposomi nudi (EPC/CHOL 1:0.5)
- **A1:** liposomi pegylati non acido sensibili al 6.25% (EPC/CHOL/PEG-DSPE)
- **A2:** liposomi acido sensibili al 6% (EPC/CHOL/PEGSDM)

- **A3:** liposomi acido sensibili al 6% stabilizzati con PEG-DSPE 0.25% (EPC/CHOL/PEGSDM/PEG-DSPE)

Per ogni formulazione è stato preparato un volume pari a 600 μ L. Ogni campione è stato marcato mediante aggiunta di 4.8 μ L di una soluzione 10 mg/mL di 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine Iodide (Invitrogen) in metanolo per ottenere una concentrazione finale pari al 0.1 % mol/mol. I campioni sono stati mantenuti al riparo dalla luce. 200 μ L di sospensione liposomiale sono stati quindi iniettati per via retro-orbitale nei topi previamente anestetizzati con isoflurano. I topi sono stati quindi analizzati a intervalli di tempo prestabiliti mediante Caliper Xenogen IVIS 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA). Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione utilizzate sono 745 nm e 800 nm rispettivamente

3-RISULTATI

3.1 Sintesi dell'unimero stearoil-PEG-(poli)SDM

3.1.1 Sintesi di sulfadimetossina metacrilata

La sulfadimetossina metacrilata è stata preparata a partire da sulfadimetossina commerciale secondo un protocollo riportato in letteratura (Naa K et al, 2004), con alcune modifiche. Il gruppo metacrilico coniugato alla sulfadimetossina è stato inserito per ottenere un monomero che consente la polimerizzazione AGET-ATRP.

Il derivato metacrilico è stato ottenuto tramite reazione di amidazione al gruppo anilino disponibile della sulfadimetossina con liberazione di HCl. La reazione è altamente esotermica e per tale motivo è stato necessario condurre la modifica in bagno di ghiaccio per prevenire eventuali reazioni di carbonatazione. La sulfadimetossina metacrilata risultante dalla reazione è poco solubile nell'ambiente di reazione (pH acido) ed è stato quindi possibile separarla per semplice filtrazione della miscela. Il prodotto è stato lavato con acqua milliQ, in modo tale da eliminare l'NaCl prodotto durante la reazione e successivamente liofilizzato. La resa molare è risultata essere del 91 %.

Gli spettri IR (KBr) della sulfadimetossina di partenza e del prodotto finale riportati in Figura 30 e 31 mostrano le differenze degli stretching peculiari delle due molecole.

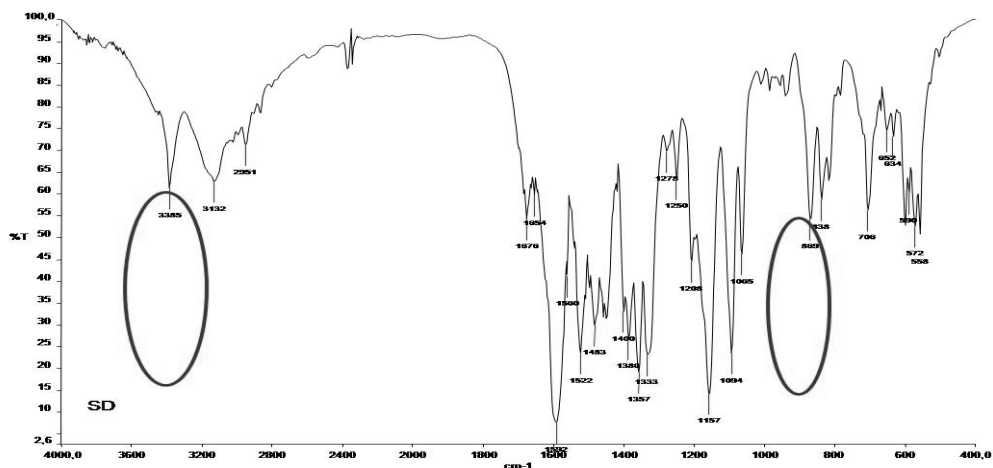


Figura 30: Spettro IR di sulfadimetossina

Lo spettro IR di Figura 30 mostra la presenza delle bande caratteristiche tra 3400 e 3350 cm^{-1} che corrispondono ai segnali dello *stretching* del C=O dell'ammide derivante dalla modifica con il gruppo metacriloil e assenti nello spettro IR del reagente di partenza riportato in Figura 31, e tra 880 e 860 cm^{-1} corrispondenti ai segnali dello *stretching* del gruppo metacrilico.

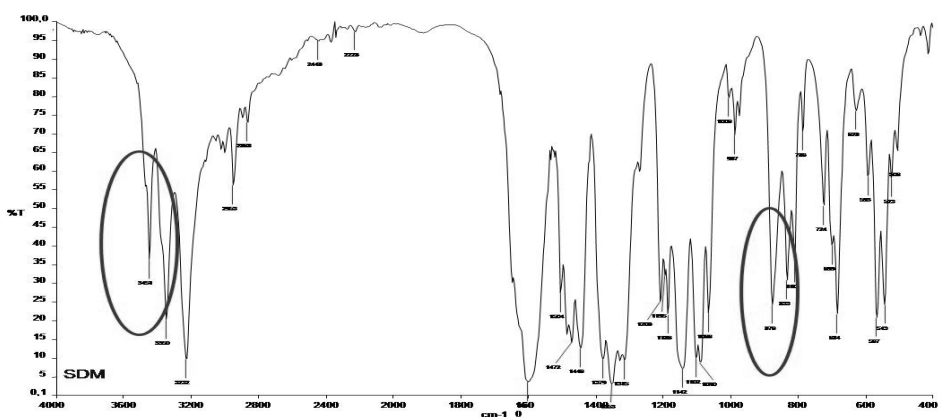


Figura 31: Spettro IR di sulfadimetossina metacrilata

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ di sulfadimetossina metacrilato eseguito in DMSO-d_6 riportato in Figura 32 sono visibili i segnali caratteristici di questo prodotto: ppm 11.51

s [1H, -SO₂NHC-], ppm 10.17 s [1H, -CONHC-], ppm 7.88 *broad s* [4H, -**H** aromatici-], ppm 5.94 s [1H, -**CH**- anello eterociclico], ppm 5.84 *broad s* [1H, -C**HH**], ppm 5.58 *broad s* [1H, -C**HH**], ppm 3.79 s [3H, -O**CH**₃], ppm 3.76 s [3H, -O**CH**₃], ppm 1.94 m [3H, **H**₃CCCO-]. Gli inserti mostrano l'espansione dello spettro nell'intervallo ppm 12-10 e ppm 6.5-5.5.

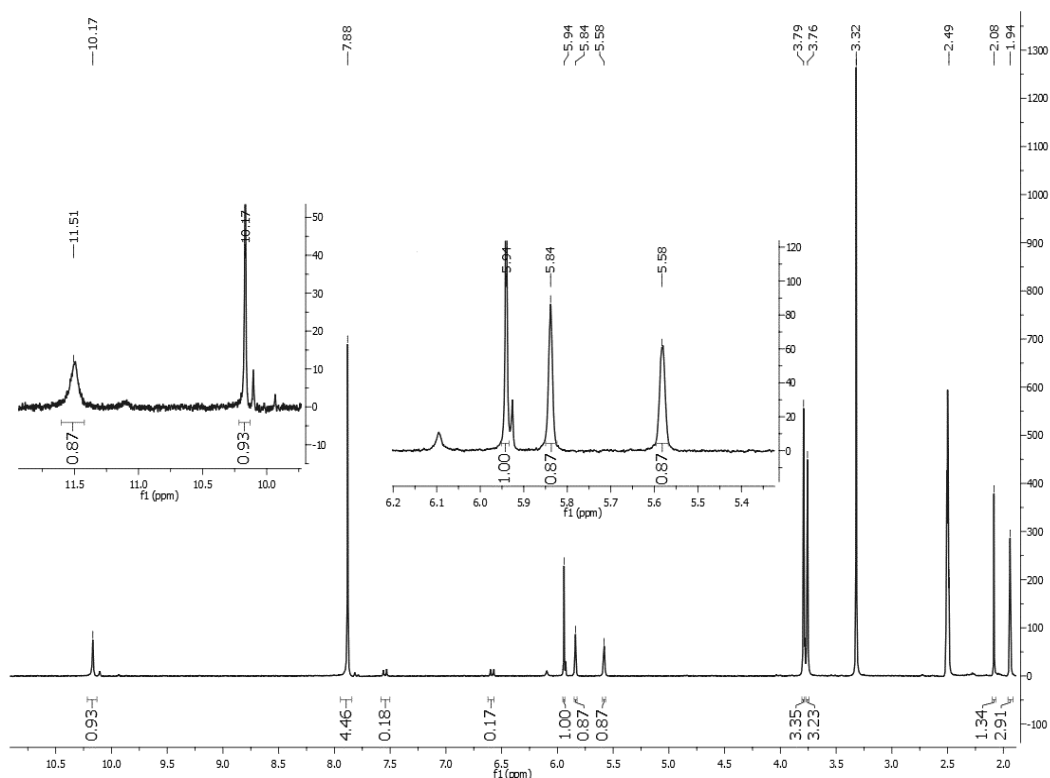


Figura 32 : spettro H¹-NMR di sulfadimetossina metacrilato in DMSO-d₆.

Lo spettro di massa ESI-TOF di sulfadimetossina metacrilato riportato in Figura 33 mostra i segnali m/z a 379.13 (M+H)¹⁺, 186.97 (M+2H)²⁺ e 401.12 (M+Na) che corrispondono allo ione monoprotonato, diprotonato e sodico rispettivamente e che confermano per il prodotto ottenuto la massa attesa di 378.10 Da.

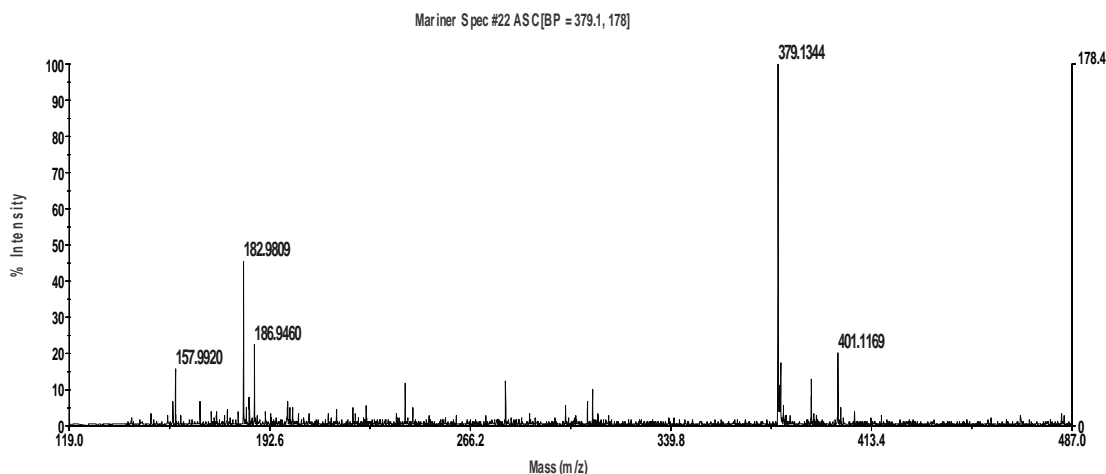


Figura 33 : spettro di massa ESI-TOF di sulfadimetossina metacrilato

3.1.2 Sintesi del coniugato stearoil-PEG-NH₂

Il polimero anfifilico stearoil-PEG-NH₂ è stato ottenuto mediante una procedura a tre step:

PEG-diammino è stato fatto reagire in ambiente anidro con stearoil cloruro utilizzando un rapporto molare di 1:1 in modo che solo uno dei due gruppi amminici fosse funzionalizzato con la catena alchilica. Lo stearoil cloruro è un alogenuro acilico altamente reattivo con l'acqua. Per questo motivo la reazione viene condotta in ambiente anidro onde evitare la disattivazione del cloruro.

Il prodotto stearoil-PEG-NH₂ è stato purificato per precipitazione in etere in cui eventuali tracce di stearoil cloruro che non ha reagito risultano solubili. La precipitazione in etere ha consentito di recuperare il 93 % del materiale (p/p). Nello spettro ¹H-NMR eseguito in DMSO-d₆ riportato in Figura 34 sono visibili i segnali caratteristici di stearoil-PEG-NH₂: ppm 7.82 t [1H, -CONHC-], ppm 7.45 s [2H, -NH₂-], ppm 3.5 *broad s* [300H, -(OCH₂CH₂)_n-], ppm 2.03 t [2H, -NHCOCH₂], ppm 1.45

broad s [2H, -NHCOCH₂CH₂-], ppm 1.23 *s* [28H, -CH₂- catena alchilica], ppm 0.89 *s* [3H, -CH₃].

