



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI FARMACIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE

XX CICLO

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITA' DI PADOVA

PROFARMACI POLIMERICI DI FARMACI ANTITUMORALI

DIRETTORE DELLA SCUOLA : Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

SUPERVISORE : Ch.mo Prof. Oddone Schiavon

DOTTORANDO : Fabiana Canal

31 gennaio 2008

Alla mia famiglia

Indice

Indice

1. Abbreviazioni e Simboli	1
2. Summary	5
2. Riassunto	7
3. Introduzione	9
3.1. Terapia antitumorale	9
3.2. Impiego di polimeri nel rilascio controllato di farmaci	11
3.2.1. Modello sperimentale di coniugato polimerico	12
3.2.2. Caratteristiche del <i>carrier</i> polimerico	13
3.2.3. Problemi e vantaggi della bioconiugazione	14
3.2.4. <i>Targeting</i>	15
3.2.4.1. Effetto EPR	15
3.2.4.2. <i>Uptake</i> per endocitosi	17
3.2.4.3. <i>Targeting</i> attivo	19
3.2.5. Rilascio del farmaco dal bioconiugato	19
3.2.6. Polimeri impiegati come <i>drug carriers</i>	20
3.3. Poli-(etilenglicole) o PEG	22
3.3.1. Caratteristiche generali	22
3.3.2. Usi ed applicazioni	23
3.3.3. Chimica della coniugazione con PEG	24
3.3.4. PEGhilazione	26
3.4. Gemcitabina	31
3.4.1. Metabolismo	32
3.4.2. Meccanismo d'azione	33
3.4.3. Resistenza	35
3.4.4. Farmacocinetica clinica	35
3.4.5. Attività antitumorale	37
3.4.6. Tossicità	38

3.4.7. Formulazione	39
3.5. Epirubicina	41
3.5.1. Metabolismo	42
3.5.2. Meccanismo d'azione	43
3.5.3. Farmacocinetica clinica	44
3.5.4. Attività antitumorale	45
3.5.5. Tossicità	46
3.5.6. Formulazione	47
3.6. Acido folico	48
4. Materiali e Metodi	51
4.1. Materiali	51
4.1.1. Reagenti	51
4.1.2. Strumentazione	52
4.1.3. Animali utilizzati per gli studi <i>in vivo</i>	53
4.2. Sintesi e caratterizzazione dei coniugati mPEG-gemcitabina	54
4.2.1. Funzionalizzazione di mPEG-OH a mPEG-OCH ₂ -COOH	54
4.2.2. Attivazione del gruppo carbossilico di mPEG-COOH con N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) e N-idrossisuccinimide (NHS)	55
4.2.3. Metodo per la determinazione del grado di attivazione di mPEG-NHS	56
4.2.4. Sintesi e purificazione dei coniugati mPEG-dFdC	57
4.2.5. Saggio allo iodio per la determinazione del mPEG presente nelle frazioni	58
4.2.6. Caratterizzazione dei coniugati mPEG-dFdC	58
4.3. Sintesi e caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-gemcitabina	60
4.3.1. Sintesi del coniugato folato-PEG ₄₈₀₀ -gemcitabina	60
4.3.1.1. Sintesi dell'estere attivo dell'acido folico (folato-NHS)	60
4.3.1.2. Sintesi e purificazione di folato-PEG-COOH	61
4.3.1.3. Determinazione della quantità di acido folico coniugato con TNBS	62
4.3.1.4. Attivazione del gruppo carbossilico di folato-PEG-COOH con DCC e NHS	63
4.3.1.5. Sintesi e purificazione di folato-PEG-gemcitabina	64
4.3.2. Sintesi dei coniugati folato-PEG ₄₈₀₀ -(gemcitabina) ₂	65
4.3.2.1. Sintesi e purificazione di NH ₂ -PEG-AD-(COOH) ₂ e NH ₂ -PEG-βGlu-(COOH) ₂	65
4.3.2.2. Sintesi e purificazione di folato-PEG-AD-(COOH) ₂ e	

folato-PEG-βGlu-(COOH) ₂	66
4.3.2.3. Attivazione dei gruppi carbossilici di folato-PEG-AD-(COOH) ₂ e folato-PEG-βGlu-(COOH) ₂ con DCC e NHS	68
4.3.2.4. Sintesi e purificazione di folato-PEG-AD-(dFdC) ₂ e folato-PEG-βGlu-(dFdC) ₂	68
4.3.3. Caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-dFdC e folato-PEG-(dFdC) ₂	70
4.4. Studi eseguiti sui coniugati PEG-gemcitabina	71
4.4.1. Studi di rilascio di gemcitabina in soluzione tampone a diverso pH	71
4.4.2. Studi di stabilità dei coniugati in plasma di topo	71
4.4.3. Studi di stabilità nei confronti dell'enzima citidin-deaminasi	72
4.4.4. Studi farmacocinetici	72
4.4.5. Studi di attività citotossica	73
4.5. Sintesi e caratterizzazione dei coniugati epirubicina-PEG-folato	75
4.5.1. Sintesi di Epi-PEG-COOH e Epi-PEG-DAP-folato	75
4.5.1.1. Attivazione del gruppo ossidrilico di HO-PEG ₃₅₀₀ -COOH con p-nitrofenil-cloroformiato	75
4.5.1.2. Sintesi e purificazione di Epi-PEG-COOH (1COOH)	76
4.5.1.3. Attivazione del gruppo carbossilico di Epi-PEG-COOH con DCC e NHS	78
4.5.1.4. Determinazione del grado di attivazione di Epi-PEG-NHS	79
4.5.1.5. Sintesi di folato-DAP-NH ₂	80
4.5.1.6. Determinazione della quantità di acido folico legato	81
4.5.1.7. Sintesi e purificazione di Epi-PEG-DAP-folato (1FOL)	81
4.5.2. Sintesi di Epi-PEG-AD-(COOH) ₂ e Epi-PEG-AD-(DAP-folato) ₂	83
4.5.2.1. Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-(COOH) ₂ (2COOH)	83
4.5.2.2. Attivazione dei gruppi carbossilici di Epi-PEG-AD-(COOH) ₂ con DCC e NHS	84
4.5.2.3. Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-(DAP-folato) ₂ (2FOL)	86
4.5.3. Sintesi di Epi-PEG-AD-AD ₂ -(COOH) ₄ e di Epi-PEG-AD-AD ₂ -(DAP-folato) ₄	87
4.5.3.1. Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-AD ₂ -(COOH) ₄ (4COOH)	87
4.5.3.2. Attivazione dei gruppi carbossilici di Epi-PEG-AD-AD ₂ -(COOH) ₄ con DCC e NHS	89
4.5.3.3. Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-AD ₂ -(DAP-folato) ₄ (4FOL)	89
4.5.4. Caratterizzazione dei coniugati PEG-epirubicina	91
4.6. Studi eseguiti sui coniugati PEG-epirubicina	92

4.6.1. Curve di accrescimento	92
4.6.2. Valutazione dei recettori dell'acido folico (FR) mediante saggio di immunofluorescenza	92
4.6.3. Studi di attività citotossica	93
4.6.4. Studi di <i>uptake</i> cellulare mediante citofluorimetria di flusso	94
4.6.5. Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale	95
5. Risultati	97
5.1. Sintesi e caratterizzazione dei coniugati mPEG-gemcitabina	97
5.1.1. Caratterizzazione dei coniugati mPEG-gemcitabina	99
5.1.1.1. Caratterizzazione spettrofotometrica	99
5.1.1.2. Caratterizzazione mediante spettroscopia ¹ H-NMR	99
5.1.1.3. Caratterizzazione mediante cromatografia di gel-filtrazione in HPLC	101
5.1.1.4. Caratterizzazione mediante cromatografia liquida a fase inversa RP-HPLC	102
5.2. Sintesi e caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-gemcitabina	105
5.2.1. Caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-gemcitabina	111
5.2.1.1. Caratterizzazione con spettrofotometria UV-Vis	111
5.2.1.2. Caratterizzazione con spettroscopia ¹ H-NMR	113
5.2.1.3. Caratterizzazione con cromatografia RP-HPLC	114
5.3. Studi eseguiti sui coniugati PEG-gemcitabina	117
5.3.1. Studi di rilascio di gemcitabina in soluzione tampone a diverso pH	117
5.3.2. Studi di stabilità dei coniugati in plasma	119
5.3.3. Studi di stabilità nei confronti dell'enzima citidin-deaminasi	120
5.3.4. Studi farmacocinetici	122
5.3.5. Studi di attività citotossica	124
5.4. Sintesi e caratterizzazione dei coniugati PEG-epirubicina	127
5.4.1. Sintesi, purificazione e caratterizzazione di Epi-PEG-COOH (1COOH) e Epi-PEG-DAP-folato (1FOL)	127
5.4.2. Sintesi, purificazione e caratterizzazione di Epi-PEG-AD-(COOH) ₂ (2COOH) e Epi-PEG-AD-(DAP-folato) ₂ (2FOL)	132
5.4.3. Sintesi, purificazione e caratterizzazione di Epi-PEG-AD-AD ₂ -(COOH) ₄ (4COOH) e Epi-PEG-AD-AD ₂ -(DAP-folato) ₄ (4FOL)	134
5.5. Studi eseguiti sui coniugati PEG-epirubicina	136
5.5.1. Curve di accrescimento cellulare	136

5.5.2. Valutazione dei recettori per l'acido folico (FR) mediante saggio di immunofluorescenza	137
5.5.3. Studi di attività citotossica	139
5.5.4. Studi di <i>uptake</i> cellulare mediante citofluorimetria di flusso	140
5.5.5. Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale	143
6. Discussione	147
7. Conclusioni	151
8. Bibliografia	153
<i>Ringraziamenti</i>	165

1. Abbreviazioni e simboli

A	Assorbanza
ACN	acetonitrile
AD	acido L-2-amminoadipico
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome (sindrome da immunodeficienza acquisita)
ATP	adenosina trifosfato
AUC	Area Under the Curve (area sotto la curva)
β Glu	acido β -glutammico
Boc	tert-butilossi-carbonile
BSA	Bovine Serum Albumine (albumina sierica bovina)
C_0	concentrazione iniziale
C_t	concentrazione al tempo t
CDA	citidin-deaminasi
CDP	citidina difosfato
CHP	cis-4-idrossi-l-prolina
Cl	clearance
CTP	citidina trifosfato
CURL	Compartment for Uncoupling Receptor and Ligand
d	densità
D	dose
DAP	1,5-diammino-pentano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato
DCC	N,N'-dicicloesilcarbodiimmide
dCDP	deossi-citidina difosfato
dCK	deossi-citidina chinasi
dCMP	deossi-citidina monofosfato
dCTP	deossi-citidina trifosfato
dFdC	2',2'-difluoro-2'-deossi-citidina

dFdCDP	2',2'-difluoro-2'-deossi-citidina difosfato
dFdCMP	2',2'-difluoro-2'-deossi-citidina monofosfato
dFdCTP	2',2'-difluoro-2'-deossi-citidina trifosfato
dFdU	2',2'-difluoro-2'-deossi-uridina
dFdUMP	2',2'-difluoro-2'-deossi-uridina monofosfato
DMAP	dimetil-ammino-piridina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	N,N-dimetilformammide
DMSO	dimetilsolfossido
DNA	Deoxyribonucleic Acid (acido deossiribonucleico)
DNR	daunorubicina
dNTP	deossi-nucleotide trifosfato
dTTP	deossi-timidina trifosfato
DXR	doxorubicina
EPI	epirubicina
EPR	Enhanced Permeability and Retention effect (effetto di aumentata permeabilità e ritenzione)
FBS	Fetal Bovine Serum (siero bovino fetale)
FDA	Food and Drug Administration
FDMEM	Folate-deficient Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FITC	fluoresceina isotiocianato
FR	Folate Receptor (recettore per acido folico)
5-FU	5-fluorouracile
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor (fattore stimolante colonie di granulociti)
GH	Growth Hormone (ormone della crescita)
GPC	Gel Permeation Chromatography (cromatografia di gel-filtrazione)
GPI	glicosil-fosfatidil-inositolo
HIV	Humane Immunodeficiency Virus (virus dell'immunodeficienza umana)
HPMA	poli-idrossipropil-metacrilammide
HUS	Hemolytic Uremic Syndrome (sindrome uremica emolitica acuta)
IC ₅₀	50% Inhibition Concentration (concentrazione inibitrice del 50%)
IFN	interferone
J	costante di accoppiamento

k_E	costante di eliminazione
K_D	costante di dissociazione
λ	lunghezza d'onda
LHRH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (ormone rilasciante l'ormone luteinizzante)
M_N	peso molecolare nominale
M_w	peso molecolare ponderale
mPEG	monometossi-poli-(etilenglicole)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro
M-VAC	metotressato, vinblastina, doxorubicina, cisplatino
NADH	nicotinammide-adenindinucleotide
NADPH	nicotinammide-adenindinucleotide fosfato
NBS	Neonatal Bovine Serum (siero bovino neonatale)
NHS	N-idrossisuccinimide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (risonanza magnetica nucleare)
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer (tumore polmonare non a piccole cellule)
PBS	Phosphate Buffer Solution (soluzione tampone fosfato)
PEG	poli-(etilenglicole)
PM	peso molecolare
ppm	parti per milione
RES	sistema del reticolo endoteliale
RGD	Argininina-Glicina-Aspartico
RI	Refraction Index (indice di rifrazione)
RNA	Ribonucleic Acid (acido ribonucleico)
RP-HPLC	Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography (cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa)
rpm	Revolutions Per Minute (giri al minuto)
SCID	Severe Combined Immuno Deficiency (immuodeficienza grave combinata)
SCLC	Small Cell Lung Cancer (tumore polmonare a piccole cellule)
SMA	stirene-anidride maleica
SMANCS	stirene-anidride maleica-neocarcinostatina
t	tempo
$t_{1/2}$	tempo di emivita

t_R	tempo di ritenzione
TEA	triethylamina
TFA	acido trifluoroacetico
TNBS	acido 2,4,6-trinitro-benzensolfonico
TNF	Tumor Necrosis Factor (fattore di necrosi tumorale)
TRIS	tris-(idrossimetil)-amminometano
UTP	uridina trifosfato
UV	ultravioletto
V_D	volume di distribuzione apparente
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (fattore di crescita dell'endotelio vascolare)
VPF	Vascular Permeability Factor (fattore di permeabilità vascolare)
\varnothing	diametro

2. Summary

Anticancer drugs are very active molecules but they present limits that often prevent their success in chemotherapy. Most common problems are low half-life, due to rapid kidney clearance and to rapid inactivation by metabolic enzymes, and low selectivity towards cancer cells that causes severe side effects.