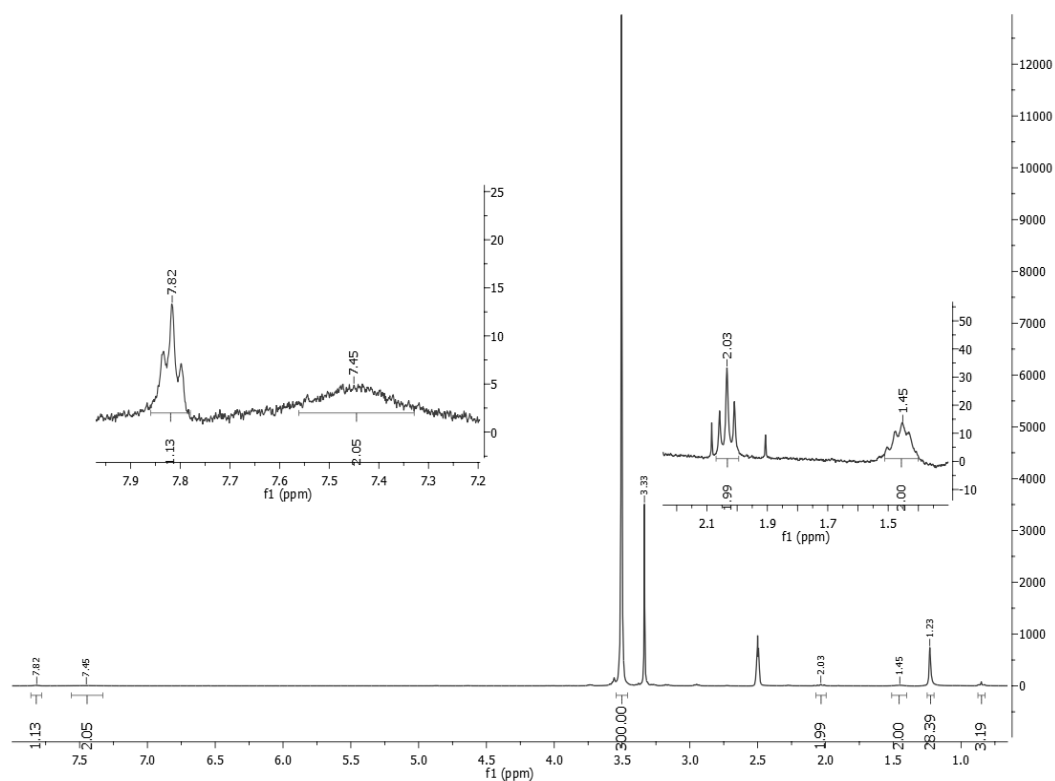


Figura 34: spettro H¹-NMR di stearoil-PEG-NH₂ in DMSO-d₆

Il saggio di Snyder, eseguito per la determinazione dei gruppi amminici primari del PEG, ha dimostrato che il 49% del polimero risulta coniugato con la catena alchilica dell'acido stearico e che quindi il rapporto stearioile/PEG è di 1:1 mentre viene mantenuto il secondo gruppo amminico disponibile per il successivo step di reazione.

3.1.3 Sintesi di stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH₃)₂-Br

L'unimero stearoil-PEG-NH₂ è stato acilato al gruppo amminico libero. A tale scopo stearoil-PEG-NH₂ è stato fatto reagire con 2-bromoisobutirrilbromuro che, in ambiente

anidro, reagisce sul gruppo amminico libero del PEG con eliminazione di un atomo di bromo e formazione di un legame ammidico. Il 2-bromoisobutirrilbromuro è estremamente reattivo ed instabile in presenza di acqua. Per questo motivo lo stearoil-PEG-NH₂ derivante dal primo step di sintesi è stato sciolto in toluene e mantenuto a riflusso per eliminare ogni traccia di umidità residua prima di procedere con la coniugazione riportata in questo capitolo.

Il prodotto stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH₃)₂-Br è stato purificato per precipitazione in etere ottenendo una resa del 97 % p/p . Nello spettro ¹H-NMR eseguito in CDCl₃ riportato in Figura 35 sono visibili i segnali caratteristici di stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH₃)₂-Br: ppm 3.65 s [300H, -(OCH₂CH₂)_n-], ppm 1.96 s [6H, -C(CH₃)₂Br], ppm 1.25 s [28H, -CH₂- catena alchilica], ppm 0.88 s [3H, -CH₃].

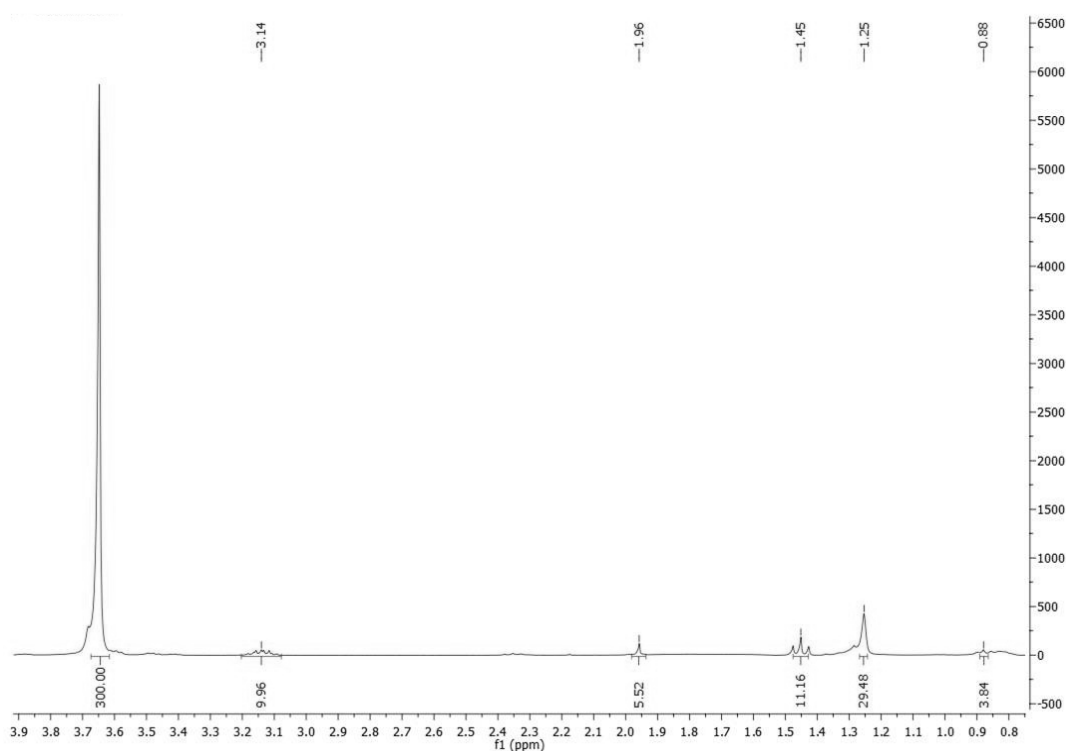


Figura 35: spettro H¹-NMR di stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH₃)₂-Br in CDCl₃

Sul prodotto stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH₃)₂-Br è stato eseguito il saggio di Snyder per verificare la resa di modifica che è risultata del 98% dei gruppi amminici del PEG. Pertanto ogni catena di PEG è risultata essere funzionalizzata con un gruppo isobutirrilbromuro.

3.1.4 Polimerizzazione radicalica AGET-ATRP di sulfadimetossina metacrilata su stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH₃)₂-Br

Tenuto conto della buona solubilità della sulfadimetossina-metacrilato in ambiente basico, la reazione di ATRP è stata condotta in NaOH 150 mM che garantisce una completa dissoluzione del monomero (Matyjaszewski K et al, 2001). I reagenti impiegati per la polimerizzazione sono presenti secondo i rapporti molari 1:18:1:1:0.08 di stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH₃)₂-Br/SDM/CuCl₂/TPMA/acido ascorbico. L'unimero ottenuto dalla polimerizzazione è stato purificato mediante cromatografia per esclusione. Le caratteristiche della resina scelta hanno permesso di frazionare l'unimero dalla sulfadimetossina-metacrilato che non ha reagito e dal complesso metallico Cu⁺/TPMA, entrambi aventi basso peso molecolare rispetto al polimero. Lo spettro ¹H-NMR eseguito in DMSO-d₆ riportato in Figura 36 ha evidenziato i seguenti segnali significativi del derivato stearoil-PEG-(poli)SDM ppm 6.00 s [11H, -CH- anello piridinico], ppm 3.50 s [300H, -(OCH₂CH₂)_n-], ppm 1.23 s [28H, -CH₂- catena alchilica], ppm 0.85 s [3H, -CH₃].

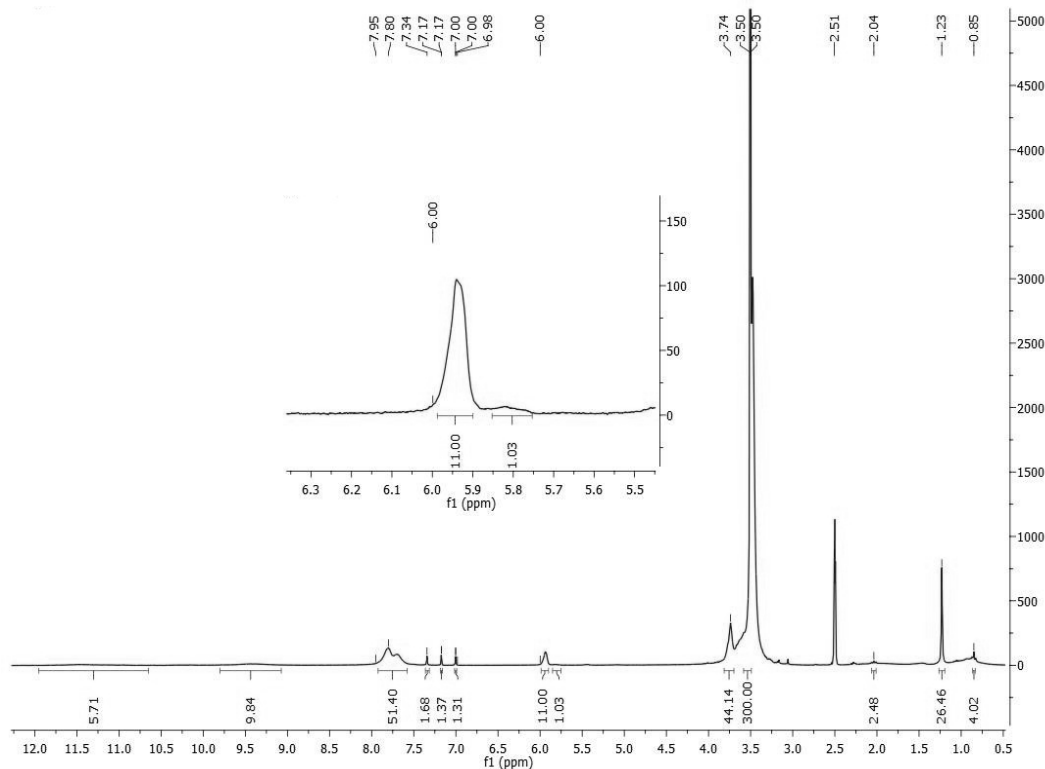


Figura 36: spettro H^1 NMR di stearyl-PEG-(poli)SDM in $DMSO-d_6$

Il segnale relativo al protone dell'anello pirimidinico è stato preso come riferimento nella determinazione del grado di funzionalizzazione del polimero stearyl-PEG-Br con SDM rispetto al segnale dei protoni metilenici del PEG. Gli integrali dei segnali mostrano che la catena polimerica di sulfadimetossina è costituita da 11 monomeri.

3.2 Analisi turbidimetrica e determinazione pH di aggregazione di stearyl-PEG-(poli)SDM.

Studi precedenti hanno dimostrato che l'unimero stearyl-PEG-(poli)SDM è in grado di associare in strutture micellari a pH fisiologico. Le micelle hanno mostrato una dimensione di 13 nm (Ravazzolo E., Salmaso S. 2012). Al fine di valutare i cambiamenti morfologici del materiale al diminuire del pH, la soluzione micellare è

stata sottoposta ad uno studio turbidimetrico. L'aggregazione pH-indotta dell'unimero stearoil-PEG-poli(SDM) in soluzione acquosa evidenzia un cambiamento pH dipendente dello stato fisico del coniugato. Il profilo turbidimetrico riportato in Figura 37 mostra le variazioni di diffrazione a 500 nm della dispersione dell'unimero in funzione della variazione di pH. Questi dati confermano che in seguito a diminuzione del pH i monomeri di sulfadimetossina vengono protonati, perdono la loro carica negativa ed acquisiscono una maggiore idrofobicità con conseguente de-solvatazione e aggregazione macroscopica del materiale fino a precipitazione.

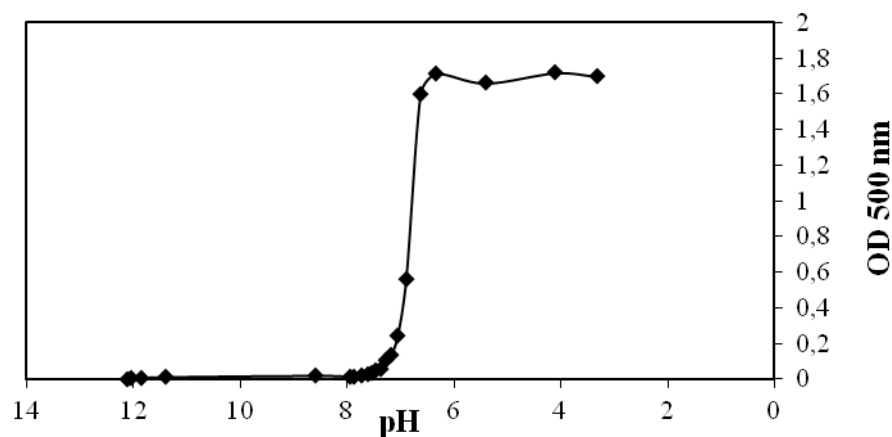


Figura 37: determinazione del punto di aggregazione di stearoil-PEG(poli)SDM

Dal profilo turbidimetrico riportato in Figura 37 si evince un brusco incremento turbidimetrico dello stato di aggregazione a pH 7.0. A pH 7.4 invece la soluzione risulta perfettamente limpida.

3.3 Studio di stabilità di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM)

Al fine di mettere a punto le condizioni ottimali di preparazione dei liposomi acido sensibili caricati con doxorubicina, è stato condotto uno studio preliminare in cui liposomi sono stati preparati utilizzando diversi tamponi per la re-idratazione ed è stato quindi valutato il profilo dimensionale mediante analisi di Dynamic Light Scattering (DLS) per determinarne la stabilità.

I risultati riportati in Figura 38 mostrano che i tamponi adatti a formulare liposomi stabili sono i tamponi fosfato 10 mM e 20 mM, i quali permettono di ottenere vescicole monodisperse rispettivamente di dimensioni di 192 nm (PI 0.220) e 254 nm (PI 0.235). Tuttavia il tampone ammonio solfato 250 mM pH 8, necessario al caricamento del farmaco doxorubicina, non è risultato adatto alla preparazione di tale formulazione in quanto si ottenevano delle sospensioni colloidali estremamente instabili che portavano alla formazione di macroaggregati in tempi molto brevi.

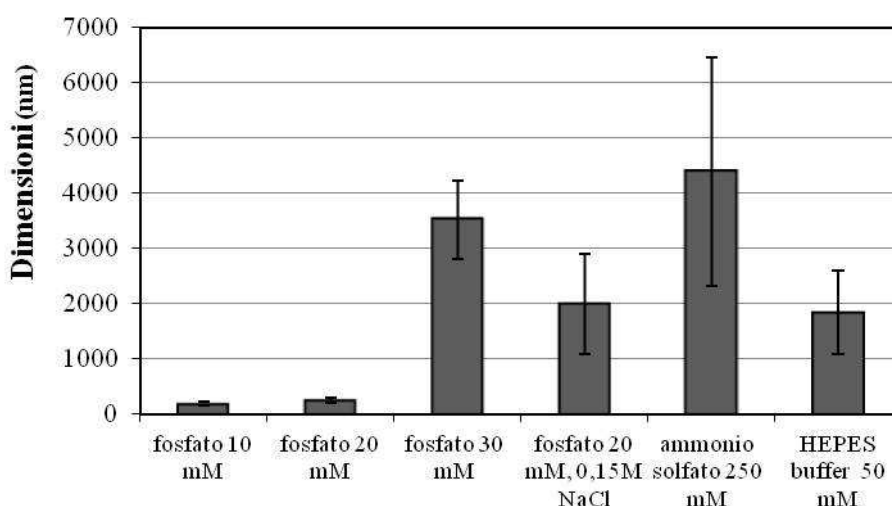


Figura 38: profilo di stabilità di liposomi acido sensibili stearoil-PEG-poli(SDM) al 3% mol/mol in diversi tamponi

Poiché l'impiego di un sale di ammonio è un requisito essenziale per il caricamento di doxorubicina, è stato condotto uno studio per valutare la possibilità di formulare liposomi stabili intamponi a base di ioni ammonio. I risultati riportati in Figura 38 e 39 mostrano che il tampone ammonio fosfato 10 mM è risultato essere il tampone adeguato alla preparazione di liposomi acido sensibili aventi buone caratteristiche di stabilità in vitro..

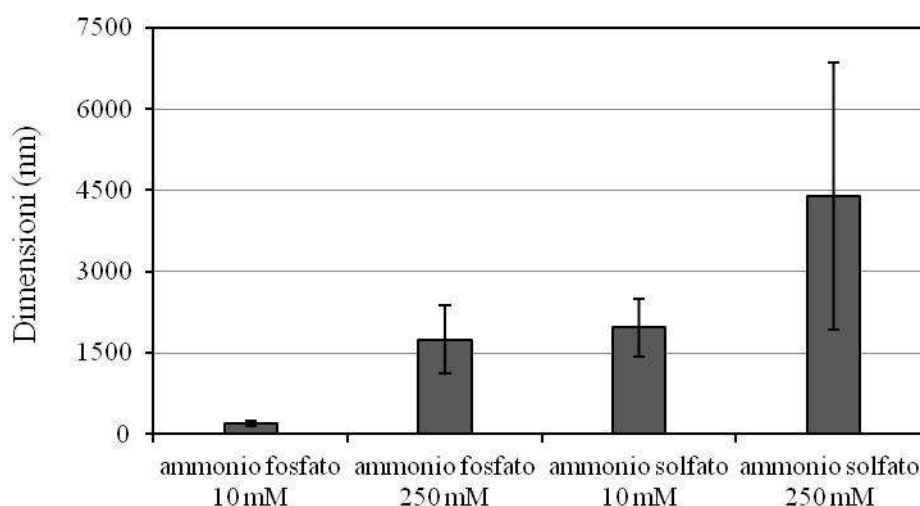


Figura 39: profilo di stabilità di liposomi acido sensibili stearoil-PEG-poli(SDM) 3% mol/mol in tamponi a base di ioni ammonio.

Il profilo di stabilità riportato in Figura 40 dei liposomi ottenuti in tampone ammonio fosfato 10 mM pH 8.0 mostrano che queste vescicole sono stabili per almeno 3 ore mentre poi tendono a formare strutture di dimensioni maggiori come conseguenza di processi di aggregazione.

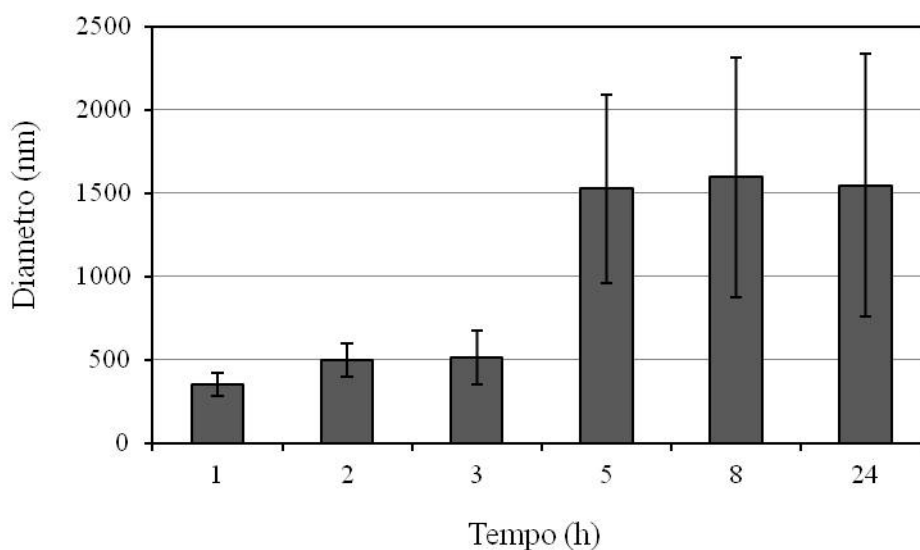


Figura 40: cinetica di stabilità di liposomi acido sensibili stearoil-PEG-poli(SDM) 3% mol/mol in tampone ammonio fosfato 10 mM pH 8.

3.4 Studio di stabilità di liposomi acido sensibili in presenza di concentrazioni variabili di PEG_{5000 Da}-DSPE.

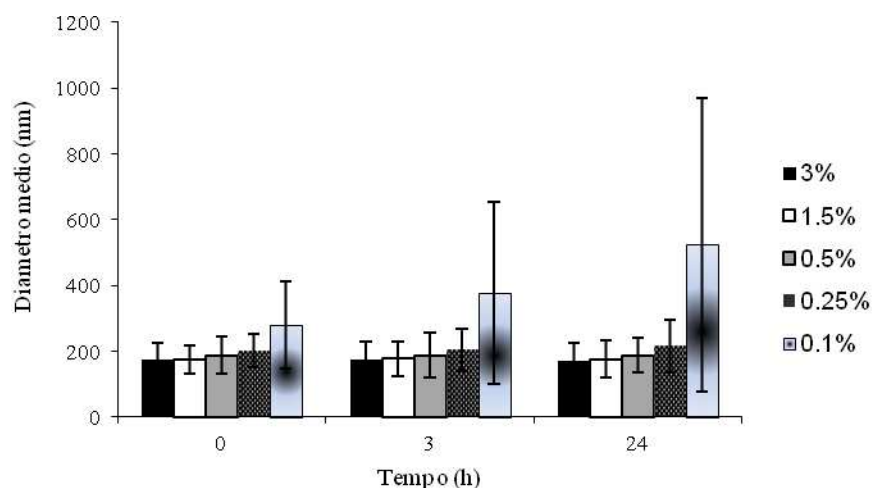
Con lo scopo di migliorare la stabilità di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) nel tampone ammonio fosfato 10 mM, è stato eseguito uno studio di preparazione di liposomi contenenti PEG-DSPE ed è stata analizzata la variazione della dimensione delle vescicole nel tempo. Questo studio è stato condotto al fine di stabilire la composizione ottimale dei liposomi ed in particolare il contenuto di PEG_{5000 KDa}-DSPE tale da garantire un buon compromesso tra la stabilità fisica del sistema e acido responsività. Lo studio è stato condotto a pH 7.4 e 6.5 per simulare rispettivamente il pH del plasma e quello del comparto interstiziale del tumore.

I risultati riportati in Figura 41 mostrano che in tampone a pH 7.4 i liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) alla concentrazione del 6% mol/mol e contenenti concentrazioni maggiori dello 0.25% mol/mol di PEG-DSPE mantengono

nel tempo dimensioni costanti attorno ai 200 nm mentre, diminuendo la concentrazione di PEG-DSPE allo 0.1% mol/mol, le dimensioni delle vescicole aumentano sensibilmente da 216 nm a 524 nm. Le formulazioni al 3% ,1,5% e 0,5% in ambiente acido a pH 6.5 (Figura 41B) non mostrano una significativa variazione dimensionale pH dipendente mentre la formulazione allo 0,25% mol/mol evidenzia un progressivo aumento delle dimensioni delle vescicole che passano da 200 nm a 535 nm in 24 ore. A pH 6.5, la formulazione allo 0,1% non è stata considerata in quanto da origine alla formazione di aggregati già a pH fisiologico e pertanto risulta inutile ai fini del progetto.

Questi dati indicano innanzitutto che il polimero commerciale PEG-DSPE introdotto nella formulazione esercita un effetto stabilizzante sulla struttura vescicolare dipendente dalla concentrazione. perché Questo è probabilmente dovuto al fatto che il polimero è in grado di conferire proprietà *stealth*. al sistema colloidale.

A)



B)

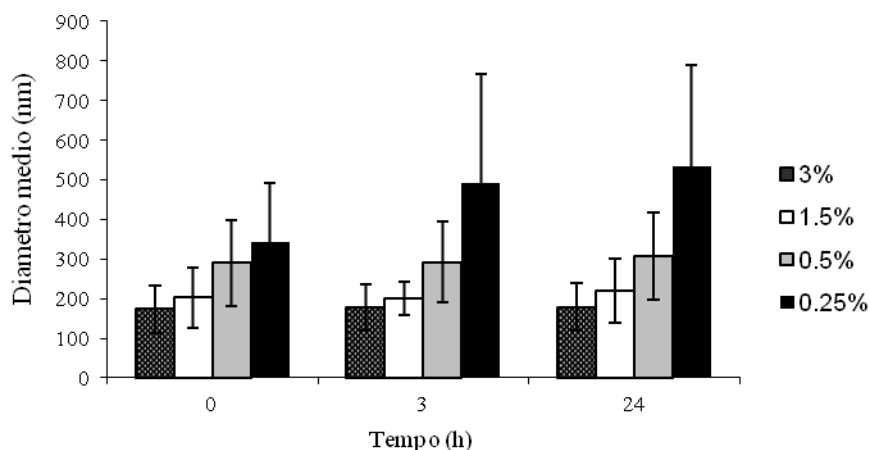


Figura 41: cinetica di aggregazione di liposomi funzionalizzati stearoil-PEG-poli(SDM) in presenza di concentrazioni crescenti di PEG-DSPE a pH 7.4 (Panel A) e 6.5 (Panel B)

I risultati ottenuti mostrano che la formulazione contenente 6% mol/mol di stearoil-PEG-poli(SDM) e 0,25% di funzionalizzazione con PEG₅₀₀₀ kDa-DSPE possiede le caratteristiche ottimali per disporre di vescicole stabili a pH fisiologico ma in grado di rispondere alle variazioni di pH tipiche dei tessuti tumorali.

La suddetta formulazione è stata quindi selezionata per proseguire nelle successive fasi dello studio.

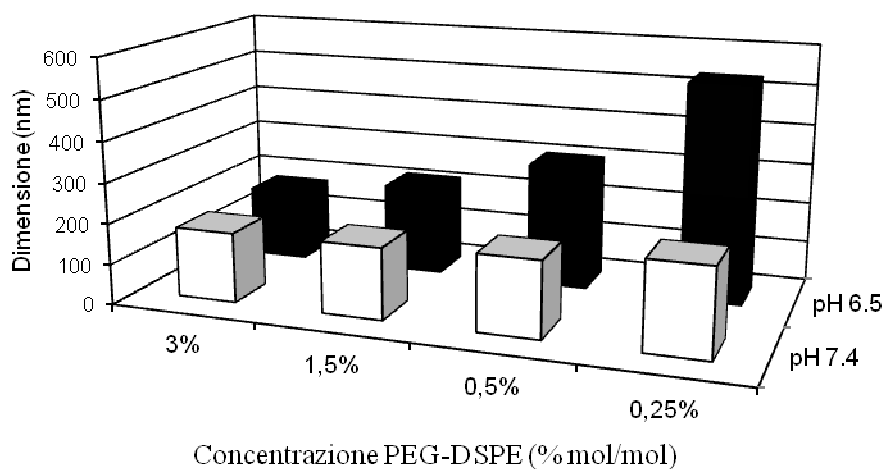


Figura 42: istogramma di confronto della dimensione media alle 24 ore delle preparazioni liposomiali alle diverse concentrazioni di PEG-DSPE in tampone ammonio fosfato 10mM a pH 8 (□) e pH 6.5 (■).

3.5 Cinetica di aggregazione di liposomi acido sensibili stearoil-PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25%

Studi di analisi *laser light scattering* sono stati condotti per determinare la dimensione dei liposomi acido sensibili e la loro responsività a variazioni di pH nel tempo. La dimensione media dei liposomi e le rispettive distribuzioni dimensionali a pH 7.4, 6.5 e 6.0 registrate al tempo zero sono riassunte in Tabella 3.

pH	Diametro medio (nm)
7.4	183 ± 5.7
6.5	265 ± 102
6.0	330 ± 458

Tabella 3 : diametro medio dei liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25% a vari pH.