The aim of this PhD thesis is to overcome some of the limits of anticancer drugs, especially the low molecular weight ones. In particular, some polymeric conjugates were prepared by linking an anticancer drug to a polymer that acts like a carrier. In fact, polymeric conjugation allows to improve drug pharmacokinetic profiles, by reducing drug clearance, and protects the drug from enzymatic degradation and can target the linked drug to tumour tissues. Two mechanisms allow to reach this last goal, a passive targeting mechanism, as consequence of high molecular weight molecules accumulation in tumour tissue, thanks to the EPR (Enhanced Permeability and Retention) effect, or an active targeting mechanism, reached by the presence of a targeting molecule in the drug-polymer conjugate construct. This targeting agent interacts with specific receptors over-expressed in cancer cells.

In this work poly-(ethylene glycol), a linear synthetic polymer with low polydispersivity, was chosen as polymeric carrier. It's one of the most employed polymers in drug delivery thanks to its characteristics, such as no toxicity, biocompatibility and its approval by FDA for human use.

The anticancer drugs that were studied in this work are: gemcitabine, an antimetabolite drug used especially in the therapy of solid tumors and leukaemia, and epirubicin, an anthracycline with anticancer activity similar to doxorubicin.

The following conjugates were prepared:

1. mPEG-gemcitabine conjugates: gemcitabine was conjugated to monomethoxy-poly-(ethylene glycol) (mPEG), with different molecular weights (5 and 20 kDa) and shapes (linear and branched), by an amide bond between the aromatic -NH₂ group of the drug and the carboxylic group of the polymer. Conjugates, purified by chromatography technique and characterized by UV-Vis spectrophotometry, ¹H-NMR spectroscopy and RP-HPLC, were submitted to stability studies in buffer at different pH values, in plasma and towards cytidine-deaminase enzyme.

Finally, their pharmacokinetic behaviour and their activity in HL-60, HeLa, HT-29 and MCF-7 cell lines were studied too.

2. folate-PEG-(gemcitabine)_n conjugates: using an heterobifunctional PEG (NH₂-PEG₄₈₀₀-COOH) conjugates with drug at one side chain and with folic acid as targeting agent at the other side were prepared. Folic acid in fact recognises specific membrane receptors (FR) that are over-expressed in the cells of some solid tumors, allowing to target conjugates by an active mechanism. To improve the number of drug molecules per polymer chain L-2-amminoadipic acid (AD) or β-glutammic acid (βGlu), as branching molecules, was coupled to folate-PEG-COOH. This allowed to double the number of gemcitabine molecules per polymer chain. Stability at different pH values and in plasma, pharmacokinetic behaviour in mice and antiproliferative activity in KB-3-1 cell line, that over-expressed folic acid receptors, of conjugates were studied.

3. epirubicin-PEG-(folate)_n conjugates: this new branched architecture based on PEG was prepared starting from an heterobifunctional PEG (HO-PEG-COOH), by linking the branching moiety L-2-amminoadipic acid (AD) to the carboxylic group, increasing the number of linked folic acid molecules per polymer chain. Epirubicin was coupled to the hydroxyl group of PEG. The aim of the preparation of these structures is studying the influence of the number of folic acid molecules in the targeting action. Analogous conjugates were also prepared without folic acid and used as control. In this case the conjugates ended with free -COOH groups instead of folic acid, allowing to study a possible charge effect in the biologic behaviour of the conjugates. In this case the antiproliferative activity studies were carried out on different cell lines, without folic acid membrane receptors (A549), with folic acid receptors (HeLa) and with over-expression of these (KB-3-1). Cellular uptake of conjugates by flow cytometry technique and also intracellular localization by confocal microscopy were studied. The study demonstrated the usefulness of folic acid as targeting agent, in fact conjugates were able to direct the drug activity selectively on the cell line expressing the folic acid receptor.

2. Riassunto

I farmaci antitumorali sono molecole molto potenti ma che a tutt'oggi presentano ancora limiti tali da ridurre le probabilità di successo nella chemioterapia. Tra i problemi più comuni si riscontrano una ridotta emivita, sia per una rapida *clearance* renale sia per una rapida inattivazione da parte di enzimi degradativi, ma soprattutto scarsa selettività verso le cellule malate con conseguente insorgenza di effetti tossici talora gravi.

Lo studio svolto in questa tesi di dottorato ha come scopo il superamento di alcuni limiti di farmaci antitumorali, con particolare riguardo a quelli a basso peso molecolare. In particolare sono stati sintetizzati alcuni coniugati polimerici nei quali il farmaco antitumorale è stato covalentemente legato a un polimero con funzione di *carrier*. La coniugazione di polimeri permette infatti di migliorare il profilo farmacocinetico dei farmaci, di aumentarne la solubilità, di proteggerli dalla degradazione enzimatica e di poterli direzionare verso il tessuto tumorale. Quest'ultimo obiettivo può essere raggiunto o con un meccanismo di *targeting* passivo, in quanto i coniugati polimerici ad elevato peso molecolare si accumulano nel sito tumorale grazie all'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*), o con un meccanismo di *targeting* attivo per la contemporanea coniugazione al derivato farmaco-polimero di una molecola *target*, la quale è riconosciuta da recettori specifici sovraespressi in alcune cellule tumorali.

Nel nostro caso il *carrier* polimerico impiegato nella sintesi dei coniugati è stato il poli(etilenglicole) (PEG), un polimero sintetico lineare a bassa polidispersività costituito dalla ripetizione di unità ossietileniche. Le sue caratteristiche lo rendono infatti uno dei polimeri più utilizzati nel campo del *drug delivery*, in quanto è atossico, biocompatibile, è già approvato dalla FDA come costituente di cibi, cosmetici e preparazioni farmaceutiche anche per via sistemica.

I farmaci antitumorali oggetto di questo lavoro sono stati: gemcitabina, un derivato nucleosidico utilizzato prevalentemente nella cura di tumori solidi e leucemie, ed epirubicina, antibiotico antraciclinico ad attività antineoplastica simile a quella di doxorubicina.

Su questa linea sono stati sintetizzati i seguenti coniugati:

1. derivati mPEG-gemcitabina: gemcitabina è stata covalentemente legata a monometossi-poli-etilenglicole (mPEG), a diverso peso molecolare (5 e 20 kDa) e a diversa struttura (lineare e ramificata), mediante legame ammidico tra il gruppo NH₂ aromatico del farmaco e il gruppo

carbossilico del polimero, attivato come estere attivo. Sui coniugati, opportunamente purificati attraverso cromatografia e caratterizzati mediante spettrofotometria UV-Vis, spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ e cromatografia RP-HPLC, sono stati condotti studi di stabilità a diverso pH, in plasma e in presenza dell'enzima citidin-deaminasi. Infine ne è stata studiata la farmacocinetica e l'attività in cellule HL-60, HeLa, HT-29 e MCF-7.

2. derivati folato-PEG-(gemcitabina)_n: impiegando un PEG eterobifunzionale ($\text{NH}_2\text{-PEG}_{4800}\text{-COOH}$) è stato possibile legare ad una estremità della catena polimerica il farmaco e dall'altra, quale gruppo direzionante, l'acido folico. L'acido folico offre infatti la possibilità di riconoscere recettori di membrana (FR) sovraespressi dalle cellule di alcuni tumori solidi, permettendo così di direzionare i coniugati mediante meccanismo di *targeting* attivo. Allo scopo di aumentare il numero di molecole di farmaco legate alla singola catena polimerica sono stati coniugati a folato-PEG-COOH acido L-2-amminoadipico (AD) o acido β -glutammico (βGlu) impiegati come molecole ramificanti. Questo ha permesso di raddoppiare il numero di molecole di farmaco per catena polimerica. Sui coniugati sono stati condotti studi di stabilità a diverso pH e in plasma, studi farmacocinetici in topi e di vitalità cellulare sulla linea KB-3-1, cellule che sovraesprimono i recettori per il folato.

3. derivati (folato)_n-PEG-epirubicina: questa nuova architettura ramificata a base PEG è stata sintetizzata a partire dal polimero eterobifunzionale (HO-PEG-COOH), legando alla funzione carbossilica l'agente ramificante acido L-2-amminoadipico (AD) per il legame di più molecole di folato, e alla funzione ossidrilica epirubicina. Con questa struttura si è voluto verificare l'influenza del numero di molecole di agente direzionante sul riconoscimento da parte dei recettori. Sono stati inoltre preparati degli analoghi coniugati, privi però dell'acido folico e pertanto con il gruppo carbossilico libero, per valutare l'eventuale effetto di carica sul comportamento biologico. In questo caso sono stati condotti studi di citotossicità su diverse linee cellulari caratterizzate dall'assenza di recettori di membrana per l'acido folico (A549) e dalla loro presenza (HeLa) o dalla loro sovraespressione (KB-3-1). La fluorescenza di epirubicina ha anche permesso di verificare l'internalizzazione dei coniugati stessi mediante citofluorimetria di flusso e la localizzazione cellulare mediante microscopia confocale. Con questo studio si è verificata l'utilità di acido folico quale direzionante. Infatti i coniugati targettati erano in grado di rivolgere l'attività del farmaco selettivamente sulla linea cellulare con espressione dei recettori per l'acido folico.

3. Introduzione

3.1 Terapia antitumorale

Le patologie tumorali rappresentano oggi una delle principali cause di morte e, solo negli Stati Uniti, vengono diagnosticati un milione di nuovi casi ogni anno [1]. Per cercare di risolvere questo problema si stanno approfondendo approcci terapeutici [2], quali:

- sviluppo di nuovi agenti antineoplastici [3] selezionati mediante un accurato processo di *screening* fra composti naturali o sintetici, e recentemente anche attraverso la chimica combinatoriale, che permette di identificare farmaci grazie alla scoperta di nuovi bersagli risultato di una più ampia conoscenza delle basi molecolari del cancro;
- identificazione di nuovi bersagli per la chemioterapia [4,5], quali il meccanismo dell'apoptosi, i segnali di trasduzione, la vascolarizzazione tumorale e l'angiogenesi;
- sviluppo della *gene therapy* e di oligonucleotidi antisenso [6], per l'introduzione di "vaccini antitumorali" o di enzimi che possano attivare un profarmaco antitumorale;
- miglioramento della veicolazione e dei sistemi di trasporto di farmaci [7], come liposomi, immuno-coniugati e coniugazione a polimeri.

Con le scoperte di nuovi agenti antitumorali sono già aumentate le probabilità di guarigione, ma a causa della loro bassa selettività per le cellule cancerose, si hanno ancora grossi problemi irrisolti. Questi farmaci, infatti, sono spesso molto potenti ma sono dotati di scarsa specificità causando la distruzione non solo delle cellule malate ma anche di quelle sane. Inoltre proprio la ridotta specificità costringe ad impiegarli a dosi elevate, con conseguente incidenza di gravi effetti tossici. Un altro problema è l'insorgenza di resistenza al farmaco in quanto le cellule spesso sviluppano resistenza, anche crociata, verso altri antitumorali, vanificando così le possibilità di intervento. Infine gli stessi agenti chemioterapici possono diventare a loro volta mutageni e cancerogeni, a causa di modificazioni che subiscono all'interno dell'organismo.