La Figura 43 riporta il profilo dimensionale nel tempo per i diversi valori di pH.

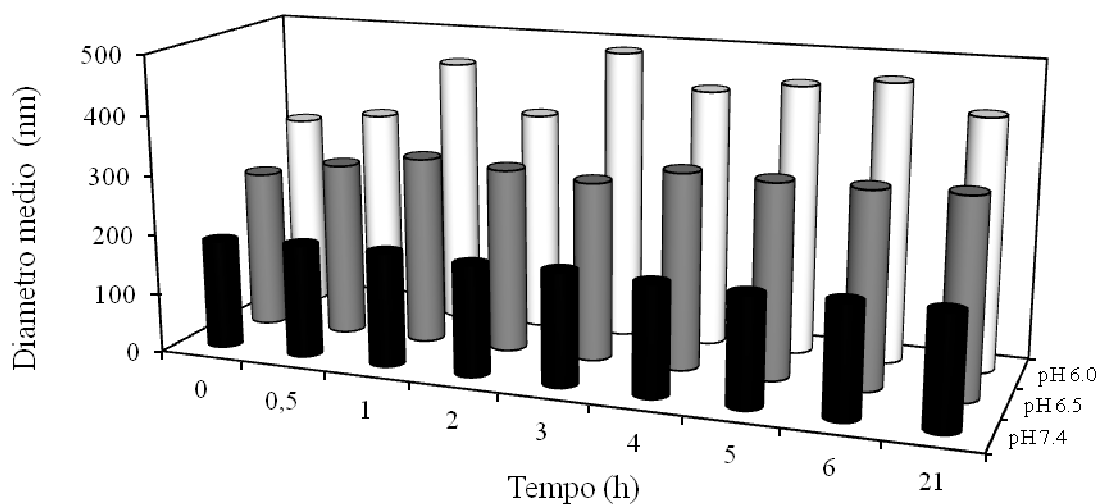


Figura 43:. Profili dimensionale nel tempo di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0,25% mol/mol a pH 6.0, 6.5 e 7.4.

La sulfadimetossina è un gruppo acido con carica negativa a pH neutro e che quindi incide sulla carica superficiale dei nanosistemi a pH tra 7.2 e 6.5. Considerando che il valore di pKa della sulfadimetossina è 6.21, a pH neutro (pH 7.2) la superficie esterna dei liposomi è principalmente ionizzata e la perdita di carica per deionizzazione per abbassamento del pH induce aggregazione. I risultati descritti in Figura 43 mostrano infatti che a pH 6.5 le dimensioni micelle dei liposomi aumentano a 265 nm e a pH 6.0 l'aumento vescicole dimensionale delle vescicole è ancora maggiore (330 nm).

3.5 Studio di stabilità in RPMI e FBS

Gli studi di stabilità dei liposomi acido sensibili, funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% mol/mol in terreno RPMI e in presenza di proteine del siero, sono stati condotti monitorando nel tempo la dimensione vescicolare mediante DLS. Le Figure 44 e 45 mostrano che questi sistemi vescicolari possiedono caratteristiche tali da conferire loro stabili una buona stabilità in entrambe le condizioni di incubazione nel periodo di tempo sperimentale. Nel caso di incubazione in terreno RPMI, i liposomi mantengono intatta la loro struttura per almeno 24 ore mentre per 14 ore in presenza di proteine del siero.

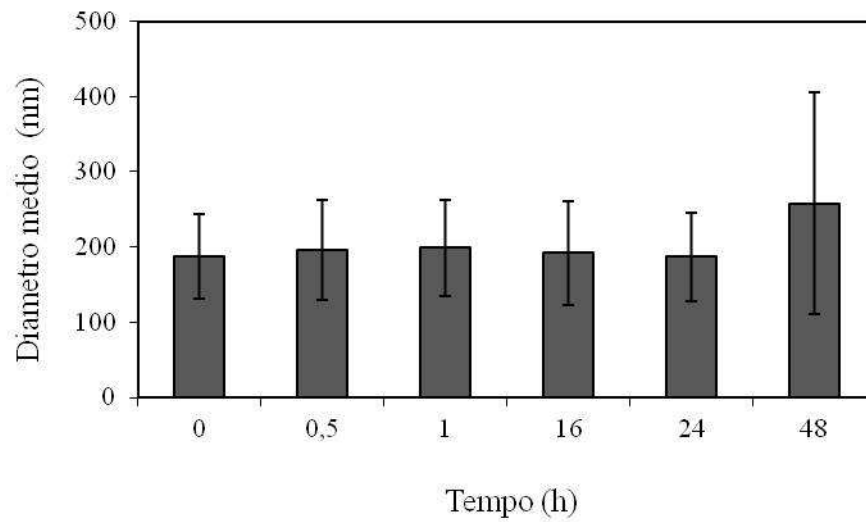


Figura 44: profilo di stabilità di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) 6% e PEG-DSPE 0.25% in terreno RPMI pH 7.4.

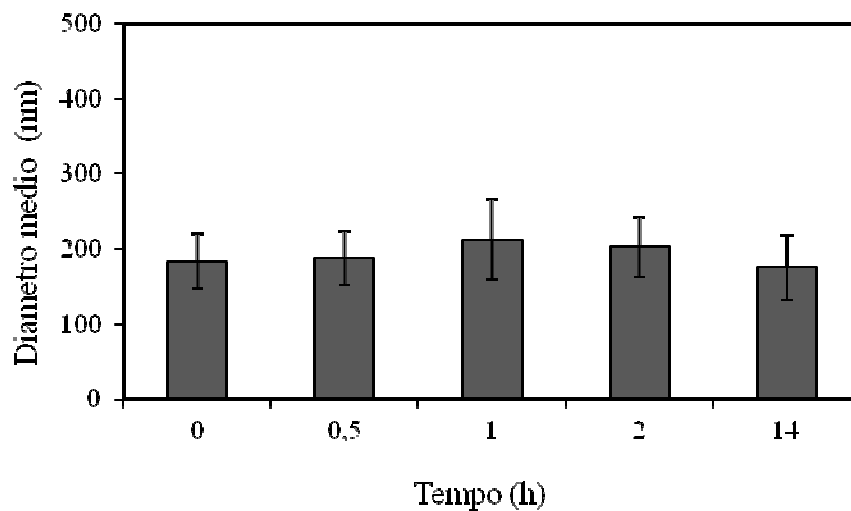


Figura 45: profilo di stabilità di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) 6% e PEG-DSPE 0.25% in tampone fosfato 10 mM pH 7.4 addizionato del 10% v/v di FBS.

3.6 Studio di permeabilità di 5(6)-carbossifluoresceina da liposomi acido sensibili

Studio di permeabilità dei liposomi pH sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) 6% mol/mol e PEG-DSPE 0.25% mol/mol è stato condotto utilizzando

carbossifluoresceina, una molecola fluorescente idrosolubile per la quale è stata valutata la capacità del sistema di mantenere inalterato il carico nel tempo. Lo studio è stato condotto anche con liposomi non acido sensibili funzionalizzati con stearoil-PEG-OH ed utilizzati come riferimento. La capacità di caricamento del fluoroforo nei liposomi in esame è stata quantificata spettrofotometricamente ed è risultata essere pari al 15% w/w. E' stata quindi determinata la quantità di 5-(6)-carbossifluoresceina rilasciata nel tempo.

Il risultato ottenuto, riportato nella Figura 46, conferma che il sistema liposomiale è in grado di mantenere pressoché inalterato il proprio carico nel tempo. Infatti, il rilascio di 5-(6)-carbossifluoresceina a pH 7.4 è del 7,3% dopo 24 ore di incubazione a 37°C per entrambe le formulazioni liposomiali . A pH 6.5 si registra invece una perdita del carico di carbossifluoresceina pari al 18,4% e 8.6% rispettivamente per liposomi acido sensibili e non acido sensibili.

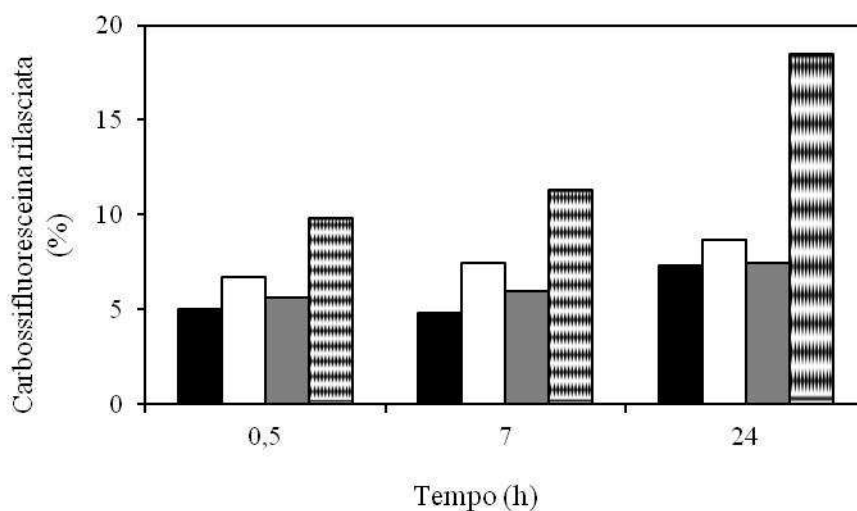


Figura 46: leakage di 5-(6)-carbossifluoresceina da liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-(poli)SDM 6%, PEG-DSPE 0.25% a pH 7.4 □ e pH 6.5 (riempimento tratteggiato) e liposomi non acido sensibili funzionalizzati con Brij-700 6%, PEG-DSPE 0.25% a pH 7.4 ■ e pH 6.5 ■.

Questi risultati mostrano che i liposomi caricati di carbossifluoresceina sono stabili nel tempo in quanto, nelle condizioni sperimentali adottate, la quantità di fluoroforo rilasciato rimane costante in tutto l'arco di tempo sperimentale.

Tuttavia, nello studio condotto in condizioni sink, la carbossifluoresceina viene rilasciata in un tempo relativamente breve ma con un profilo pH dipendente. Le cinetiche di rilascio riportate in Figura 47 mostrano che a pH 6.5 il 60% di fluoroforo incorporato nei liposomi viene rilasciato in circa 3 ore mentre il rimanente 40% viene rilasciato più lentamente raggiungendo il rilascio completo in 25 ore. A pH 7.4 il rilascio del fluoroforo invece è più lento. Circa il 45% del caricato viene rilasciato in 4 ore mentre il rimanente viene rilasciato molto lentamente. Dopo 25 ore solo il 60% di carbossifluoresceina caricata viene rilasciata.

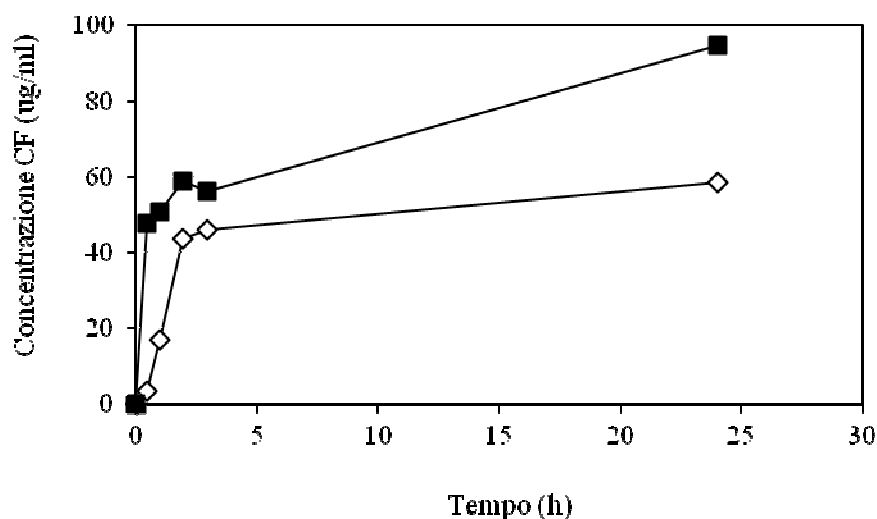


Figura 47: profili di rilascio in condizioni sink di 5-(6)-carbossifluoresceina da liposomi acido sensibili a (◇) pH 7.4; (■) pH 6.5.

3.7 Determinazione dell'efficienza di caricamento di doxorubicina in liposomi stearoil-PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0.25% mol/mol

Uno studio di caricamento di liposomi è stato condotto usando come farmaco modello la doxorubicina. I liposomi contenenti 0,25% mol/mol di PEG-DSPE. sono stati ottenuti in tampone ammonio fosfato 10 mM a pH 8 ed il caricamento con il farmaco è risultato essere pari al 32% w/w .

I profili DLS riportati in Figura 48 mostrano la distribuzione dimensionale della preparazione prima e dopo il caricamento con doxorubicina.

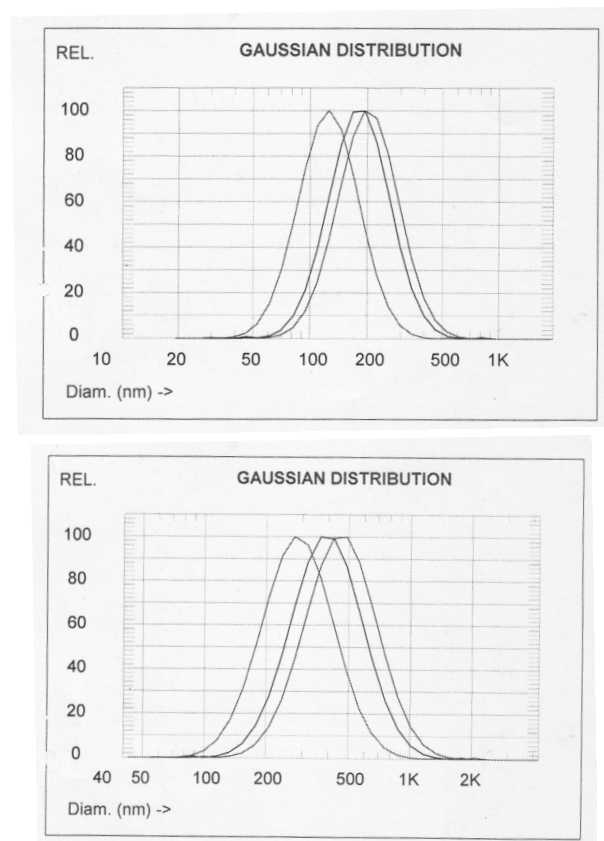


Figura 48 : curve della distribuzione dimensionale di liposomi funzionalizzati al 6% mol di stearyl-PEG-poli(SDM) e 0,25% mol di PEG-DSPE vuoti (a sinistra) e caricati con doxorubicina (a destra).

Come si può osservare dalle distribuzioni riportate in Figura 48, il caricamento con doxorubicina porta ad un aumento della dimensione dei liposomi. Infatti, i liposomi vuoti presentano dimensioni pari a 216 ± 79 nm mentre raggiungono dimensioni pari a 356 nm dopo il caricamento con il farmaco.

3.8 Studio di rilascio di doxorubicina da liposomi acido sensibili in condizioni sink

Lo studio di rilascio di doxorubicina è stato condotto a 37 °C in tampone fosfato 10 mM a pH 7.4 e 6.5.

I profili di rilascio ai due pH riportati in Figura 49 mostrano che, a pH acido, si ha un rilascio del 50 % del farmaco in circa 1 ora mentre a pH 7.4 i liposomi risultano relativamente più stabili e raggiungono la stessa percentuale di rilascio in 7 ore.

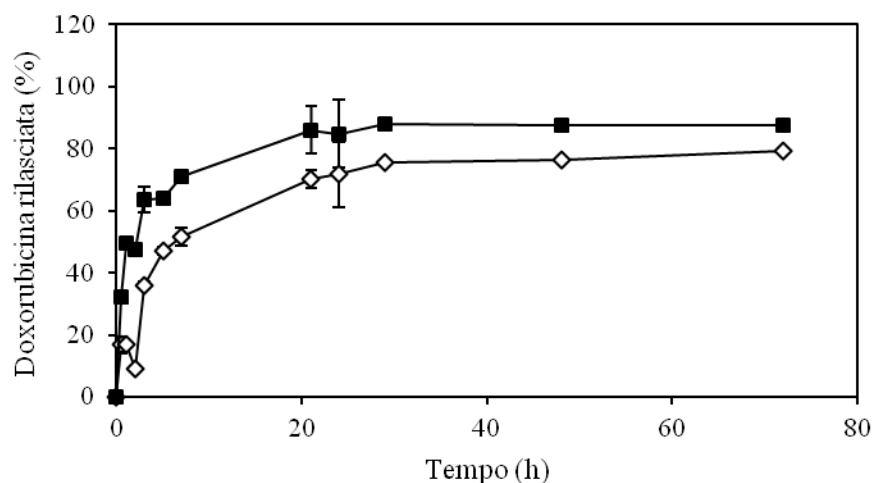


Figura 49: profili di rilascio in condizioni sink di doxorubicina da liposomi acido sensibili : (◇) pH 7.4; (■) pH 6.5.

3.9 Studio di citotossicità *in vitro* di liposomi acido sensibili

La citotossicità del sistema liposomiale in esame è stata valutata sulla linea cellulare MCF-7 del tumore mammario mediante MTT test che quantifica spettrofotometricamente i cristalli di formazano formati nelle cellule vitali a partire dal sale di tetrazolio (MTT) per attività delle deidrogenasi mitocondriali.

La tossicità è stata valutata dopo dodici ore di contatto a concentrazioni crescenti di liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) 6%, PEG-DSPE 0,25% (Figura 50) e liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-OH 6% e PEG-DSPE 0.25% come formulazione di riferimento non acido sensibile (Figura 51)

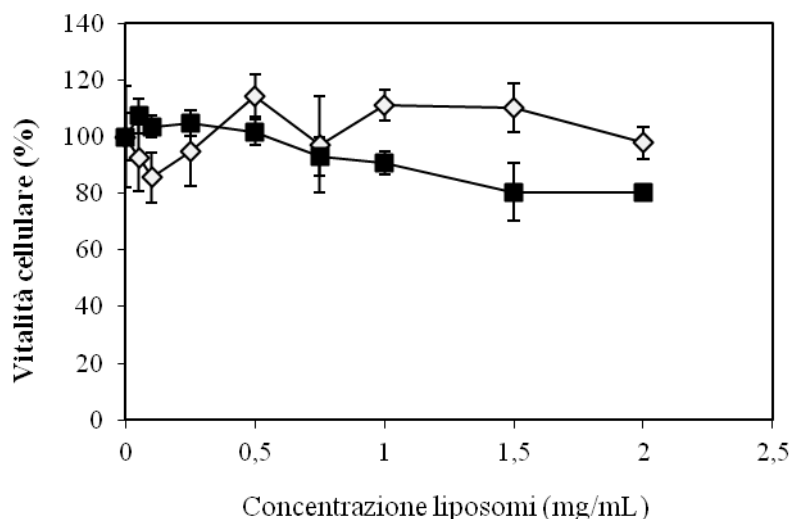


Figura 50: citotossicità di liposomi acido sensibili su linea cellulare MCF-7 mediante test MTT a pH 7.4 (◇); pH 6.5 (■).

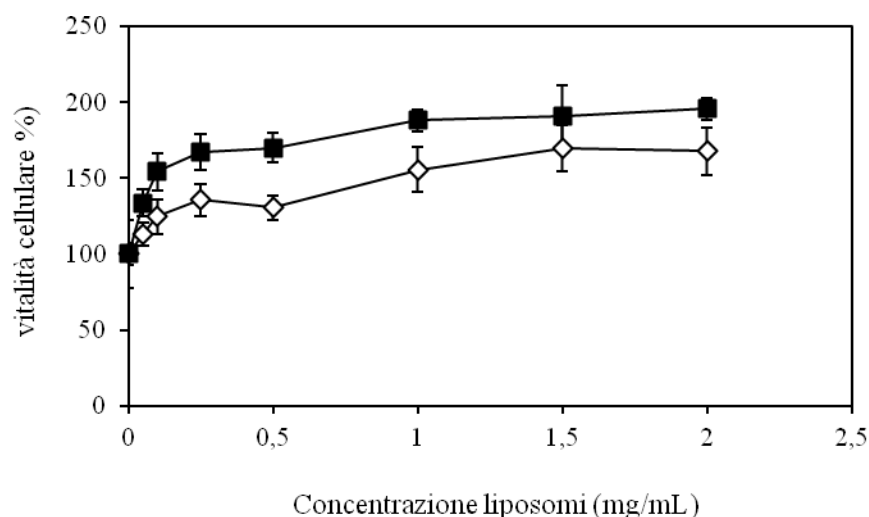


Figura 51: citotossicità di liposomi non acido sensibili di riferimento su linea cellulare MCF-7 mediante test MTT a pH 7.4 (◇);pH 6.5 (■).

I profili di citotossicità riportati in Figura 50 mostrano che i liposomi acido sensibili hanno una buona biocompatibilità a pH 7.4 in cui la vitalità cellulare è del 98% nel caso della massima concentrazione liposomiale. Nelle stesse condizioni di concentrazione a pH 6.5 la vitalità cellulare è pari al 80%, probabilmente a causa di uptake cellulare maggiore promosso dall'aggregazione pH dipendente.

I profili di citotossicità relativi ai liposomi non acido sensibili di riferimento riportati in Figura 51 mostrano che in questo caso il sistema liposomiale non esercita alcun effetto citotossico sulla linea cellulare trattata ma al contrario ne promuove la proliferazione.

3.10 Cinetica di associazione cellulare di liposomi funzionalizzati con stearyl-PEG-poli(SDM) su cellule MCF-7

Allo scopo di determinare se i liposomi acido sensibili associano con cellule tumorali a diversi pH e se l'associazione ha un profilo tempo-dipendente, cellule

tumorali MCF-7 sono state trattate per tempi definiti con i liposomi caricati con carbossifluoresceina e quindi lisate per recuperare il probe fluorescente. I risultati riportati in Figura 52 mostrano la fluorescenza relativa associata alle cellule normalizzate per milione di cellule.

La fluorescenza associata alle cellule trattate a pH 7.4 non aumenta al passare del tempo e rimane bassa se confrontata ai campioni cellulari trattati con i liposomi acido sensibili a pH 6.5. A questo pH infatti la fluorescenza associata alle cellule MCF-7 è fin dalla prima ora superiore a quella misurata a pH neutro (+ 64 %) e tende ad aumentare al passare del tempo di incubazione fino a circa 4 volte rispetto a quella misurata a pH 7.4 allo stesso intervallo di tempo.

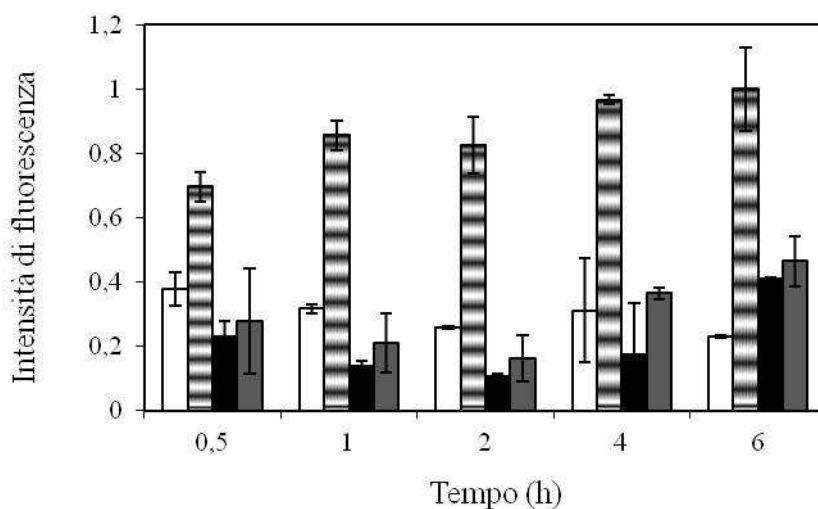


Figura 52: cinetica di associazione cellulare di liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-(poli)SDM 6%, PEG-DSPE 0.25% pH 7.4 □ e pH 6.5 (riempimento tratteggiato) e liposomi non acido sensibili funzionalizzati con Brij-700 6%, PEG-DSPE 0.25% a pH pH 7.4 ■ e pH 6.5 ■.

Lo studio è stato eseguito anche con liposomi non acido sensibili come riferimento. I dati riportati in figura 52 mostrano come l'intensità di fluorescenza relativa dei campioni sia estremamente bassa se confrontata con quella dei campioni di stearoil-PEG-(poli)SDM. Pertanto i liposomi non funzionalizzati con la molecola acido

sensibile non consentono il targeting specifico del nanocarrier e di conseguenza l'internalizzazione del sistema nella cellula. Le cellule MCF-7 sono state trattate a pH 7.4 e 6.5 con liposomi acido sensibili marcati con probe fluorescente sono state anche analizzate mediante "cell sorting". Il trattamento con liposomi è stato eseguito per due ore, tempo che consente un buon compromesso tra la vitalità cellulare ed un uptake evidente. La Figura 53 mostra i risultati dell'analisi citofluorimetrica.

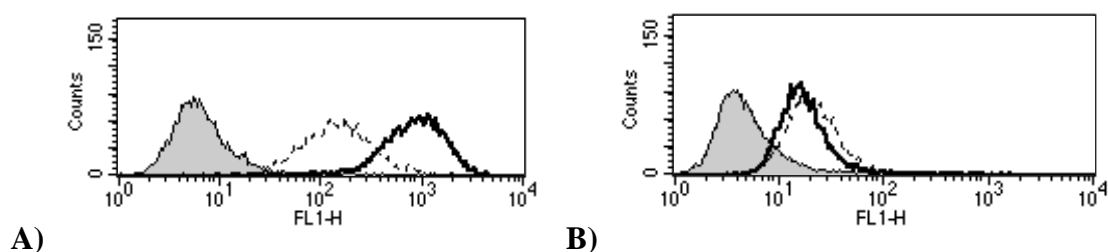


Figura 53: profili citofluorimetrici di cellule trattate con liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) (A) e con Brij-700 (B). In tratteggio il profilo ottenuto a pH 7.4 mentre in grassetto il profilo ottenuto a pH 6.5.

La Figura 53A mostra come i liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) diano un notevole incremento di fluorescenza associata alle cellule trattate a pH 6.5 rispetto a quelle trattate a pH neutro.

La Figura 53B invece riporta il profilo citofluorimetrico relativo a cellule trattate con liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-OH (Brij-700) nel quale non si notano significative differenze nell'intensità di fluorescenza ai due pH. Inoltre, in accordo con i dati riportati precedentemente, l'associazione dei liposomi con le cellule è estremamente bassa.

La Figura 54 mostra graficamente le intensità di fluorescenza media nell'analisi citofluorimetrica di cellule MCF-7 trattate con liposomi acido sensibili e liposomi di riferimento funzionalizzati con Brij-700. Come si osserva, i liposomi contenenti Brij non producono un incremento della fluorescenza cellulare ai due pH mentre nel caso dei liposomi acido sensibili si ha un incremento della fluorescenza cellulare che è significativamente maggiore quando le cellule sono incubate con i liposomi a pH 6.5. Questo risultato indica che i liposomi acido sensibili interagiscono con le cellule in modo acido-dipendente.