Per superare queste ed altre limitazioni sono stati sviluppati vari sistemi di *drug delivery*, un campo in rapida evoluzione a cui si fa sempre più ricorso per massimizzare le potenzialità degli agenti terapeutici stessi. Il *drug delivery* si può servire di vari strumenti: micro- e nanoparticelle, liposomi, rilascio da matrici o gel, associazioni con ciclodestrine e coniugazioni con

polimeri, naturali o sintetici. Sistemi di *drug delivery* sono già comparsi sul mercato, ad esempio le preparazioni a base di liposomi, quali il DaunoXome™ (http://www.gilead.com/wt/tert_uk/daunoxome_uk) e il Doxil®/Caelyx® (<http://www.doxil.com>) [8,9], i coniugati farmaco-antibiotico, quali il Mylotarg® (<http://www.pharmacist.com/pdf/mylotarg.pdf>) [10] e vari coniugati polimerici a farmaci a basso peso molecolare o proteine [11-15]. Gli incoraggianti risultati ottenuti nel campo delle nanotecnologie applicate alla medicina ha quindi permesso di fare passi avanti nella diagnosi e nel trattamento del cancro [16] e questi sistemi ibridi contenenti polimeri possono essere visti come la prima generazione di “*nanomedicine*” utili nel trattamento dei tumori [17].

3.2 Impiego di polimeri nel rilascio controllato di farmaci

I polimeri hanno un ruolo ben consolidato come materiali biomedici, ampiamente impiegati tra l'altro nelle protesi e lenti a contatto [18]; da non dimenticare, inoltre, il loro utilizzo come eccipienti farmaceutici in molte formulazioni [19]. Negli ultimi anni, l'importanza di sistemi polimerici per il rilascio controllato di farmaci è cresciuta esponenzialmente con l'avvento di formulazioni a base di coniugati polimerici [20] e di impianti biodegradabili. La somministrazione di farmaci veicolati con sistemi polimerici presenta numerosi vantaggi, in quanto consente somministrazioni meno frequenti e a dosi più basse per mantenersi sempre al di sotto della concentrazione minima tossica, evitando il tipico andamento “a dente di sega” che si registra nella somministrazione di farmaci classici; inoltre protegge il farmaco dall'inattivazione, prolungandone l'emivita plasmatica [21].

Il rilascio del farmaco dal polimero può essere regolato da un meccanismo fisico o chimico. Nei sistemi a rilascio controllato fisicamente, il farmaco è circondato da una membrana polimerica insolubile o uniformemente disperso in una matrice anch'essa polimerica e insolubile. Il rilascio avviene principalmente per diffusione. In alcuni casi il polimero può essere allo stato secco e, rigonfiandosi poi nell'organismo, permette il rilascio del farmaco; altre volte, soprattutto nei sistemi a membrana, è implicato un processo osmotico [22]. Nei sistemi in cui il rilascio è controllato chimicamente, il farmaco è legato covalentemente al polimero attraverso un legame biodegradabile o è disperso in una matrice polimerica bioerodibile. Sottoforma di impianti polimerici biodegradabili sono presenti sul mercato il Zoladex[®] (<http://www.zoladex.net>) ed il Lupron Depot[®] (<http://www.lupron.com>), impianti sottocutanei che rilasciano lentamente l'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante (LHRH) per il trattamento del cancro alla prostata ed altri tumori ormone-dipendenti [23], o il Gliadel[®] Wafer (<http://www.gliadel.com>), che impiantato chirurgicamente permette il rilascio di farmaci chemioterapici per il trattamento del tumore al cervello [24].

Esistono anche sistemi di veicolazione del farmaco che impiegano polimeri insolubili, adatti per il rilascio locale del principio attivo dopo inserimento della struttura *in situ*, quale l'Ocusert[®] [25].

Nella terapia antitumorale sta avendo un grande sviluppo la tecnica della bioconiugazione, in cui una macromolecola polimerica viene legata covalentemente al farmaco, ottenendo una nuova entità chimica con nuove caratteristiche [26].

3.2.1 Modello sperimentale di coniugato polimerico

In genere l'utilizzo di un *carrier* macromolecolare solubile per la somministrazione dei farmaci permette di modificarne le caratteristiche farmacocinetiche, senza però alterarne l'attività e la biodisponibilità nel sito bersaglio. Vengono perciò modificati l'emivita del farmaco, la sua distribuzione nei vari distretti corporei e la sua eliminazione.

Il concetto di *carrier* macromolecolare era già presente dall'inizio del secolo scorso, quando nel 1906 Ehrlich coniò il termine "pallottola magica" per indicare i trasportatori di farmaci ad elevato peso molecolare. L'uso di sistemi di trasporto di farmaci basati su polimeri sintetici idrosolubili, definiti "*polymeric drug carriers*", venne però proposto per la prima volta nel 1975 da Helmut Ringsdorf [27]. Egli suggerì di unire covalentemente il farmaco a catene polimeriche idrosolubili attraverso legami suscettibili di scissione idrolitica o enzimatica nel sito bersaglio.

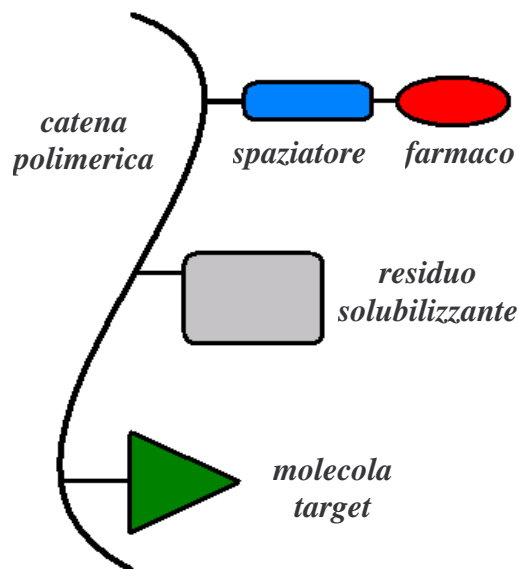


Figura 3.1: Modello di bioconiugato polimerico

Il modello proposto da Ringsdorf, schematizzato in figura 3.1, è costituito da:

- un *carrier* polimerico idrosolubile inerte (*polymer backbone*), che deve avere caratteristiche tipiche (vedi paragrafo 3.2.2);
- uno spaziatore biodegradabile interposto fra il polimero e il farmaco in grado di dare un legame sensibile di idrolisi chimica o enzimatica solo nel sito d'azione, rilasciando il principio attivo (*intracellularly cleavable linker*);
- il farmaco (*drug molecule*), covalentemente legato al *linker*;

- può essere presente anche un residuo direzionante (*targeting moiety*), legato alla struttura polimerica, che ne promuove il direzionamento e l'*uptake* specifico alle cellule target, riducendo al minimo le interazioni non specifiche;
- possono anche essere presenti dei gruppi funzionali additivi che influenzano la solubilità del coniugato (*solubilizer*).

3.2.2 Caratteristiche del *carrier* polimerico

Seguendo il modello di Ringsdorf [27,28] sono stati sperimentati vari polimeri, sia naturali che sintetici, per il *drug delivery* ed è stato perciò possibile individuare i requisiti che dovrebbe avere un *carrier* ideale:

- il polimero deve essere biocompatibile e non indurre tossicità significativa o immunogenicità;
- deve essere biodegradabile, per via idrolitica o enzimatica, od altrimenti con peso molecolare non superiore a 40 kDa, per poter essere facilmente eliminato per via renale o epatica, senza dare fenomeni di accumulo;
- deve essere poco polidisperso;
- il polimero deve essere reperibile in larga scala e a basso costo e sintetizzabile con processi economici;
- deve essere idrofilo, per garantire la solubilità nei liquidi fisiologici e per aumentare la solubilità del farmaco legato;
- deve possedere dei gruppi funzionali che permettano di legare facilmente il farmaco e il residuo di *targeting* con reazioni chimiche semplici che non comportino tossicità o immunogenicità;
- il legame con il farmaco deve essere sufficientemente stabile nel circolo ematico e facilmente idrolizzabile nelle cellule bersaglio, in modo da avere un rilascio controllato del farmaco;
- il coniugato deve presentare una sufficiente capacità di trasporto, in modo da assicurare la quantità adeguata di farmaco nel sito d'azione;
- il coniugato deve avere un peso molecolare tale da assicurare l'accumulo nel tessuto tumorale grazie all'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) e l'eccesso di farmaco deve essere eliminato rapidamente senza giungere in siti dove può esercitare un'azione tossica;

- la produzione industriale del coniugato deve essere riproducibile ed economica e la sua caratterizzazione analitica deve essere completa e convalidata;
- le caratteristiche del coniugato devono essere tali da consentire una formulazione adeguata che assicuri una buona stabilità e una facile somministrazione.

3.2.3 Problemi e vantaggi della bioconiugazione

La bioconiugazione è una strategia particolarmente promettente per aumentare l'efficacia dei farmaci iniettabili, poiché permette di ottenere nuove entità chimiche con particolari caratteristiche chimico-fisiche e biologiche che influenzano positivamente la farmacocinetica e la farmacodinamica del farmaco stesso.

Ci sono però ancora vari problemi da superare prima di ottenere il bioconiugato ideale. Fra gli obiettivi da raggiungere possiamo ricordare: il miglioramento della chimica di legame, in modo che l'attivazione e la coniugazione non influenzino le proprietà del polimero e che il sito attivo del farmaco rimanga disponibile; lo sviluppo di metodi analitici per la caratterizzazione del coniugato tal quale e dei suoi componenti; l'ottenimento di polimeri ben caratterizzati e con bassa polidispersività, se possibile, già approvati dalla FDA o sul punto di diventarlo.

La bioconiugazione è comunque caratterizzata da numerosi vantaggi, fra cui:

- 1) mascheramento dei siti antigenici del farmaco, soprattutto per quanto riguarda farmaci proteici, con conseguente ridotta captazione da parte del sistema immunitario;
- 2) riduzione dell'escrezione renale, dovuta all'elevato volume idrodinamico;
- 3) maggiore emivita plasmatica;
- 4) maggiore solubilità di farmaci normalmente poco solubili, come il tassolo o il metotressato;
- 5) direzionamento specifico del farmaco nel tessuto tumorale grazie alla presenza di *targeting residues*;
- 6) rilascio del farmaco nel tessuto tumorale per effetto EPR (vedi paragrafo 3.2.4.1);
- 7) possibilità di somministrazioni meno frequenti e a dosi più basse;
- 8) ridotta tossicità sistemica;
- 9) maggiore *compliance* del paziente;
- 10) nuovo meccanismo per l'entrata del farmaco nelle cellule (vedi paragrafo 3.2.4.2).

Il vantaggio principale è comunque la capacità di direzionare e rilasciare il farmaco solo nel sito bersaglio, sfruttando le caratteristiche proprie del tessuto tumorale e del legame polimero-farmaco [29].

3.2.4 Targeting

Una delle cause principali della tossicità dei farmaci antineoplastici è la loro scarsa selettività per le cellule tumorali. Agendo indistintamente anche sulle cellule sane, danno infatti luogo a tutta una serie di effetti collaterali, quali nausea, vomito, diarrea, febbre, alopecia, e in alcuni casi anche effetti più gravi, quali tossicità a livello epatico o cardiaco [30]. Ottenere un farmaco che agisca in modo selettivo solo nel sito bersaglio è la sfida terapeutica a cui i ricercatori volgono i loro sforzi. Per raggiungere questo obiettivo con la coniugazione polimerica si possono seguire due strade:

- *targeting* passivo: avviene per effetto di proprietà intrinseche alla molecola polimerica che facilitano la diffusione passiva verso la massa tumorale e la sua permanenza. Si basa sull'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) e sul meccanismo di *uptake* per endocitosi;
- *targeting* attivo: consiste nell'inserire nella catena polimerica un gruppo o una molecola direzionante che, grazie alle sue interazioni, riesce a veicolare il farmaco nel sito d'azione.

3.2.4.1 Effetto EPR

Si è osservato che, mentre le sostanze a basso peso molecolare generalmente si distribuiscono indifferentemente nei tessuti sani e malati, i farmaci macromolecolari come pure macromolecole naturali come l'albumina, non essendo in grado di extravasare, si accumulano passivamente solo nella massa tumorale. Questo fenomeno è stato osservato per la prima volta da H. Maeda, il quale l'ha definito "*Enhanced Permeability and Retention effect*", più comunemente noto come effetto EPR [31] (figura 3.2).