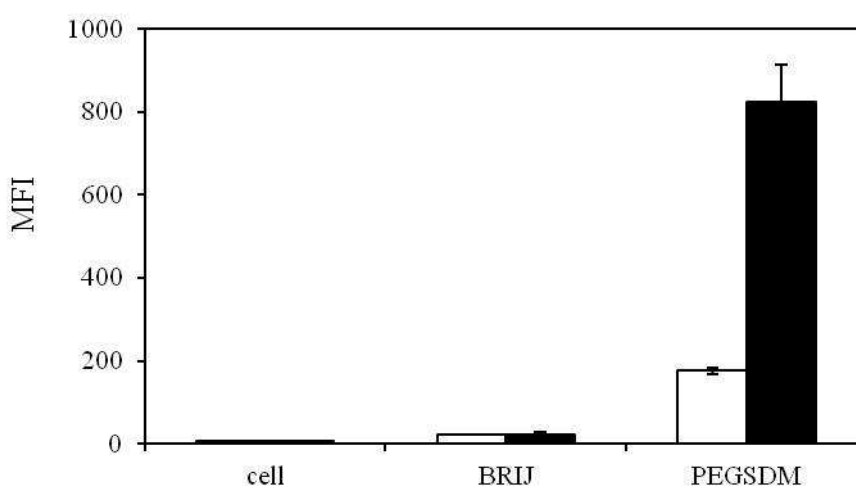


Figura 54: intensità di fluorescenza media ottenuta per analisi citofluorimetrica di cellule MCF-7 trattate con liposomi funzionalizzati con stearyl-PEG-poli(SDM) e con Brij-700 a pH 7.4 (□) e 6.5 (■).

3.11 Analisi di microscopia confocale

Allo scopo di valutare se il probe fluorescente con cui i liposomi sono stati marcati rimane associato alla membrana cellulare oppure penetra nel citosol, le cellule MCF-7 sono state trattate per due ore con liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearyl-

PEG-poli(SDM) a pH 7.4 e 6.5 e quindi è stato condotto uno studio di microscopia confocale.

Il direzionamento cellulare pH-indotto riportato in Figura 55 mostra le immagini cellulari dopo trattamento a pH 7.4 (pannello A) e a pH 6.5 (pannello B).

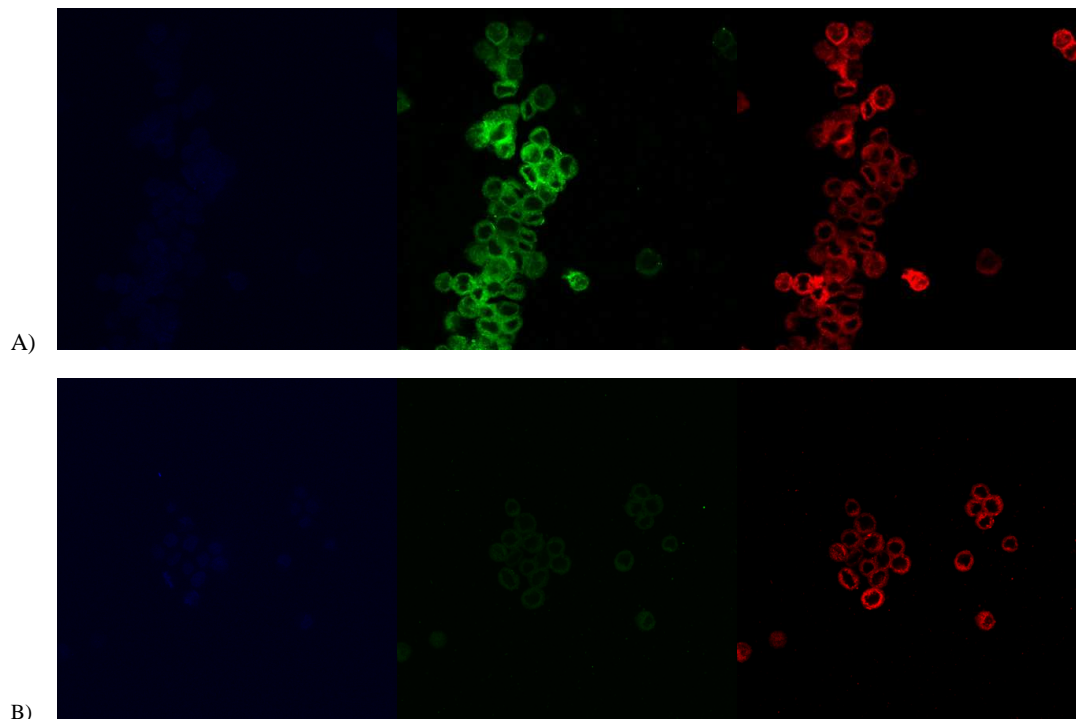


Figura 55: immagini di cellule trattate con liposomi acido sensibili marcati con FITC-DSPE A) pH 6.5 e B) pH 7.4 osservate attraverso microscopio confocale.

L'analisi di microscopia confocale rivela una significativa differenza nell'uptake cellulare dei liposomi acido sensibili ai due valori di pH considerati. A pH neutro l'associazione risulta molto limitata mentre aumenta drasticamente a pH 6.5 dando origine ad una fluorescenza diffusa in tutto il comparto citosolico in modo omogeneo indicando che il fluoroforo viene rilasciato nel citoplasma mentre non rimane associato alla membrana cellulare. Per confronto, l'analisi al microscopio confocale di campioni

cellulari non trattati non ha evidenziato alcuna fluorescenza associata alle cellule a pH 7.4 (Figura 56).



Figura 56: immagini di cellule MCF-7 non trattate a pH 7.4 osservate attraverso microscopio confocale.

3.12 Studio di biodistribuzione

Lo studio di biodistribuzione eseguito per somministrazione intravenosa a topi dei sistemi liposomiali acido sensibilimarcato con NIR-Dir dye (campioni A2 e A3) mostra che questa formulazione ha un breve tempo di permanenza nel sangue e poco accumulo a livello tumorale contrariamente a quanto osservato per la formulazione di riferimento A1 costituita da liposomi non acido sensibili PEGilati (Figura 57).

Per quanto riguarda le formulazioni acido sensibili in esame, si può notare come vi sia un immediato accumulo a livello epatico ed una minima accumulazione nel tumore dopo 6 ore

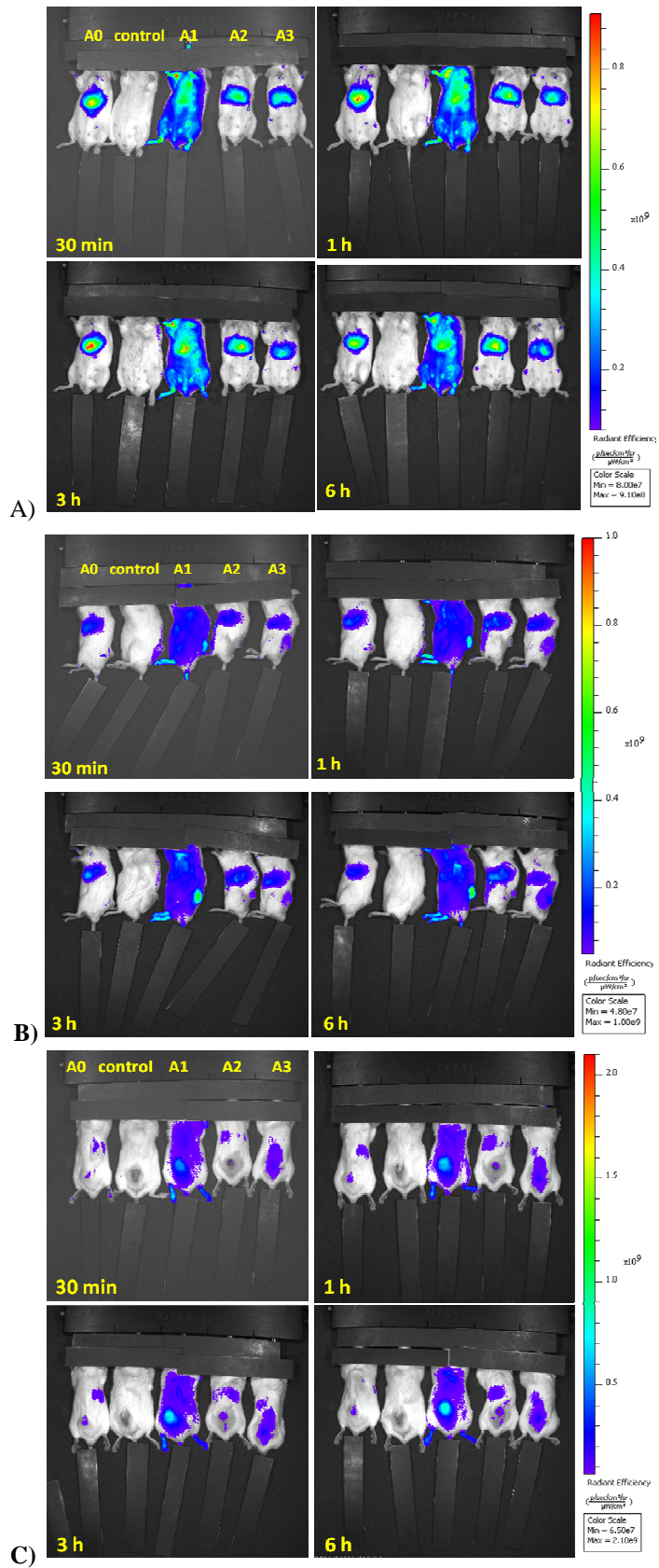


Figura 57: biodistribuzione in vivo su topi BALB/c inoculati con linea tumorale CT-26. A) front , B) side e C) back.

4-DISCUSSIONE

Il presente progetto di ricerca ha previsto lo studio e lo sviluppo di un sistema liposomiale “intelligente” per uso farmaceutico la cui composizione chimica ed architettura è stata disegnata per consentire una risposta morfologica adeguata al variare delle condizioni fisiopatologiche.

Il coniugato anfifilico acido sensibile sintetizzato, che per associazione in ambiente acquoso si organizza in strutture micellari, è costituito da PEG coniugato ad una catena lipidica mentre all'estremità libera del PEG è stata successivamente polimerizzata una catena di poli-sulfadimetossina metacrilata. La composizione dell'unimero è stata progettata al fine di ottenere un efficace sistema per il delivery tumorale in grado di rispondere a specifiche condizioni fisiopatologiche che sono peculiari del tessuto tumorale.

È noto che l'ambiente interstiziale di un tessuto tumorale è debolmente acido rispetto al pH fisiologico dei tessuti sani e del plasma e questo fenomeno è dovuto a molteplici fattori correlati all'intensa attività metabolica delle cellule iperproliferanti.

Lo sviluppo di sistemi in grado di rispondere a cambiamenti microambientali di pH può costituire una buona strategia per garantire il delivery specifico di farmaci antitumorali.

Un nanocarrier dotato di adeguate dimensioni (inferiori a 200 nm) è in grado di accumularsi nel sito tumorale in virtù della peculiare morfologia dei capillari del tessuto ma oltre a ciò deve essere intrappolato in quel tessuto, deve penetrare nelle cellule o rilasciare il farmaco esclusivamente una volta giunto nel distretto colpito da patologia. È per tale motivo che si progettano sistemi definiti “a innesco” che risentono di cambiamenti microambientali modificando le loro proprietà strutturali o superficiali o

quelle biologiche. Sulla base di questi presupposti, liposomi sono stati funzionalizzati con l'unimero acido sensibile a base di PEG contenente sulfadimetossina che è stata scelta per le sue caratteristiche chimico-fisiche e il pKa debolmente acido ma vicino al pH fisiologico. Sulfadimetossina è stata polimerizzata per amplificare le sue proprietà sulla superficie dei liposomi a cui è associata.

Come riportato in letteratura, la sulfadimetossina perde la sua carica negativa per protonazione dell'azoto appartenente al gruppo sulfonamidico in ambiente debolmente acido (pH inferiore a 6.2), dando origine ad una molecola neutra a carattere idrofobico. Questo determina una diminuzione reversibile della sua solubilità in ambiente acquoso favorendo cambiamenti morfologici e superficiali dei liposomi a cui è associata e, presumibilmente, una loro aggregazione. Inoltre la carica anionica che detiene a pH fisiologico conferisce al nanocarrier proprietà *stealth* che favoriscono una maggiore permanenza nel circolo sanguigno.

Per la sintesi del coniugato acido sensibile, è stato scelto un PEG-diammino (3.4 kDa), polimero idrofilico che, per la presenza dei due gruppi amminici alle estremità, consente di essere etero-bifunzionalizzato con la porzione idrofobica alchilica ad un lato e può funzionare da iniziatore per la polimerizzazione di sulfadimetossina metacrilata dall'altro. Inoltre il PEG partecipa ad impartire proprietà *stealth* sulla superficie del carrier ed è un polimero che garantisce elasticità al sistema.

Lo stearoil cloruro è stato scelto poiché reagisce prontamente con alcoli e ammine. Nel caso della modifica del PEG-diammino, la reazione di acilazione coinvolge un gruppo amminico del PEG che, grazie al suo carattere nucleofilo, ha azione elettrone-donatrice verso il gruppo carbonilico elettrofilo dell'agente acilante e questo consente la formazione di un legame ammidico con cinetica di reazione estremamente rapida. La

reazione di coniugazione, in virtù della estrema reattività degli alogenuri acilici, è stata eseguita in rapporto di equimolarità tra PEG-(NH₂)₂ e stearoil cloruro in modo tale che uno solo dei due gruppi amminici fosse alchilato. Inoltre la omobifunzionalità è stata evitata aggiungendo piccole aliquote dello stearoil cloruro ad una soluzione di PEG-(NH₂)₂ diluita in solvente organico anidro. La reazione ha permesso quindi di ottenere un derivato anfifilico NH₂-PEG-stearoil. Come confermato dall'analisi dello spettro ¹H-NMR, sono presenti i segnali della catena idrocarburica (1.248 ppm), del suo metile terminale (0.875 ppm) oltre a quello degli etossili del PEG (3.6 ppm). Sia l'analisi NMR che i test spettroscopici hanno confermato che la strategia sintetica adottata consente di ottenere la mono-funzionalizzazione di PEG-(NH₂)₂ con il gruppo stearico.

Nel secondo step sintetico, NH₂-PEG-stearoil è stato sottoposto ad una ulteriore acilazione a livello del gruppo amminico rimasto libero. L'agente acilante usato è stato il 2-bromo-isobutirrilbromuro, scelto per introdurre un gruppo funzionale alchil-alogenuro che funzioni da iniziatore su cui far polimerizzare la sulfadimetossina metacrilata secondo la metodica AGET-ATRP.

Il coniugato ottenuto è stato purificato per precipitazione in etere che ha permesso di rimuovere il 2-bromoisobutirrilbromuro in eccesso come confermato dall'analisi NMR. Lo spettro ¹H-NMR inoltre mostra i segnali relativi ai due metili dell'acido 2-bromoisobutirrico coniugato al PEG (1.96 ppm) il cui integrale correla in rapporto 1:1 con la catena del PEG.

Il gruppo bromo-isobutirrico è stato utilizzato per polimerizzare per via radicalica la sulfadimetossina. Per consentire la polimerizzazione, la sulfadimetossina è stata previamente trasformata in gruppo metacrilico per reazione con metacriloloil cloruro. L'identità chimica di metacriloloil sulfadimetossina è stata confermata mediante

spettroscopia IR, $^1\text{H-NMR}$ e ESI-TOF. L'analisi IR ha confermato la scomparsa del segnale dell'ammina aromatica in seguito a reazione con metacrilolo cloruro.

L'analisi $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 mostra la presenza dei segnali caratteristici dei protoni del gruppo metacrilico: due segnali di singoletto a 5.84 ppm e 5.58 ppm che integrano per i due protoni del gruppo etilenico, un singoletto a 1.94 ppm che integra per i tre protoni del gruppo metilenico introdotto nella struttura. Inoltre il segnale di doppietto di doppietti dell'anello aromatico di-sostituito in posizione "para" presente nello spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 della sulfadimetossina commerciale si sposta a 7.89 ppm come singoletto che integra per 4 protoni. La molteplicità di singoletto è dovuta al fatto che l'intorno magnetico delle due coppie di protoni dell'anello è uguale quindi ai fini dell'analisi risultano come quattro protoni identici. Anche l'analisi ESI-TOF ha confermato che il derivato metacrilico ha una massa in linea con la predizione. Tenuto conto che la solubilità di metacrilolo-sulfadimetossina in acqua è estremamente bassa, nell'ordine di pochi $\mu\text{g/mL}$, mentre è elevata in ambiente basico, la polimerizzazione mediante tecnica AGET-ATRP è stata condotta in ambiente basico per NaOH.

La reazione di polimerizzazione AGET-ATRP richiede la formazione di un intermedio radicalico a livello del coniugato stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH_3)₂-Br per intervento dell'attivatore metallico Cu(I) e complessato con il ligando TPMA. Il rame è in grado di strappare l'atomo di bromo legato all'estremità del polimero e l'unimero radicalico stearoil-PEG-NH-CO-C-(CH_3)₂• può reagire con il doppio legame del gruppo metacrilico della sulfadimetossina e dare origine alla propagazione controllata della catena polimerica. Il metallo, che ha azione di attivatore, viene aggiunto alla miscela di reazione in forma ossidata e la polimerizzazione viene innescata mediante l'aggiunta di acido ascorbico quale agente riducente. Questo consente un controllo molto preciso

delle fasi di polimerizzazione sia in termini di cinetica di reazione che di grado di polimerizzazione e permette di condurre la reazione anche in presenza di tracce di ossigeno. Studi preliminari sono stati condotti per valutare il miglior rapporto molare tra antiossidante ed attivatore metallico e per individuare così le migliori condizioni di reazione. In questo studio è stato utilizzato un rapporto tra CuCl_2 e acido ascorbico di 1:0.08 che consente di controllare adeguatamente la cinetica di reazione.

Il coniugato stearoil-PEG-poli(SDM) è stato purificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare in condizioni debolmente basiche. La strategia di frazionamento ha permesso di recuperare un prodotto estremamente puro, come confermato dall'assenza di sulfadimetossina metacrilata nell'analisi RP-HPLC condotta sul coniugato purificato.

Il test allo iodio e l'analisi UV-Vis, effettuati per valutare il rapporto molare esistente tra PEG e sulfadimetossina nel coniugato stearoil-PEG-poli(SDM), hanno dimostrato che la polimerizzazione ha permesso di ottenere un derivato con undici sulfadimetossine e quindi una resa di polimerizzazione molto elevata (circa 80 %). Data la complessità strutturale dell'unimero finale, la sua caratterizzazione chimica si è basata sull'individuazione nello spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'anello piridinico della sulfadimetossina che risuona a 6.00 ppm mentre gli etossili del PEG sono riconoscibili dal segnale a 3.5 ppm.

L'analisi turbidimetrica di una soluzione di stearoil-PEG-poli(SDM) ha rivelato che a pH 7.02 si ha intorbidimento della soluzione colloidale dovuto evidentemente a idrofobizzazione della catena polimerica di sulfadimetossina e conseguente macroaggregazione. L'inizio dell'aggregazione si correla bene col pH a cui tutte le sulfadimetossine risultano protonate (pH 7.02). Il fatto che una soluzione colloidale

cambi il proprio stato fisico e dia origine ad aggregati in seguito a cambiamenti di pH, è una prova che il sistema risponde al variare del pH. Tale risposta è da imputare esclusivamente alla sulfadimetossina e in particolare alla deprotonazione del gruppo solfonamidico. Questo effetto risulta inoltre amplificato dalla presenza di numerose unità disulfadimetossina polimerizzate su un backbone metacrilico.

I liposomi sono stati formulati utilizzando fosfatidilcolina d'uovo e colesterolo secondo il rapporto molare 1:0.5. Il protocollo standard di preparazione (*thin layer rehydration method*) permette di ottenere liposomi che rispondono alle caratteristiche richieste sia in termini di concentrazione finale che di proprietà dimensionali. La funzionalizzazione con i polimeri avviene per *post- insertion*, ovvero il polimero viene introdotto nella struttura già formata ad una temperatura superiore alla temperatura di transizione della fosfatidilcolina. In questo modo il bilayer risulta più fluido favorendo l'inserimento della catena idrofobica dei polimeri aggiunti.

Liposomi funzionalizzati con stearoil-PEG-poli(SDM) e concentrazioni variabili di PEG-DSPE in tampone ammonio fosfato a pH 8 mantengono nel tempo dimensioni costanti attorno ai 200 nm. Inoltre, diminuendo la concentrazione di PEG-DSPE da 0.25% mol allo 0.1% mol, a pH 8.0, si nota che le dimensioni delle vescicole aumentano sensibilmente. Questi dati indicano innanzitutto che il polimero commerciale PEG-DSPE esercita un effetto stabilizzante sulla struttura vescicolare, dovuto probabilmente all'incremento delle sue proprietà stealth. Questo effetto risulta essere dipendente dalla concentrazione del polimero in quanto la formulazione allo 0.1% mol manifesta un forte aumento delle dimensioni delle vescicole nel tempo, indice di scarsa stabilità del sistema.

La formulazione scelta è costituita da liposomi funzionalizzati al 6% mol/mol con stearyl-PEG-(poli)SDM e 0.25% PEG-DSPE. Tale formulazione è stata analizzata attraverso la tecnica di *dynamic light scattering* che ha evidenziato una marcata risposta del sistema a variazioni di pH. Lo studio di caratterizzazione ha dimostrato inoltre che non vi è una cinetica di aggregazione ma che il sistema risponde in modo significativo in ambienti con pH inferiori a 7.4.

I liposomi acido sensibili sono stati progettati per essere usati come sistema di drug delivery sito specifico di farmaci antitumorali con proprietà biofarmaceutiche inadeguate. In questo studio è stato scelto come farmaco modello la doxorubicina. Il farmaco è stato incorporato nei liposomi attraverso una metodica che prevede l'utilizzo di un gradiente di ioni ammonio. Per poter caricare i liposomi acido sensibili con doxorubicina, sono stati condotti vari studi per la messa a punto di una metodica di caricamento in grado di sfruttare le proprietà anfipatiche del farmaco e raggiungere efficienze di caricamento elevate mantenendo allo stesso tempo l'integrità della struttura vescicolare. Il protocollo di caricamento messo a punto nel presente lavoro consente un significativo incremento della percentuale di caricamento rispetto il caricamento passivo raggiungendo una percentuale di loading del del 32 % p/p.

I sistemi di drug delivery devono garantire un rilascio del farmaco caricato una volta giunti nel distretto affetto da patologia. Per valutare il profilo di disponibilità dei sistemi prodotti in questo lavoro, i liposomi funzionalizzati con stearyl-PEG-poli(SDM) e caricati con 5(6)-carbossilfluoresceina e doxorubicina sono stati sottoposti ad uno studio di rilascio in condizioni sink garantite dal fatto che nel tampone di rilascio le due molecole modello presentano un'ottima solubilità. Lo studio è stato eseguito a due pH, 7.4 e 6.5, che mimano rispettivamente le condizioni fisiologiche del sangue e quelle

dell'ambiente interstiziale tumorale. Gli studi di rilascio hanno dimostrato che il farmaco viene liberato secondo una cinetica di primo ordine ad entrambi i valori di pH. A pH acido, doxorubicina e 5(6)carbossifluoresceina vengono rilasciate al 50 % in 1 ora. A pH 7.4 il 50% di doxorubicina e 5(6)carbossifluoresceina viene rilasciato rispettivamente in 7 e 3 ore. Questo dimostra come i liposomi siano sufficientemente stabili da poter circolare nel torrente sanguigno per alcune ore senza perdere il loro carico. Allo stesso tempo comunque, una volta accumulatisi nel tessuto bersaglio in virtù della loro acidità, i liposomi possono rilasciare il loro contenuto in modo che svolga la sua azione terapeutica. Uno studio eseguito in condizioni non sink utilizzando liposomi caricati con 5(6)carbossifluoresceina ha evidenziato come a pH acido i liposomi aggregano e sedimentano e con essi venga trattenuta anche la carbossifluoresceina all'interno dei macroaggregati e ciò può favorire l'interazione con le cellule tumorali e stimolarne l'uptake.

Mediante studi di fluorescenza su lisati cellulari, di citofluorimetria e microscopia confocale è stato possibile determinare se le caratteristiche di acidità conferiscono ai liposomi formulati la proprietà di essere internalizzati selettivamente in cellule tumorali a seconda dell'ambiente in cui si trovano e più specificamente a pH debolmente acido.

Come modello biologico sono state utilizzate cellule MCF-7 incubate con liposomi acido sensibili marcati con fluoresceina-DSPE. Le condizioni di pH sono state scelte per mimare le condizioni fisiologiche e tumorali a pH 7.4 e 6.5 rispettivamente. Gli studi condotti sul lisato cellulare di cellule MCF-7 trattate a pH neutro hanno evidenziato una lieve internalizzazione cellulare che risulta comunque di gran lunga inferiore rispetto a quella misurata a pH 6.5. Ciò sta ad indicare che tutti i cambiamenti morfologici,

dimensionali, l'aggregazione e la sedimentazione registrati a pH acido promuovono l'uptake cellulare e che questo evento è tempo dipendente e non saturabile nell'intervallo di tempo analizzato. È plausibile che la risposta dei liposomi a pH 6.5 sia la principale causa di interazione tra il carrier e le cellule. Questo comportamento promuove quindi l'endocitosi da parte delle cellule ed è del tutto assente quando le cellule sono trattate con liposomi non acido sensibili funzionalizzati con PEG-DSPE il cui comportamento biologico in vitro non è dettato da alcuno stimolo specifico.

L'analisi di fluorescenza associata a ciascuna cellula integra e fissata con p-formaldeide è stata condotta su cellule MCF-7 incubate per 2 ore con i liposomi marcati con probe fluorescente. Questo tempo di incubazione è stato considerato adeguato per consentire l'uptake cellulare alle differenti condizioni di pH adottate nell'esperimento. L'analisi FACS ha dimostrato che l'uptake di liposomi acido sensibili funzionalizzati con stearyl-PEG-poli(SDM) è circa quattro volte superiore a pH 6.5 rispetto a pH neutro, a conferma della loro buona capacità di rispondere all'ambiente acido circostante. Anche questa analisi ha confermato che i liposomi funzionalizzati con PEG-DSPE non interagiscono sostanzialmente con le cellule in nessuna condizione di pH manifestando buone capacità *stealth*.

Al fine di valutare se i liposomi acido sensibili si dispongono sulla superficie cellulare o consentono la disposizione intracellulare del probe con cui sono caricati o se ancora si possa evidenziare un certo "trafficking" nel comparto citosolico è stato condotto uno studio di microscopia confocale su cellule MCF-7. I risultati mostrano che i liposomi incubati a pH acido penetrano in toto o consentono comunque la liberazione del probe all'interno del citosol, fatto indispensabile affinché i farmaci antitumorali abbiano un effetto biologico sulle cellule iperproliferanti. Al contrario, come atteso in base ai

risultati precedenti, i liposomi penetrano scarsamente nelle cellule per incubazione a pH neutro.

Parallelamente, la stessa analisi effettuata con liposomi a base di PEG-DSPE ha rivelato la scarsa efficienza nel penetrare la membrana cellulare, in accordo con gli studi precedenti e con il razionale dello studio.