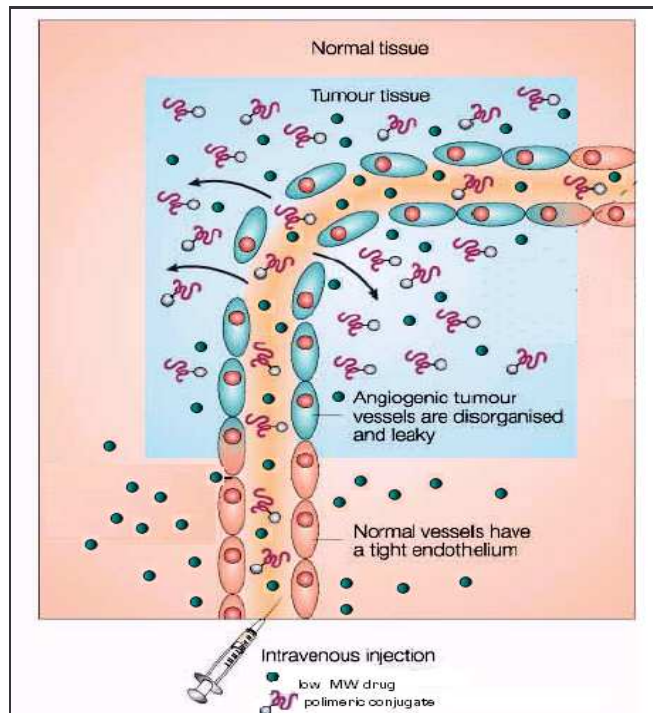


Figura 3.2: Effetto EPR

L'effetto EPR è dovuto a:

- un'aumentata permeabilità vascolare (*Enhanced Permeability*) rispetto al tessuto sano, dovuto a:
 - 1) una irregolare architettura dei vasi sanguigni [32], che presentano un endotelio discontinuo;
 - 2) una maggiore produzione di mediatori vascolari che facilitano l'extravasazione, fra cui bradichinina, prostaglandine, NO, perossinitrito, VEGF/VPF (*vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor*) [33];
 - 3) un'attiva angiogenesi che garantisce al tumore il giusto apporto di ossigeno e sostanze nutritive necessarie alla replicazione cellulare e quindi alla crescita del tumore.

Tutti questi fattori permettono una massiccia extravasazione nel tessuto tumorale di macromolecole e piccole particelle, con massa compresa fra 20 e 800 kDa [2].
- un ridotto drenaggio del sistema linfatico nel tessuto tumorale (*Enhanced Retention*) che riduce la *clearance* delle macromolecole con conseguente accumulo nel tessuto stesso [34].

Sfruttando queste caratteristiche si possono veicolare selettivamente farmaci antitumorali tramite bioconiugazioni con polimeri ad elevato peso molecolare, limitandone la diffusione nei tessuti sani che, essendo irrorati da vasi a struttura meno permeabile, non vengono raggiunti dal

coniugato. Il farmaco si accumula quindi nelle cellule tumorali, dove viene rilasciato ad opera di specifici enzimi lisosomiali o dal basso valore di pH.

3.2.4.2 Uptake per endocitosi

Le molecole a basso peso molecolare possono penetrare nelle cellule dell'organismo per semplice diffusione. Quando iniettato per via endovenosa, il farmaco in breve tempo lascia i vasi sanguigni raggiungendo pertanto indistintamente tutti i distretti dell'organismo. Questo comporta un necessario incremento della dose e la comparsa di effetti tossici. Iniettando invece un bioconiugato polimerico del farmaco, il danno viene di gran lunga limitato, grazie all'elevato peso molecolare che, oltre a favorire l'accumulo nei tumori solidi per l'effetto EPR sopradescritto, consente di limitare l'*uptake* cellulare al solo meccanismo dell'endocitosi [26].

A seconda della struttura dei coniugati, e quindi dell'interazione che instaurano con la membrana plasmatica, si possono avere 3 meccanismi diversi di pinocitosi:

1. a fase fluida;
2. per adsorbimento;
3. mediata da recettori [28].

Nella pinocitosi a fase fluida o aspecifica, non si instaura alcuna interazione con la membrana plasmatica ed è la concentrazione dell'addotto nel fluido extracellulare che determina la velocità e l'entità del processo. La pinocitosi per adsorbimento si verifica invece in seguito ad interazioni non specifiche con la membrana, dovute alla presenza di gruppi idrofobici o di cariche positive sulla superficie del coniugato. Si ottiene invece una pinocitosi mediata da recettore quando alla macromolecola vengono legati dei residui complementari a recettori o antigeni di superficie: in questo modo il coniugato viene riconosciuto solo dalle cellule bersaglio ed endocitato.

I tre diversi processi sono schematizzati in figura 3.3.

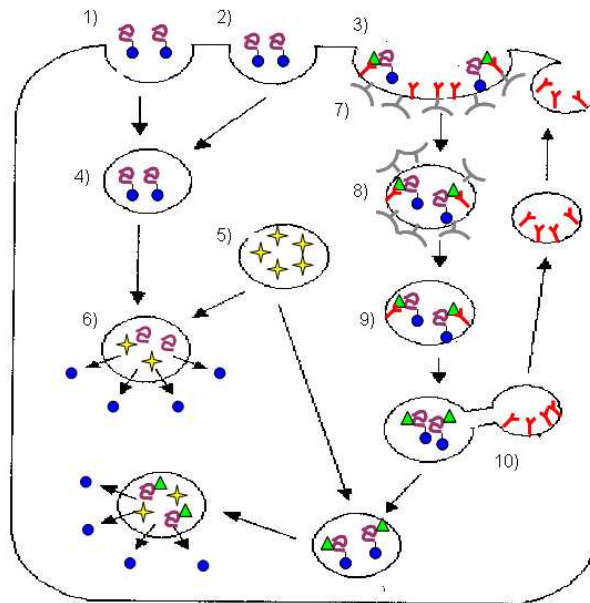


Figura 3.3: Meccanismi di uptake per endocitosi

La pinocitosi in fase fluida (1) e per adsorbimento (2) ha inizio con l'invaginazione della membrana plasmatica e la formazione di vescicole contenenti le sostanze presenti nel fluido extracellulare o in prossimità della membrana. Queste vescicole vengono trasportate nel compartimento endosomiale (4), dove il pH leggermente acido (pH ~ 6) può favorire un primo rilascio del farmaco per rottura dei legami sensibili a questo ambiente. In seguito l'endosoma si fonde con un lisosoma primario (5) per dare un lisosoma secondario (6), dove l'ambiente più acido (pH 4.5-5.5) e la presenza di numerosi enzimi in grado di scindere legami covalenti causano il distacco del farmaco dal *carrier* polimerico. Il farmaco libero, a differenza dell'addotto macromolecolare, può quindi diffondere attraverso la membrana lisosomiale, passare nel citoplasma ed esplicare la sua azione farmacologica. Nel caso della pinocitosi mediata da recettore (3), opportuni gruppi presenti nel farmaco o nel *carrier* vengono riconosciuti dai recettori cellulari (Y), che si trovano in fossette rivestite da clatrina (⌘) ed internalizzati per invaginazione della membrana (7). Si forma così un endosoma primario (8) che in seguito perde il rivestimento di clatrina per dare il CURL (*Compartment for Uncoupling Receptor and Ligand*) (9), in cui si ha la separazione dei ligandi dai recettori, che una volta liberi tornano sulla superficie (10). L'endosoma contenente gli addotti si fonde con i lisosomi dando un lisosoma secondario da cui il farmaco, liberato dal *carrier* per rottura del legame, diffonde nel citoplasma.

3.2.4.3 Targeting attivo

Oltre ai meccanismi di *targeting* passivo appena descritti, il bioconiugato può essere direzionato selettivamente al tessuto tumorale con un meccanismo di *targeting* attivo. Legando un gruppo direzionante alla struttura polimerica si favorisce l'*uptake* da parte delle cellule che presentano recettori superficiali in grado di riconoscerlo favorendone l'ingresso attraverso pinocitosi mediata da recettore. Onde sfruttare questa via, da tempo si stanno cercando residui che siano riconosciuti esclusivamente da cellule tumorali. Fra gli agenti direzionanti più studiati, vi è l'acido folico, una vitamina i cui recettori sono sovraespressi in numerosi tipi di tumori (vedi paragrafo 3.6) od il peptide RGD [35].

3.2.5 Rilascio del farmaco dal bioconiugato

Il rilascio dell'agente chemioterapico dal bioconiugato può avvenire in seguito a:

- idrolisi passiva,
- idrolisi pH-dipendente,
- idrolisi enzimatica.

Il rilascio può essere controllato scegliendo lo spaziatore più appropriato da interporre fra polimero e farmaco, in modo da ottenere un legame stabile per il tempo di permanenza in circolo, ma sufficientemente labile a livello intracellulare dove il farmaco deve esplicare la sua azione.

L'idrolisi passiva riguarda soprattutto quei legami più sensibili alla normale azione idrolitica, quali esteri, ammidi, carbonati ed uretani. La velocità di rilascio sarà dipendente dalla stabilità dei legami stessi, sarà maggiore per gli esteri, gruppi molto sensibili all'idrolisi, e diminuirà, nell'ordine, per carbonati, uretani e ammidi.

L'acidità presente nei compartimenti endosomiali e lisosomiali (pH 4.5-5.5) e, in alcuni tipi di tumori, anche a livello extracellulare, può essere sfruttata per un'idrolisi dipendente dal pH, legando il farmaco al polimero attraverso un opportuno *linker* sensibile a questo ambiente [26,36].

Infine l'idrolisi enzimatica è invece sfruttata nei coniugati inserendo uno spaziatore che sia substrato per i numerosi enzimi presenti nei compartimenti lisosomiali, come fosfatasi, esterasi, glicosidasi e peptidasi [37,38]. Questi enzimi sono presenti in tutte le cellule ma sono sovraespressi nei tumori in fase di metastasi. Sono stati studiati vari spaziatori peptidici, con

sequenze amminoacidiche scelte per l'uno o l'altro enzima. In particolare in letteratura sono riportati coniugati polimerici sensibili alle catepsine, peptidasi cisteina-dipendenti presenti in gran quantità e con elevata attività a livello lisosomiale [29]. Uno dei substrati più studiati a questo scopo è il tetrapeptide glicina-fenilalanina-leucina-glicina (Gly-Phe-Leu-Gly).

3.2.6 Polimeri impiegati come *drug carriers*

I polimeri impiegati come *drug carriers* si distinguono principalmente in due categorie: polimeri naturali, a volte parzialmente modificati chimicamente, e polimeri sintetici.

I primi, per lo più polisaccaridi e poliamminoacidi, hanno il vantaggio di essere biodegradabili e quindi facilmente eliminabili dall'organismo senza dare problemi di accumulo. Il legame con il farmaco può però ridurre la sensibilità del polimero all'azione degradativa degli enzimi, rendendolo meno biodegradabile [39]. Un grosso problema di questi polimeri è che sono spesso immunogenici [40]. Alcuni di questi polimeri possono presentare già di per sé una certa attività, o per azione diretta sulle cellule tumorali o per stimolazione del sistema immunitario [41]. Fra i polimeri di origine naturale possiamo citare:

➤ DNA: ha la caratteristica di rimanere integro durante la permanenza in circolo [42,43], di essere interiorizzato nelle cellule per endocitosi e di essere idrolizzato solo a livello lisosomiale. È in uso come *drug carrier* dagli inizi degli anni '70. In particolare sono stati studiati dei complessi del DNA con adriamicina o daunomicina, che hanno dimostrato risultati soddisfacenti nel trattamento di leucemie e di alcuni tumori solidi [44].

➤ Destano: è un polisaccaride di origine batterica, utilizzato principalmente come *blood expander*. Trova un uso limitato come *drug carrier* a causa della sua polifunzionalità, che permette di legare il farmaco ma con formazione di miscele complesse ed eterogenee [29]. Inoltre la sua origine batterica può portare a problemi di immunogenicità [45].

➤ Albumina: essendo una molecola endogena, è caratterizzata da una bassa tossicità e da una buona stabilità. Inoltre viene idrolizzata a livello lisosomiale e lega facilmente farmaci [46], aumentandone l'emivita plasmatica e l'attività.

I polimeri sintetici invece sono i più utilizzati perché, cambiando il monomero o il tipo di sintesi, si possono ottenere macromolecole con le caratteristiche volute: peso molecolare, composizione chimica, ed è inoltre possibile funzionalizzare la catena con una chimica relativamente semplice. Non sempre hanno la caratteristica di essere biodegradabili, e quindi è

necessario utilizzare catene polimeriche con un peso molecolare inferiore alla soglia di eliminazione renale. In questo caso la permanenza in circolo è legata al loro peso molecolare o meglio al loro volume idrodinamico. Tra i più utilizzati si può citare:

➤ Poli-lisina: è un polimero ottenuto per formazione di legami peptidici tra gruppi carbossilici e gruppi α -amminici dell'amminoacido lisina lasciando così liberi i gruppi amminici in posizione ϵ sfruttabili per coniugare il farmaco. I gruppi ϵ -amminici conferiscono inoltre al polimero una forte attività antibatterica, antivirale e antitumorale per interazione con le membrane cellulari, anche se la scarsa specificità d'azione ne limita fortemente l'uso come farmaco tal quale;

➤ SMA: è un copolimero formato da unità di stirene e anidride maleica. È stato ampiamente usato per derivatizzare il farmaco proteico antitumorale neocarzinostatina, dando il coniugato SMANCS utilizzato nel trattamento del carcinoma epato-cellulare [47,48]. La proteina viene così protetta dalla degradazione e resa meno immunogenica. Il coniugato ha una massa più voluminosa per cui il tempo di permanenza all'interno del tumore viene aumentato, inoltre presenta una carica negativa sulla superficie che favorisce l'interazione con la membrana plasmatica favorendone l'endocitosi e riducendone l'escrezione renale;

➤ HPMA (o poli-idrossipropilmetacrilamide): è il polimero dell'acido metacrilico. Non essendo biodegradabile viene utilizzato con peso molecolare inferiore a 45 kDa in modo da poter essere escreto per via renale senza dare problemi di accumulo [49]. Questo polimero aumenta la solubilità in acqua del farmaco legato, ne garantisce la stabilità e ne diminuisce la tossicità, inoltre permette la somministrazione di dosi minori e meno frequenti grazie alla ridotta escrezione renale e alla diminuita inattivazione. Sono stati preparati vari coniugati polimero-farmaco impiegando HPMA, che si sono rivelati molto interessanti in terapia, in quanto hanno permesso di aumentare la solubilità in acqua (es. tassolo); garantirne la stabilità in circolo (es. camptotecina); ridurre la tossicità, causata dalla presenza di farmaco libero in distretti diversi dal tumore (es. cardiotoxicità di doxorubicina) [50]; direzionarlo in modo specifico grazie al legame covalente con residui di *targeting* che vengono specificamente riconosciuti; somministrarlo in dosi minori e meno frequentemente, grazie alla ridotta escrezione renale e alla diminuita inattivazione;

➤ PEG (o poli-etilenglicole): vedi paragrafo 3.3.

3.3 Poli-(etilenglicole) o PEG

3.3.1 Caratteristiche generali

Poli-(etilenglicole) o PEG [51] è un polimero anfifilico sintetico costituito dalla ripetizione di unità ossietileniche (PM = 44 Da) (figura 3.4), che si ottiene per polimerizzazione anionica dell'ossido di etilene.



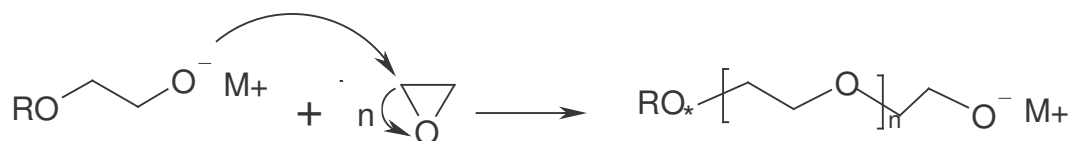
Figura 3.4: Struttura del poli-(etilenglicole)

La sintesi prevede l'iniziale attacco di un nucleofilo all'ossido di etilene, conseguente apertura dell'anello epossidico e formazione di un ossigeno reattivo che a sua volta coinvolge altre molecole epossidiche in una reazione a catena bloccata infine da un terminatore (figura 3.5).

Iniziazione



Propagazione



Terminazione



Figura 3.5: Sintesi di poli-(etilenglicole)

Il tipo di polimero risultante dipende dall'iniziatore usato: in soluzione acquosa l'ossido di etilene reagisce con un anione ossidrilico ottenendo PEG-diolo, bifunzionale ($\text{HO}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n\text{H}$); in presenza di un anione metossi, in solvente organico per N,N'-dimetilformamide, si ottiene il monometossi-PEG (mPEG), monofunzionale ($\text{CH}_3\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n\text{H}$); infine impiegando un iniziatore bi- o poli-funzionale si ottengono polimeri ramificati. Modulando opportunamente la reazione di polimerizzazione, si ottengono catene polimeriche a diverso peso molecolare, da 1000 a 50000 Da, caratterizzate da un basso indice di polidispersività Q (M_w/M_n): è compreso fra 1.01, per catene inferiori a 5 kDa, e 1.1, per catene fino a 50 kDa.

PEG è un polimero ideale per bioconiugazioni, poiché è biocompatibile, non tossico né allergenico o immunogenico [52], non è carico e avendo un solo gruppo funzionale ha una chimica pulita. È solubile sia in soluzione acquosa che organica da cui precipita con aggiunta di etere ed esano [53,54]. Ha però il difetto di non essere biodegradabile e viene pertanto usato a pesi molecolari inferiori a 40 kDa per poter essere eliminato per via renale o epatica, senza dare accumulo [55]. E' facilmente reperibile in commercio, a basso costo ed è disponibile in un vasto range di pesi molecolari e strutture. Queste caratteristiche favorevoli ne permettono l'uso in campo biomedico e infatti la *Food and Drug Administration* (FDA) ne ha approvato l'impiego come costituente di cibi, cosmetici e preparazioni farmaceutiche iniettabili, topiche, rettali e nasali.

3.3.2 Usi ed applicazioni

Per le sue diverse caratteristiche, il PEG viene impiegato in molteplici applicazioni, non solo in ambito farmaceutico [56].

Possiede un elevato volume idrodinamico grazie alla sua flessibilità e alla notevole capacità di coordinare molecole d'acqua [57]. Viene sfruttato assieme al destrano nella tecnica di purificazione detta “*two phases partitioning*”: entrambi questi polimeri sono infatti “avid” di acqua perciò, se mescolati in soluzione acquosa, formano un sistema a due fasi distinte che permette di separare, ad esempio, DNA, più affine per la soluzione di destrano, da proteine, più affini alla soluzione di PEG.

Può essere presente in due forme: una a zig-zag, detta *random*, e una ciclica, detta *meander*. Quest'ultima permette la formazione di complessi con metalli di transizione, dando al

PEG la caratteristica di chelante, che viene sfruttata per trasferire i metalli in fase organica consentendo un nuovo tipo di catalisi, detta catalisi a trasferimento di fase.

Il PEG viene anche impiegato per la precipitazione di proteine e acidi nucleici dalle soluzioni acquose, per la sintesi di peptidi e oligonucleotidi in fase liquida e solida, per la catalisi enzimatica in solvente organico, per indurre la fusione cellulare, per rendere biocompatibile la superficie di materiali cui è legato, riducendone la trombogenicità e l'adesione a specie cellulari e proteiche, e per la preparazione di prodotti cosmetici.

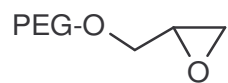
Negli ultimi anni il PEG ha trovato un ampio impiego in ambito farmaceutico per la preparazione di sistemi di *drug delivery* quali liposomi, nanoparticelle, nano- e micro-sfere, dendrimeri e idrogeli [58], e per la preparazione di profarmaci, attraverso la bioconiugazione di peptidi, proteine o farmaci a basso peso molecolare [59].

3.3.3 Chimica della coniugazione con PEG

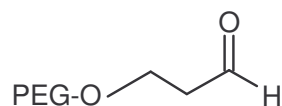
Poiché la funzione alcolica del PEG è scarsamente reattiva nelle condizioni usate per la bioconiugazione, il polimero deve essere funzionalizzato con agenti diversi a seconda del gruppo cui si deve legare: per la reazione con gruppi amminici si possono usare PEG-epossido, PEG-aldeide, PEG-paranitrofenilcarbonato e PEG-idrossisuccinimidato; per i gruppi tiolici si usano PEG-orto-piridindisolfuro e PEG-iodacetammide; per i gruppi ossidrilici si usa ancora PEG-COOH attivato con N-idrossisuccinimide, idrossibenzotriazolo o p-nitrofenil-cloroformiato (figura 3.6) [60].

Per il legame del PEG a peptidi e proteine si sfruttano i diversi gruppi funzionali presenti a livello dei vari aminoacidi. Tra questi i più reattivi, in condizioni blande di reazione, sono il gruppo tiolico di cisteina ed il gruppo amminico in α al polipeptide ed in ϵ di lisina. Cisteina però non compare frequentemente nelle proteine naturali e pertanto per un legame si sfruttano soprattutto le funzioni amminiche, che sono sempre presenti e numerose [57,60-62]. I gruppi carbossilici di acido aspartico e glutammico ed il gruppo C-terminale potrebbero anche essere sfruttati però possono facilmente dare reazioni di *cross-linking* con i gruppi amminici della proteina; il gruppo guanidinico di arginina è fortemente basico e presente in forma protonata ai valori di pH compatibili con la stabilità delle proteine; infine, le funzioni alcoliche di serina e treonina sono meno reattive ma possono essere sfruttate in particolari condizioni [63]. Il numero di catene polimeriche che si possono legare alla proteina dipende dalla sequenza aminoacidica e, per una stessa molecola, può variare a seconda delle condizioni di reazione.

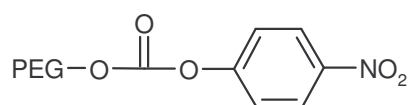
PEG-DERIVATI ATTIVI VERSO I GRUPPI AMMINICI



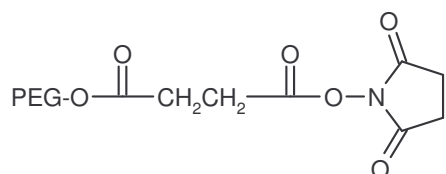
PEG-epossido



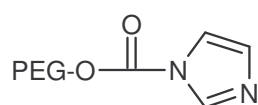
PEG-aldeide



PEG-paranitrofenilcarbonato

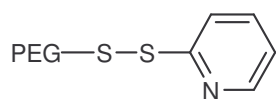


PEG-succinimidil-succinilato

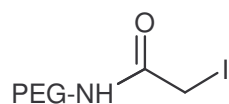


PEG-ossicarbonil-imidazolo

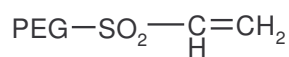
PEG-DERIVATI ATTIVI VERSO I GRUPPI TIOLICI



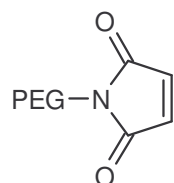
PEG-ortopiridil-disolfuro



PEG-iodacetammide



PEG-vinilsulfone



PEG-maleimide

Figura 3.6: PEG-derivati

La coniugazione con i farmaci impiega soprattutto mPEG, opportunamente attivato all'ossidrilico, in modo da evitare ponti e reticolazioni che porterebbero a prodotti non omogenei. La reazione di coniugazione avviene in condizioni piuttosto blande e compatibili con la stabilità del farmaco e con PEG attivato in modo da avere selettività verso un solo gruppo funzionale del farmaco. Nel caso della coniugazione a proteine ideali sono i PEG reattivi verso i gruppi sulfidrilici, perchè essendo poco rappresentati garantiscono un preciso grado di modifica. Tra i più usati a questo scopo il PEG-ortopiridil-disolfuro [64], il PEG-maleimmide e il PEG-vinilsulfone [65].

Oltre ai PEG lineari, sono disponibili anche PEG ramificati o *branched* in cui due catene di PEG sono legate ai due gruppi amminici di una lisina, per dare un composto con due catene polimeriche ed un solo gruppo reattivo. Con questi polimeri si ha così il cosiddetto "effetto ombrello", in cui le due catene di polimero schermano e proteggono la proteina o il farmaco ad esse legato in modo più completo rispetto a un PEG lineare di pari peso molecolare [29].

Interessanti poi i PEG eterobifunzionali che presentano ad un'estremità un estere N-idrossisuccinimidico e all'altra un gruppo con diversa reattività. Il secondo gruppo può essere vinilsulfonico o un'ammina protetta da un gruppo t-Boc o F-moc per evitare la reazione tra l'estere attivo e il gruppo amminico presente nella stessa od in un'altra molecola di PEG. Questi ultimi offrono la possibilità di condurre reazioni di *cross-linking* e coniugazione; inoltre i gruppi t-Boc e F-moc sono facilmente rimossi rispettivamente con acido trifluoroacetico (TFA) o piperidina [66].

3.3.4 PEGhilazione

Il PEG viene convenientemente usato per la bioconiugazione, poiché permette di modificare le caratteristiche chimico-fisiche e il profilo farmacocinetico e farmacodinamico dell'agente terapeutico, senza alterarne in modo drastico l'attività biologica [67,68]. In generale i farmaci PEGhilati mostrano:

- incremento dell'emivita plasmatica;
- ridotta escrezione renale e alterata biodistribuzione, dovuta soprattutto al diverso peso molecolare;
- ridotta degradazione idrolitica ed enzimatica;
- ridotta captazione da parte del sistema reticoloendoteliale [69];
- aumentata solubilità in acqua [56];

- ridotta immunogenicità ed antigenicità [52,70,71].

L'avvento della PEGhilazione, cioè della modifica delle molecole con il poli(etilenglicole), ha inizio nel 1977 quando Abuchowsky e collaboratori [61] dimostrarono che l'attacco covalente di PEG all'albumina bovina (BSA) alterava le proprietà immunologiche della proteina stessa. Gli stessi ricercatori dimostrarono che la coniugazione del PEG alla L-Asparaginasi di *Escherichia coli*, un enzima anticancro [72], produceva un derivato PEG-L-Asparaginasi non immunogenico. Successivi studi clinici permisero alla ditta Enzon la brevettazione e la commercializzazione del prodotto, con il marchio ONCASPAR[®]. Il vantaggio della modifica con il PEG è l'aumento del tempo di emivita plasmatica dovuto all'aumento del PM del coniugato e conseguentemente alla minore filtrazione glomerulare. Inoltre l'alta mobilità ed idrofilia delle catene del polimero alla superficie della proteina ne mascherano i residui amminoacidi con riduzione della proteolisi plasmatica, anche se si ha contemporaneamente una diminuzione dell'attività o del riconoscimento recettoriale della proteina.