La biocompatibilità del sistema liposomiale è stata valutata incubando cellule MCF-7 con concentrazioni crescenti di liposomi acido sensibili per 12 ore. La vitalità cellulare è stata espressa in percentuale comparata ad un controllo non trattato. I risultati ottenuti mostrano che il materiale sintetizzato non esercita alcun effetto tossico sulle cellule trattate a tutte le concentrazioni testate.

La caratterizzazione biologica si è conclusa con la valutazione della biodistribuzione *in vivo* su *tumor-bearing mice*. Lo scopo dell'esperimento è stato di valutare la capacità del carrier di accumularsi a livello tumorale *in vivo* e negli altri organi.

Dai risultati ottenuti, si può stabilire come la nuova formulazione acido sensibile abbia una scarsa capacità di accumulo tumorale come invece evidenzia la formulazione di riferimento. Tuttavia, il risultato ottenuto per il campione di riferimento A1 è in linea con quanto riportato in letteratura per liposomi PEGilati. Infatti la PEGilazione è un ottimo metodo per prolungare la circolazione di questi sistemi in seguito alla somministrazione e ne favorisce l'accumulo nel tumore sfruttando l'effetto EPR (A. Gabizon, 2012). Per quanto riguarda le formulazioni acido sensibili, non vi è un significativo accumulo a livello del tumore mentre si ha un forte accumulo a livello epatico. Come sviluppo futuro, è possibile quindi migliorare questa formulazione incrementando la concentrazione di polimero stabilizzante PEG-DSPE per aumentare le proprietà stealth e di accumulo intratumorale della formulazione.

5-CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro hanno dimostrato che è possibile mettere a punto una metodica di sintesi affidabile e riproducibile per produrre un coniugato anfifilico acido sensibile da impiegare nella preparazione di liposomi a cui si intende conferire capacità responsiva a variazioni di pH. Lo *switch* dei gruppi solfonamidici della catena acido sensibile, che dalla forma anionica passano ad una forma neutra, avviene quando il pH diminuisce da 7.4 a 6.5.

I liposomi assemblati includendo nella struttura tale coniugato, cambiano effettivamente le loro proprietà fisiche a pH debolmente acido mostrando un evidente grado di aggregazione che promuove selettivamente l'uptake da parte di un modello cellulare trattato a pH 6.5.

L'unimero anfifilico stearoil-PEG-poli(SDM) è stato chimicamente caratterizzato con successo e sono state determinate identità e purezza attraverso adeguate metodiche analitiche.

Dai risultati ottenuti è stato quindi possibile ottenere un sistema liposomiale che presenta delle buone caratteristiche di acido responsività in vitro e di stabilità chimico-fisica. Infatti è stato evidenziato che il carrier presenta una buona stabilità in presenza delle proteine del siero e questo lo rende adatto ad una possibile applicazione in vivo.

È stato inoltre possibile caricare con successo un farmaco antitumorale grazie ad una formulazione in grado di rispondere efficacemente alle variazioni di pH tipiche del microambiente interstiziale della neoplasia. Questo fenomeno favorisce l'uptake cellulare come confermato da studi di microscopia confocale, citometria a flusso e spettroscopia di fluorescenza.

Tuttavia lo studio di biodistribuzione in vivo ha evidenziato che la formulazione acido sensibile non presenta un significativo accumulo a livello del tumore mentre si nota un segnale forte a livello epatico. Una prospettiva futura è quella di migliorare la formulazione incrementando la concentrazione di polimero stabilizzante PEG-DSPE per incrementare le proprietà stealth della formulazione e favorire quindi l'accumulo intratumorale.

6- BIBLIOGRAFIA

Adams DJ. The impact of tumor physiology on camptothecin-based drug development. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*. 2005; **5**: 1-13.

Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C., and Yau-Young, A. (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethyleneglycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1066, 29-36.

Allen, T. M. (1998) Liposomal Drug Formulations: Rationale for Development and What We Can Expect for the Future. *Drugs* 56, 747-756.

Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.* 1999; **17**:409-421.

Bae YH, Yin H. Stability issues of polymeric micelles. *J Contr Release*. 2008; **131**: 2-4.

Bangham, A. D., and Horne, R. W. (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* 8, 660-IN10.

Barenholz et al, US Patent 5316771 1994.

Bhadra D, Bhadra S, Jain P. PEG: a review of PEGylated systems. *Pharmazie*. 2002; **57**: 5-29

Braunecker WA, Matyjaszewski K, Controlled/living radical polymerization: features, developments, and perspectives. *Prog. Polym. Sci.* 2007; **32**: 93–146.

Brown JM, William WR. Exploiting tumour hypoxia in *cancer* treatment. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; **4**: 437-447.

Chiefari J, Chong YK, Ercole F, Krstina J, Jeffery J, Le TPT, Mayadunne RTA, Meijs GF, Rizzardo E, Tang SH. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-

Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules*. 1998; **31**: 5559-5562.

Chieu DT, Shaofang Y. Near-infrared spectroscopic method for the sensitive and direct determination of aggregations of surfactants in various media. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005; **283**: 613–618.

Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., and Papahadjopoulos, D. (1999) Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacological Reviews* 51, 691-744.

Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985; **43**: 175-203.

Franchi A, Silvestre P, Pouyssegur J. A genetic approach to the role of energy metabolism in the growth of tumor cells: tumorigenicity of fibroblast mutants deficient either in glycolysis or in respiration. *Int. J. Cancer*. 1981; **27**: 819-827.

Gabizon, A. A. (2001) Stealth Liposomes and Tumor Targeting: One Step Further in the Quest for the Magic Bullet. *Clinical Cancer Research* 7, 223-225.

Gao Z, Lukyanov AN, Chakilam AR, Torchilin VP. PEG-PE/phosphatidylcholine mixed immunomicelles specifically deliver encapsulated taxol to tumor cells of different origin and promote their efficient killing. *Journal of Drug Targeting*. 2003; **11**: 87-92.

Goto A, Fukuda T. Kinetics of living radical polymerization. *Prog Polym Sci*. 2004; **29**: 329–85.

Greszta D, Mardare D, Matyjaszewski K. “Living” radical polymerization. 1. Possibilities and limitations. *Macromolecules*. 1994; **27**: 638–44.

Haberkorn U, Strauss LG, Reisser C, Haag D, Dimitrakopoulou A, Ziegler S, Oberdorfer F, Rudat V, Vankaick G. Glucose uptake, perfusion, and cell proliferation in head and neck tumors: relation of positron emission tomography to flow cytometry. *J. Nuclear Med*. 1991; **32**: 1548-1555.

Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. *Biochem. J*. 2007; **401**: 1–11.

Hawker CJ, Bosman AW, Harth E. New polymer synthesis by nitroxide mediated living radical polymerizations. *Chem Rev.* 2001; **101**: 3661-3688.

Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Review.*, 2008; **60**: 876–885.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med.* 1997; **3**: 177-82.

Hill B.T., *Anti-Cancer Drugs.* 1996; **7**: 1-185.

Hullmann, A. (2006) Who is winning the global nanorace? *Nat Nano 1*, 81-83.

Ikada Y, Tsuji T, Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.* 2000; **21**: 117–32.

Iwai K, Maeda H, Konno T. Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor: Enhanced therapeutic effect and X-ray image. *Cancer Res.* 1984; **44**: 2115–2121.

Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am.* 1998; **4**: 209-217.

Jones MC, Leroux JC. Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 1999; **48**: 101-111.

Kang SI, Bae YH. pH-Induced solubility transition of sulfonamide-based polymers, *Journal of Controlled Release*, 2002; **80**: 145-155.

Kotani Y, Kamigaito M, Sawamoto M. Re(V)-mediated living radical polymerization of styrene: 1 ReO₂(PPh₃)₂/ R-I initiating systems., *Macromolecules.* 1999; **32**: 2420–4.

Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Delivery Rev.* 2001; **47**: 65-81.

Kuon GS, Okano T, Soluble self-assembled block copolymers for drug delivery. *Pharm Res.* 1999; **16**: 597-600.

Kwon G, Naito M, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Micelles based on AB block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(β -benzyl L-aspartate). *Langmuir.* 1993; **9**:945-949.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; **246**: 1306–1309.

Litzinger, D. C., Buiting, A. M. J., van Rooijen, N., and Huang, L. (1994) Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1190*, 99-107.

Liu SQ, Tong YW, Yang YY. Thermally sensitive micelles self-assembled from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) for controlled delivery of paclitaxel. *Molecular BioSystems.* 2005; **1**: 158-165.

Liu, D., Mori, A., and Huang, L. (1992) Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1104*, 95-101.

Lukyanov AN, Torchilin VP. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2004; **56**: 1273–1289.

Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer.* 1999; **35**: 531-539.

Maeda H, Matsumura Y. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release.* 2000; **65**: 271–284.

Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res.* 1986; **46**: 6387–6392.

Matsumura Y, Maruo K, Kimura M, Yamamoto T, Konno T, Maeda H. Kinin-generating cascade in advanced cancer patients and in vitro study. *Jpn J Cancer Res.* 1991; **82**: 732-741.

Matyjaszewski K, Shipp DA, Wang JL, Grimaud T, Patten TE. Utilizing halide exchange to improve control of atom transfer radical polymerization. *Macromolecules.* 1998; **31**: 6836-6840.

Matyjaszewski K, Xia J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chem Rev.* 2001; **101**: 291-299.

McKeehan WL. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell. Biol. Int. Rep.* 1982; **6**: 635-650.

Mehavar R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Release.* 2000; **69**: 1-25.

Mills, J. K., and Needham, D. The Materials Engineering of Temperature-Sensitive Liposomes, in *Methods in Enzymology* pp 82-113, Academic Press.

Naa K, Leea KH, Baea YH. pH-sensitivity and pH-dependent interior structural change of self-assembled hydrogel nanoparticles of pullulan acetate/oligo-sulfonamide conjugate. *UT Patent 84108.* 2004.

Park, Y. S. (2002) Tumor-directed targeting of liposomes. *Biosci Rep* 22, 267-81.

Patten TE, Matyjaszewski K. Copper(I)-Catalyzed Atom Transfer Radical Polymerizations. *Acc. Chem. Res.* 1999; **32**: 895.

Queffelec J, Gaynor SG, Matyjaszewski K. Optimization of atom transfer radical polymerization using Cu(I)/tris(2-(dimethylamino)ethyl)amine as a catalyst. *Macromolecules.* 2000; **33**: 8629-39.

Ramkisson-Ganorkar C, Liu F, Baudys M, Kim SW. Modulating insulin-release profile from pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight. *J. Control. Release.* 1999; **59**: 287-298.

Rangel-Yagui CO, Pessoa A. -Jr, Costa Tavares L. Micellar solubilization of drugs. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2005; **8**:147-163.

Roux E, Passirani C, Scheffold S, Benoit JP, Leroux JC. Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *J. Control. Release.* 2004; 94: 447–451.

Salmaso S, Schrepfer R, Cavallaro G, Bersani S, Caboi F, Giammona G, Tonon G, Caliceti P. Supramolecular association of recombinant human growth hormone with hydrophobized polyhydroxyethylaspartamides. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 68: 656-666.

Sandhu JS, Keating A, Hozumi N, Human gene therapy. *Crit. Rev. Biothechnol.* 1997; **17**: 307-326.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; **3**: 721-732.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; **219**: 983–985.

Senior, J., Crawley, J. C. W., and Gregoriadis, G. (1985) Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 839, 1-8.

Sims GE, Snape TJ. A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Anal Biochem.* 1980; **107**: 60-63.

Simoës, S., Slepushkin, V., Duzgunes, N., and Pedroso de Lima, M. C. (2001) On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1515, 23-37.

Smallbone, K., Gavaghan, D. J., Gatenby, R. A., and Maini, P. K. (2005) The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *Journal of Theoretical Biology* 235, 476-484.

Snyder SL, Sobocinski PZ. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal Biochem.* 1975; **64**: 284-8.

Stubbs M, Bashford CL, Griffiths JR. Understanding the tumor metabolic phenotype in the genomic era. *Curr. Mol. Med.* 2003; **3**: 49-59.

Szwarc M, "Living" polymers. *Nature.* 1956; **176**: 1168–9.

Tian M, Qin A, Ramireddy C, Webber SE. Hybridization of block copolymer micelles. *Langmuir.* 1993; **9**: 1741-1748.

Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2006; **58**: 1532–1555.

Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release.* 2001; **73**: 137–172

Torchilin, V. (2007) Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal* 9, E128-E147.

Trubetskoy VS, Frank-Kamenetsky MD, Whiteman KR, Wolf GL, Torchilin VP. Stable polymeric micelles: lymphangiographic contrast media for gamma scintigraphy and magnetic resonance imaging. *Acad Radiol.* 1996; **3**: 232-8.

Wang CY, Huang L. Highly efficient DNA delivery mediated by pH-sensitive immunoliposomes. *Biochemistry (Mosc).* 1989; **28**: 9508–9514.

Warburg, O. Versuche an fiberlebenden Carcinomgewebe, *Biochem. Z.* 1923; **142**: 317

Webster OW, Hertler WR, Sogah DY, Farnham, WB, RajanBabu TV. Group-transfer polymerization. 1. A new concept for addition polymerization with organosilicon initiators. *J Am Chem Soc.* 1983; **105**, 5706-5708.

Wu DC, Liu Y, He CB. Thermal- and pH-Responsive Degradable Polymers. *Macromolecules.* 2008; **41**: 18-20.

Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res.*, 1998; **58**: 159–165.

Wu J, Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Lu JS, Di GH, Liu G, Li FM, Ou ZL, Jie C, Shen ZZ, Shao ZM. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 2004; 88: 75-85.

Xia J, Matyjaszewski K. Controlled/“living” radical polymerization. Homogeneous reverse atom transfer radical polymerization using AIBN as the initiator. *Macromolecules*. 1997; 30:7692–6.

Xia J, Zhang X, Matyjaszewski K. The effect of ligands on copper-mediated atom transfer radical polymerization, *ACS Symp Ser*. 2000;760:207–23.