La tecnica della PEGhilazione è stata inizialmente impiegata su peptidi e proteine, anche se non si è rivelata priva di problemi. È necessaria una chimica blanda, per non inattivare o denaturare la proteina; la presenza di numerosi gruppi funzionali dà origine a vari isomeri e quindi c'è la difficoltà di stabilire l'esatta posizione di legame con il polimero. Poiché è necessario lasciare inalterati i siti attivi della proteina, si deve ricorrere a particolari strategie che variano da proteina a proteina [29,60]. Nonostante ciò sono stati preparati numerosi coniugati, molti in avanzata fase di sperimentazione clinica e alcuni anche già in commercio con notevole successo (tabella 3.1). Fra questi ultimi possiamo ricordare il coniugato fra PEG e adenosindeaminasi bovina, commercializzata da Enzon, Inc. con il nome di ADAGEN[®] [12]. La carenza di questo enzima è responsabile di una grave sindrome di immunodeficienza combinata e la terapia con l'enzima nativo presenta vari problemi, fra cui l'insorgenza di infezioni ricorrenti e la breve emivita [29]. Il legame con PEG a peso molecolare 5 kDa dà un coniugato ancora attivo, con un'emivita 6 volte più lunga e con una ridotta immunogenicità, permettendo così terapie a lungo termine. Un altro prodotto, sempre commercializzato da Enzon, Inc., è ONCOSPAR[®] [12], coniugato di PEG (PM 5 kDa) e L-asparaginasi, un agente antitumorale specificamente impiegato nel trattamento della leucemia linfocitica acuta: il coniugato mostra un sensibile incremento dell'emivita plasmatica e una forte diminuzione dell'immunogenicità, tanto da poter essere somministrato a pazienti che abbiano già sviluppato una ipersensibilità all'enzima naturale. Recentemente è entrato in commercio il coniugato di PEG a peso molecolare 12000 Da e interferone α (α -IFN), con il nome di PEG-INTRON[®], per il trattamento dell'epatite C, ed un coniugato con PEG ramificato di 40 kDa da parte di Hoffmann da Roche, PEGASYS[®]. In

entrambi i casi si prolunga l'emivita plasmatici aumentandone, anche se in modo differente, la farmacodinamica. Altri sono invece in avanzata fase di studio, come insulina, uricase, superossido-dismutasi, interleuchina 2, emoglobina [60,48].

Composto	Nome	Anno di commercializzazione o stadio di sviluppo	Indicazione terapeutica
PEG-adenosina deaminasi	Adagen	1990	SCID
PEG-L-asparaginasi	Oncospar	1993	Carcinoma epatico
PEG- α -interferone 2b	PEG-INTRON	2000	Leucemia linfoblastica acuta
PEG- α -interferone 2b	PEG-INTRON	Vari studi clinici	Cancro, sclerosi multipla, HIV/AIDS
PEG- α -interferone 2°	PEGASYS	2002	Epatite C
PEG-antagonista del recettore del GH	Pegvisomant	2002	Acromegalia
PEG-G-CSF	PEG-filgrastim, Neulasta	2002	Prevenzione di neutropenia associata alla chemioterapia
PEG-ANTI-TNF Fab	CD870	Fase II	Artrite reumatoide
Branched PEG-anti-VEGF	Macugen TM	2004	Degenerazione maculare

GH: ormone della crescita; G-CSF: fattore stimolante colonie di granulociti; TNF: fattore di necrosi tumorale; SCID: immunodeficienza grave combinata; VEGF: fattore di crescita endotelio vascolare.

Tabella 3.1: Coniugati PEG-proteina in commercio o in avanzata fase di sperimentazione clinica

La tecnica della PEGhilazione è stata estesa anche a farmaci a basso peso molecolare, soprattutto antitumorali. In questo caso lo scopo che ci si prefigge è soprattutto quello di direzionare il farmaco al tessuto tumorale, impedendone invece la distribuzione in altri distretti dell'organismo, dove può creare effetti indesiderati. Inoltre con la PEGhilazione si cerca di evitarne l'inattivazione nel circolo ematico e, in alcuni casi, si cerca di incrementarne la solubilità, spesso scarsa, nelle soluzioni acquose. L'esempio più significativo è costituito da camptotecina, un alcaloide ad attività antitumorale molto potente ma dotato di scarsa solubilità in acqua e nei fluidi biologici. La bioconiugazione gli conferisce, oltre ad una maggiore solubilità, anche una riduzione della tossicità, un'emivita più lunga e inoltre un'efficacia terapeutica maggiore. Il derivato 10 kDa-Camptotecina ha una solubilità di 2 mg/ml in acqua, mille volte più grande di camptotecina (0.0025 mg/ml). Inoltre fortunatamente si è scoperto che l'esterificazione dell'ossidrile in posizione 20 stabilizzava il lattone (essenziale per l'attività) in condizioni fisiologiche [73]. Sono in studio vari coniugati in cui il farmaco è legato al PEG attraverso diversi spaziatori peptidici, molto stabili in plasma ma in grado di rilasciare il farmaco

all'interno della cellula tumorale, grazie all'azione degli enzimi lisosomiali, in particolare catepsine [12]. Attualmente è presente sul mercato il PEG-Ala-Camptotecina (PROTECAN[®]) che mostra maggiore $t_{1/2}$, bassissima tossicità sui topi ed efficacia in confronto ad altri derivati PEG-Camptotecina.

Altro esempio è la PEGhilazione di doxorubicina che permette di somministrare questo farmaco in dosi maggiori, evitando i gravi effetti cardi tossici che normalmente si manifestano.

Altri composti in fase di studio sono i coniugati di PEG con ara-C, composti del platino, taxani, metotressato e altri. In tutti l'obiettivo è di direzionare l'agente antineoplastico al tessuto tumorale, sfruttando l'effetto EPR, di ridurre la tossicità sistemica e di migliorarne i profili farmacocinetici e farmacodinamici [12].

La PEGhilazione è stata impiegata anche su farmaci diversi dagli antitumorali, come antivirali, antimalarici e anti-AIDS, per migliorarne le loro caratteristiche farmacologiche, agendo su solubilità ed emivita plasmatica [12]. In generale se il coniugato è costruito per raggiungere un particolare sito di rilascio, il legame dovrà essere sufficientemente stabile nel sangue per mantenere integro il coniugato fino alla sede di azione o per il tempo desiderato. Un approccio seguito [74] per la sintesi di profarmaci PEGhilati è l'utilizzo del gruppo ossidrilico ($-OH$) del polimero. Sono stati sintetizzati così coniugati di PEG con vari farmaci, fra cui ibuprofen, acido benzoil-acrilico, penicillina V e aspirina, nei quali il gruppo ossidrilico del PEG è stato fatto reagire con il gruppo carbossilico del farmaco in presenza di DCC e DMAP. Si ottengono così facilmente prodotti omogenei a temperatura ambiente. La velocità di idrolisi degli esteri, in vivo, può andare da pochi minuti a varie ore in base al tipo di acido carbossilico, al peso molecolare del PEG o alle caratteristiche del *linker*.

Purtroppo però il numero di molecole di farmaco che possono essere legate ad una singola catena di PEG è limitato, riducendo così il *loading*, ossia il rapporto tra peso di farmaco e peso di polimero, del coniugato. Inoltre, il PEG, non essendo biodegradabile, non può essere usato ad un alto peso molecolare. Recentemente sono stati quindi proposti nuovi tipi di *carriers* polimerici a base PEG che siano biodegradabili e nel contempo abbiano più funzioni reattive.

Sono stati studiati dei polimeri PEG/lisina legati da legame carbammico per aumentare il grado di caricamento. Questi nuovi polimeri sono stati sintetizzati dalla polimerizzazione di bis-Sc-PEG con lisina, cosicché entrambi i gruppi amminici dell'amminoacido sono incorporati nella catena formando uretani, mentre il gruppo carbossilico $-COOH$ può essere sfruttato per l'introduzione di vari gruppi reattivi. La lunghezza dei frammenti di PEG determina la distanza fra i gruppi funzionali lungo la catena polimerica. Aumentando il peso molecolare dei segmenti di PEG, la capacità di caricamento del farmaco decresce. I derivati Poli (PEG-Lisina) di PM

circa 50 kDa derivati da PEG 2000 hanno mostrato bassa tossicità con diminuzione dell'accumulo negli organi RES. Altri derivati simili sono stati sintetizzati e studiati da vari gruppi di ricerca. Poiani e collaboratori [75] hanno dimostrato l'attività antifibrotica di cys-4-idrossi-l-prolina (CHP) coniugata con Poli (PEG-Lisina). In particolare, il derivato Poli (PEG-Lis-CHP) legato mediante legame ammidico ha esibito attività 100 volte più alta rispetto al farmaco nativo.

Nuovi *carriers* sono rappresentati dal PEG-poliacetale, che mostra idrolisi pH-dipendente [76], da PEG-destrina [77] che viene degradato da amilasi, e da PEG-fumarato, che risulta biodegradabile grazie alla presenza dei legami esterei fra gli oligomeri [78].

La ricerca si sta muovendo, ancora, dai sistemi eterogenei e casuali verso strutture sempre più definite. I dendrimeri ed i dendroni combinano monodispersività con alta densità di gruppi funzionali sulla superficie permettendo così il caricamento di elevate quantità di farmaci antitumorali [79], di agenti per la diagnosi [80] o di molecole direzionanti [81,82]. Sebbene i dendrimeri che veicolano agenti per la diagnosi siano già stati testati clinicamente, bisogna ancora ben stabilire la sicurezza e le caratteristiche chimiche di queste strutture dendrimeriche sintetizzate.

Altre strutture degne di nota per la loro originalità e che sono tuttora sotto valutazione includono: polimeri iper-ramificati [83], copolimeri a blocco [84], stars [85] e derivati glicopeptidici [86].

Ulteriori approcci che permettono un aumento del *loading* del farmaco sono basati sulla polimerizzazione di N-carbossianidride del β -benzil-estere dell'acido aspartico sul mPEG-NH₂. I gruppi -COOH esposti sono stati sintetizzati per l'attacco di doxorubicina mediante legame ammidico. Coniugati sono stati sintetizzati variando il peso molecolare della catena di PEG e legando, infine, doxorubicina. I coniugati hanno mostrato in vivo: i) prolungato tempo di circolazione nel sangue; ii) ridotta internalizzazione in fegato e milza; iii) accumulo nel tessuto tumorale con aumento dell'attività anticancro [87], probabilmente dovuto alla formazione di micelle contenenti un core idrofobico di farmaco con le catene di PEG all'esterno.

3.4 Gemcitabina

Gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-deossicitidina o 2'-deossi-2',2'-difluoro-1-β-D-ribofuranosil-citosina, dFdC) è un analogo nucleosidico pirimidinico sintetico ad attività antiproliferativa (figura 3.7) [88].

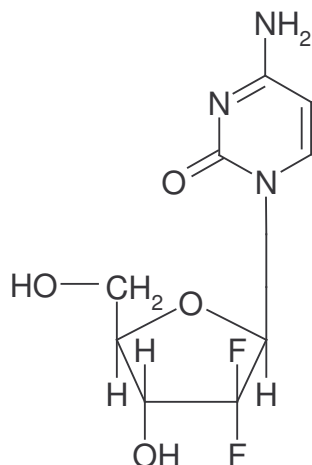


Figura 3.7: Struttura di gemcitabina

Sintetizzata nel 1987 da Hertel e collaboratori nei laboratori di ricerca Lilly [89], ha formula bruta $C_9H_{11}F_2N_3O_4$ e peso molecolare 263.20 g/mol. E' costituita da una molecola di citosina cui è legato il 2'-deossi-ribosio in forma furanosa, tramite un legame N-glicosidico fra le posizioni 1 e 1'; lo zucchero è sostituito in 2' con due atomi di fluoro in posizione geminale (da cui il nome gemcitabina) [90]. Proprio i sostituenti in posizione 2' differenziano gemcitabina dal suo precursore citarabina (ara-C) e dal nucleoside endogeno deossicitidina, conferendole caratteristiche peculiari nel metabolismo e nel profilo farmacocinetico, rendendola più attiva rispetto ad ara-C verso molti tumori solidi e leucemie [91,92]. Studi in vitro hanno infatti evidenziato un accumulo del metabolita attivo di gemcitabina, gemcitabina trifosfato, in quantità maggiore e per periodi più prolungati rispetto all'equivalente citarabinico. Questo è dovuto principalmente a tre fattori: 1) una maggiore permeabilità di membrana verso gemcitabina, dovuta alla sua maggiore lipofilia rispetto ad ara-C; 2) una maggiore affinità di gemcitabina verso la deossicitidina chinasi, l'enzima coinvolto nel *rate-limiting step* del processo di attivazione; 3) una più lenta e bifasica eliminazione intracellulare del metabolita attivo di gemcitabina. Tutto questo permette una maggiore ritenzione intracellulare del metabolita attivo di gemcitabina, che si riflette in una maggiore attività citotossica rispetto all'analogo citarabinico [93].

3.4.1 Metabolismo

Essendo più lipofila di ara-C, gemcitabina entra nelle cellule più rapidamente, ma non è ancora chiaro se questa maggiore lipofilia influisca sull'affinità per il trasportatore di nucleosidi responsabile dell'*uptake* cellulare, o se permetta addirittura il passaggio per diffusione [94]. Dentro la cellula gemcitabina viene metabolizzata secondo lo schema riportato in figura 3.8:

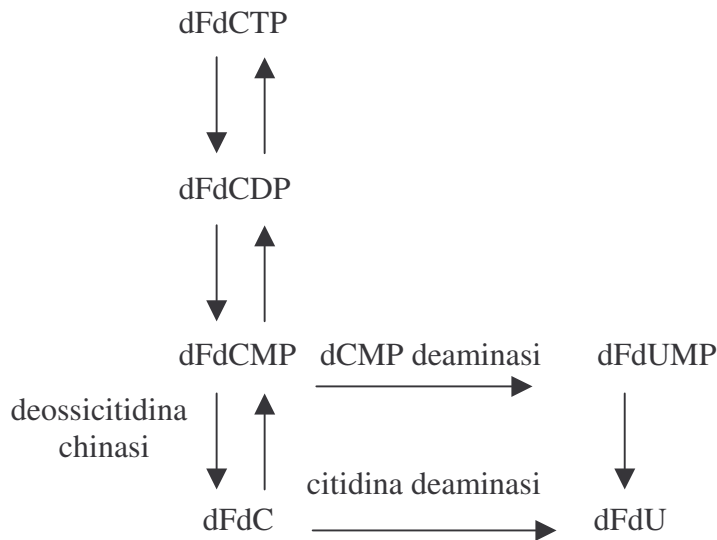


Figura 3.8: Schema metabolico di gemcitabina

Gemcitabina (dFdC) viene trasformata in 2',2'-difluorodeossicitidina monofosfato (dFdCMP) dalla deossicitidina chinasi che fosforila in 5'. dFdCMP subisce altre due fosforilazioni per dare dapprima 2',2'-difluorodeossicitidina difosfato (dFdCDP), grazie all'enzima deossicitidina-monofosfato chinasi (dCMP chinasi), e poi 2',2'-deossicitidina trifosfato (dFdCTP), per azione dell'enzima nucleoside-difosfato chinasi, ubiquitario e non specifico. La fosforilazione di gemcitabina a di- e tri-fosfato è essenziale per la sua attività citotossica, in quanto porta alla generazione dei metaboliti attivi dFdCDP e dFdCTP, e la formazione del monofosfato è il *rate-limiting step* per l'intero processo di attivazione e quindi per l'accumulo dei metaboliti attivi dentro la cellula.

Gemcitabina viene metabolizzata anche attraverso un'altra via metabolica, che porta però alla formazione di prodotti inattivi. Ad opera di citidina deaminasi [95] gemcitabina subisce deaminazione ossidativa con formazione di 2',2'-difluorodeossiuridina (dFdU), priva di attività citotossica [96]. Anche dFdCMP viene inattivato a 2',2'-difluorodeossiuridina monofosfato (dFdUMP) per deaminazione catalizzata da deossicitidina-monofosfato deaminasi (dCMP deaminasi), la quale necessita di dCTP come attivatore. L'inattivazione del farmaco per

deaminazione ossidativa è sia intra- che extra-cellulare ed avviene soprattutto a livello di fegato e reni [90,94].

3.4.2 Meccanismo d'azione

Gemcitabina è un agente fase cellulare-specifico che esplica la sua attività citotossica bloccando la sintesi del DNA in fase S e impedendo la progressione delle cellule dalla fase G1 alla fase S [97].

Una volta entrata nella cellula, viene fosforilata prima in difluoro-deossi-citidina monofosfato, poi difosfato ed infine trifosfato rispettivamente dagli enzimi deossicitidina chinasi, deossicitidina-monofosfato chinasi e nucleoside-difosfato chinasi. I responsabili dell'azione citotossica sono i due metaboliti attivi dFdCDP e dFdCTP che, agendo a vari livelli, bloccano la sintesi del DNA [90].

Il meccanismo principale con il quale avviene questa inibizione è l'incorporazione del falso nucleotide dFdCTP nella catena di DNA in allungamento all'estremità 3', da parte della DNA-polimerasi α e ϵ , per la quale il nucleotide compete con dCTP. Il blocco non avviene subito, come accade per la citarabina, ma dopo l'incorporazione di un altro nucleotide da parte della DNA-polimerasi. Questo fenomeno, noto come "*masked chain termination*", protegge il farmaco dall'azione degli enzimi riparativi, impedendone la rimozione da parte delle 3'→5' esonucleasi [98].

Esiste inoltre un complesso processo di "autopotenziamento" che rafforza l'attività del farmaco, grazie all'azione di dFdCDP e dFdCTP su vari processi enzimatici richiesti per la replicazione e la riparazione del DNA [94], come schematizzato in figura 3.9. Infatti dFdCDP è un substrato inibitorio alternativo per la ribonucleotide reduttasi (a), l'enzima che produce deossiribonucleotidi, utili per sintesi e riparazione di DNA, a partire da ribonucleotidi difosfato. Questo comporta una diminuzione nei livelli di deossiribonucleotidi, in particolare di dCTP, il quale compete con dFdCTP per l'incorporazione nel DNA da parte della DNA-polimerasi (b); di conseguenza si verifica un incremento nel rapporto dFdCTP vs dCTP che aumenta l'incorporazione di falso nucleotide nel DNA [99,100]. Si pensa che l'inibizione della ribonucleotide reduttasi sia dovuta alla presenza dei due atomi di fluoro in posizione 2'. Questo è anche supportato dal fatto che cellule leucemiche umane trattate con gemcitabina presentano una deplezione dei livelli di deossiribonucleotidi, fatto che non si verifica con ara-C, la quale blocca solo la sintesi del DNA [94].

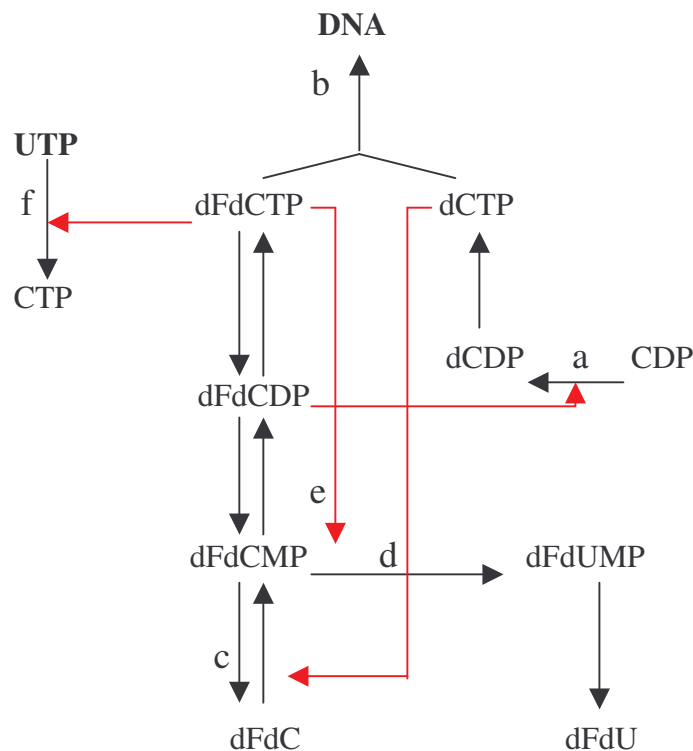


Figura 3.9: Meccanismo di autopotenziamento di dFdC

La diminuzione nei livelli di dCTP riduce l'inibizione che questo deossinucleotide esercita sulla deossicitidina chinasi (c), favorendo così la fosforilazione di gemcitabina, che alla fine porta all'incremento della sintesi di dFdCTP. Inoltre causa anche un aumento dei livelli di dFdCDP che così mantiene l'inibizione sulla ribonucleotide reductasi.

Un altro effetto della riduzione dei livelli di dCTP è la scarsa attività dell'enzima dCMP deaminasi (d). Infatti questo enzima è regolato dai nucleotidi dCTP, che agisce da attivatore, e dTTP, ad azione inibitoria. Perciò la riduzione di dCTP comporta un'alterazione del rapporto dCTP/dTTP con aumento di dTTP e conseguente inibizione dell'enzima. Questo si traduce in una ridotta inattivazione di dFdCMP a dFdUMP e in una maggiore ritenzione di nucleotidi attivi nelle cellule. In più è stato dimostrato che dFdCTP, se presente in concentrazione elevata, è un inibitore diretto dell'enzima (e).

Infine alte concentrazioni di dFdCTP inibiscono anche la CTP sintetasi (f), riducendo ulteriormente i livelli del nucleotide necessario per sintesi e riparazione del DNA.

3.4.3 Resistenza

Il meccanismo di resistenza a gemcitabina non è stato ancora del tutto chiarito. I primi studi sono stati condotti su cellule araC-resistenti e suggerivano come probabile meccanismo di resistenza una mutazione o una deficienza dell'enzima deossicitidina chinasi (dCK). Studi seguenti su linee cellulari di carcinoma ovarico umano gemcitabina-resistenti, che mostravano resistenza crociata anche verso ara-C e altri agenti antitumorali non correlati, suggerivano che l'alterazione o la carenza di dCK fosse un meccanismo parziale di un più largo processo di resistenza. Il coinvolgimento della dCK è stato completamente smentito da studi su modelli animali, che suggerivano invece la timidina chinasi o altri enzimi come probabili responsabili della resistenza al farmaco [101].

Recentemente si è focalizzata l'attenzione sull'enzima ribonucleotide reductasi, essendo questo un bersaglio di gemcitabina ma non di ara-C. In uno studio condotto su linee cellulari di carcinoma orofaringeo umano, è stata evidenziata una sovraespressione del gene che codifica per questo enzima nelle cellule gemcitabina-resistenti [102]. La maggiore attività dell'enzima comporta un aumento del *pool* di nucleotidi (dNTP), in particolare di dCTP, che inibiscono competitivamente l'incorporazione di dFdCTP nel DNA. Inoltre l'eccesso di dNTP agisce con feedback negativo sulla dCK, riducendo così la fosforilazione di gemcitabina e quindi la sua attivazione. Infine l'eccesso di dCTP agisce con feedback positivo sulla dCMP deaminasi, aumentando l'inattivazione di gemcitabina. In questo stesso studio è stata anche valutata l'espressione di dCK, per scartare definitivamente l'ipotesi di un suo coinvolgimento: in effetti non sono state registrate variazioni nell'espressione di tale enzima nelle cellule gemcitabina-resistenti, rispetto alle cellule di riferimento.

Non si escludono comunque altri meccanismi, come: l'aumento dei livelli di deossicitidina deaminasi o dCMP deaminasi, che metabolizzano il farmaco; l'aumento dei livelli di CTP sintetasi, che incrementa il *pool* di CTP endogeno; alterazioni nel sito di legame della DNA-polimerasi, meno affine per dFdCTP; alterazione dei geni che regolano l'apoptosi, come il p53; bassi livelli di trasportatore di membrana, che riduce l'*uptake* cellulare del farmaco.

3.4.4 Farmacocinetica clinica

Gemcitabina viene somministrata settimanalmente per infusione endovenosa di 30 minuti in cicli di alcune settimane di trattamento alternate a una o due settimane di sospensione. Esiste un'ampia variabilità fra i parametri farmacocinetici a seconda delle caratteristiche del paziente,

come età, sesso, superficie corporea, peso, ecc., e delle modalità di somministrazione, come dose e tempo di infusione [103].

Il profilo farmacocinetico di gemcitabina è lineare e può essere descritto da un modello a due compartimenti. E' caratterizzato da una breve emivita plasmatica, variabile a seconda di età, sesso e dose somministrata: già dopo poche ore dall'infusione la concentrazione plasmatica del farmaco scende sotto livelli non quantificabili. Il volume di distribuzione V_d è influenzato da età, sesso e soprattutto durata di infusione: per infusioni brevi, inferiori a 70 minuti, il V_d è 50 l/m^2 , indicando una limitata distribuzione ai tessuti, mentre per infusioni lunghe, da 70 a 285 minuti, il V_d aumenta fino a 370 l/m^2 , riflettendo un lento equilibrio con il compartimento tissutale. Invece la *clearance*, che presenta valori piuttosto elevati, non è dipendente dalla durata di infusione, ma solo dall'età e dal sesso: è più bassa nelle donne e negli anziani. Il legame con le proteine plasmatiche è trascurabile [97,104,105].

Gemcitabina viene rapidamente metabolizzata, non solo nel fegato ma anche in altri tessuti, nel derivato inattivo 2',2'-difluoro-2'-deossi-uridina (dFdU), caratterizzato da un'emivita plasmatica molto più lunga e da una *clearance* più bassa. Si rileva un picco plasmatico del metabolita da 5 a 15 minuti dopo la fine dell'infusione, ma anche dopo una settimana sono presenti concentrazioni plasmatiche misurabili. L'eliminazione del farmaco, principalmente sottoforma di dFdU e in minima parte in forma immodificata, avviene per il 99% per via renale e solo l'1% per via fecale. Non sono stati rilevati altri metaboliti. L'emivita di eliminazione è indipendente dalla dose ma aumenta all'aumentare del tempo di infusione: dopo un'infusione di 30 minuti, dal 92% al 98% della dose viene recuperata entro una settimana, quasi completamente nelle urine [90,91].

Il metabolita attivo di gemcitabina, dFdCTP, che può essere rilevato nelle cellule mononucleate circolanti, presenta caratteristiche farmacocinetiche insolite, che probabilmente contribuiscono alla sua attività. Infatti, a concentrazioni cellulari relativamente basse ($<50 \mu\text{mol/l}$) viene eliminato con una cinetica lineare monofasica con un'emivita di eliminazione simile agli altri analoghi nucleotidici trifosfato (da 2 a 6 ore). A concentrazioni maggiori, invece, conseguenti al meccanismo di autopotenziamento, la cinetica di eliminazione diventa bifasica con un'emivita eccezionalmente lunga. Questo è probabilmente alla base della relazione fra l'aumento della concentrazione di gemcitabina e l'aumentata mortalità cellulare dopo un'incubazione di 2 ore; fatto questo insolito in quanto con gli altri analoghi nucleotidici trifosfato fase S-specifici, come ara-C, si registra un plateau nella curva di citotossicità all'aumentare della dose. Questa prolungata ritenzione di metabolita attivo è un meccanismo tipico di gemcitabina, che contribuisce alla sua attività clinica [94].

3.4.5 Attività antitumorale

La specialità a base di gemcitabina (Gemzar[®]) ha ricevuto l'approvazione della FDA per il suo utilizzo dapprima nella cura del carcinoma pancreatico e in seguito per il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) [106]. Inoltre studi recenti hanno dimostrato che gemcitabina è attiva contro diversi altri tumori solidi, come il cancro ovarico, al seno, alla vescica e il cancro polmonare a piccole cellule (SCLC), e anche contro tumori “liquidi”. Mentre però non sono state osservate grosse differenze nell'attività antitumorale fra gemcitabina e ara-C sulle leucemie, nei tumori solidi gemcitabina si è rivelata molto più potente di ara-C, la quale invece è praticamente inattiva [103,107].

Il carcinoma polmonare può essere diviso istologicamente in carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) e carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC): il NSCLC è molto meno sensibile alla chemioterapia rispetto a SCLC [103]. Nel NSCLC nessun agente usato in monoterapia produce un grado di risposta superiore al 25%, compresa gemcitabina, la quale ha un grado di risposta del 20% [108]. Il suo favorevole profilo di tossicità, però, e il suo particolare meccanismo d'azione la rendono adatta per trattamenti di associazione con altri farmaci [109]. Diversi studi hanno evidenziato una buona attività contro questo tumore con l'associazione di gemcitabina e cisplatino [110] ed infatti la FDA ha approvato questa associazione per il trattamento di prima scelta di pazienti con NSCLC inoperabile, localmente avanzato o metastatico [97]. Il SCLC è caratterizzato da un decorso clinico piuttosto aggressivo, con rapido sviluppo di metastasi e morte precoce [111]. E' più sensibile del NSCLC al trattamento chemioterapico ma, nonostante un alto grado di risposta, è un carcinoma ricorrente. Vista la sua attività nel NSCLC, è stata presa in considerazione gemcitabina, la quale ha dato buoni risultati in terapia di prima linea di pazienti non trattati [112].

Il carcinoma pancreatico è una delle 5 principali cause di morte per tumori solidi. Fino a poco tempo fa il carcinoma pancreatico era considerato un tumore resistente alla chemioterapia, compreso il 5-fluorouracile normalmente impiegato [113]. Buoni risultati si sono invece ottenuti con l'impiego di gemcitabina in monoterapia, sia su pazienti non trattati, sia in quelli che non rispondono al trattamento con 5-FU [107,114]. Infatti è stata approvata dalla FDA per il trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico localmente avanzato o metastatico [97]. Sono in corso anche numerosi studi di gemcitabina in combinazione con altri agenti [113,115].

Il carcinoma ovarico è caratterizzato da una mortalità piuttosto alta. In genere si interviene prima chirurgicamente e poi con chemioterapia a base di platino o paclitaxel [103,116]. Si stanno studiando nuove strategie di cura per questo tumore, o con nuovi schemi di

trattamento di farmaci già in uso, o con nuovi farmaci, fra cui gemcitabina. Essa infatti si è dimostrata attiva nel trattamento di pazienti con carcinoma ovarico non precedentemente trattate e anche nella terapia di recupero di carcinoma ricorrente; non dà resistenza crociata con platino ma anzi è attiva in pazienti resistenti al platino o ai taxani [107,117,118].

Il carcinoma al seno, metastatico o localmente avanzato, è caratterizzato da un tempo di sopravvivenza medio di 2-3 anni. Al momento gli agenti antitumorali impiegati sono soprattutto antracicline e taxani, anche se sono comunque accompagnati da tossicità significative, sia quando usati in monoterapia sia in combinazione. In uno studio di fase II si è valutata l'attività di gemcitabina su questo tipo di tumore, rilevando una buona attività, con un grado di risposta del 25%, e una lieve tossicità, che la rende ben tollerata [107,119]. Visti questi buoni risultati sono stati condotti anche degli studi con gemcitabina in combinazione con altri agenti: con doxorubicina ha dato un grado di risposta totale dell'83%, mentre con vinorelbina del 76% [103,120]. Gemcitabina si è invece rivelata inefficace come singolo agente in pazienti in cui il trattamento sia con antracicline sia con taxani aveva fallito, portando a ricomparsa del tumore [121].

Il carcinoma della vescica è una neoplasia piuttosto comune e generalmente si presenta come tumore superficiale, che colpisce la mucosa e la submucosa. Il trattamento iniziale è di tipo chirurgico ma il tumore insorge nuovamente nel 40-80% dei pazienti trattati. Il regime di trattamento più attivo in questo tipo di tumore è una combinazione di metotressato, vinblastina, doxorubicina e cisplatino (M-VAC), che però è accompagnata da una significativa tossicità. Molto incoraggianti sono stati i dati ottenuti su pazienti, nei quali il trattamento con M-VAC era fallito, trattati con gemcitabina. Visti i buoni risultati, sono stati condotti degli studi con gemcitabina in combinazione con altri agenti, soprattutto il cisplatino, ottenendo un grado di risposta variabile dal 40% all'80%, con tossicità accettabile [107,122]. E' in corso anche uno studio per la somministrazione locale di gemcitabina in monoterapia su pazienti già trattati e sembra che i risultati siano promettenti [123].

Gemcitabina, in monoterapia o in associazione, è risultata attiva verso altri tipi di tumore solido come il carcinoma testicolare, prostatico, renale [124] ed il mesotelioma maligno [125].

3.4.6 Tossicità

Gemcitabina viene impiegata in alcuni tipi di tumori, sia in monoterapia sia in combinazione con altri agenti citotossici. Generalmente è ben tollerata, mostrando un profilo di

tossicità piuttosto favorevole. La mielodepressione è la principale tossicità dose-limitante nella terapia con gemcitabina, manifestandosi con una lieve e transitoria neutropenia, trombocitopenia e anemia, ma meno dell'1% dei pazienti interrompe il trattamento. Durante la terapia viene costantemente controllata la conta delle cellule del sangue e, se necessario, la dose viene ridotta del 50%; viene inoltre valutata la funzionalità epatica e renale, monitorando i livelli di transaminasi e di creatinina sierica. In alcuni casi si controllano anche i livelli di potassio, calcio e magnesio sierici. L'insorgenza di complicazioni infettive, come sepsi, è molto rara [97,103].

Nausea e vomito sono abbastanza frequenti ma in genere sono di entità lieve o moderata e facilmente controllati con i comuni antiemetici orali; ci sono casi anche di diarrea e stomatiti. Nel giorno del trattamento possono verificarsi febbre e sintomi simil-influenzali di lieve entità, controllati con acetaminofene. Si possono manifestare anche lievi o moderati rash cutanei, con eruzioni eritematose e prurito, curabili con corticosteroidi o antistaminici. Sono riportati anche casi di edema, periferico o generalizzato, dispnea, parestesie e alopecia, che però è molto più leggera di quella causata da altri agenti antitumorali.

La terapia con gemcitabina è associata spesso con un transitorio aumento delle transaminasi, ma raramente è dose limitante. Infine possono presentarsi alterazioni urinarie isolate, come proteinuria ed ematuria, ma in genere sono di lieve entità. In alcuni pazienti affetti da tumore trattati con gemcitabina, si sono verificati casi di sindrome uremica acuta (HUS), una rara e grave patologia che può essere fatale [126]. Questa patologia è stata anche riscontrata in pazienti trattati con altri antitumorali, ma gli studi condotti finora su gemcitabina non hanno ancora dimostrato che la patologia sia una conseguenza dell'uso del farmaco, visti i numerosi fattori concomitanti.

3.4.7 Formulazione

La specialità per uso clinico a base di gemcitabina attualmente impiegata è costituita da fiale di gemcitabina cloridrato liofilizzata, commercializzata con il nome di Gemzar[®] da Ely Lilly and Co.; Indianapolis, IN, USA. Gemcitabina cloridrato è un solido bianco, solubile in acqua, poco solubile in metanolo e praticamente insolubile in etanolo e solventi organici apolari. Le fiale di Gemzar[®] contengono 200 mg o 1 g di gemcitabina cloridrato (espressa come base libera) formulata con mannitolo (200 mg o 1 g, rispettivamente) e sodio acetato (12.5 mg o 62.5 mg, rispettivamente) in forma di polvere liofilizzata sterile. Possono essere aggiunti acido

cloridrico e/o sodio idrossido per stabilizzare il pH. Le fiale vanno conservate a temperatura ambiente (20-25°C).

Gemzar[®] è fornita in forma sterile ed è solo per uso endovenoso: come diluente per la polvere viene usata una soluzione fisiologica sterile senza preservanti, ottenendo una soluzione limpida, trasparente e incolore. Per motivi di solubilità, la massima concentrazione di Gemzar[®] raggiungibile dopo dissoluzione è di 40 mg/ml. La soluzione ottenuta ha un pH che oscilla fra 2.7 e 3.3 ed è stabile per 24 ore a temperatura ambiente (20-25°C) [97].

3.5 Epirubicina

Epirubicina (EPI) è un antibiotico antraciclino ottenuto per via semisintetica da daunorubicina (o daunomicina o rubidomicina, DNR) [127], composto naturale isolato da colture di *Streptomyces peucetius* (figura 3.10):

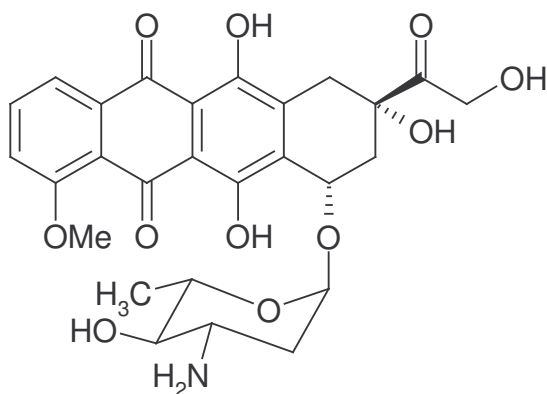


Figura 3.10: Struttura di epirubicina

Il suo nome chimico completo è (8S-10S)-10-[(3-ammino-2,3,6-trideoossi- α -L-arabino-esopiranosil)ossi]-7,8,9,10-tetraidro-6,8,11-triidrossi-8-(idrossiacetil)-1-metossi-5,12-naftacenedione. Ha formula bruta $C_{27}H_{29}O_{11}N$ e peso molecolare 543.53 g/mol. Appartiene alla famiglia delle antracicline, costituite da un nucleo antrachinonico planare, aglicone, cui è legato un amminozucchero, la daunosamina. Epirubicina è il 4' epimero di doxorubicina (o adriamicina, DXR), altro antibiotico naturale prodotto da *Streptomyces* o sintetizzato da daunomicina. Le due antracicline differiscono quindi solo per l'orientamento spaziale del gruppo idrossilico in 4', che in EPI è equatoriale, mentre in DXR è assiale [128] (figura 3.11).

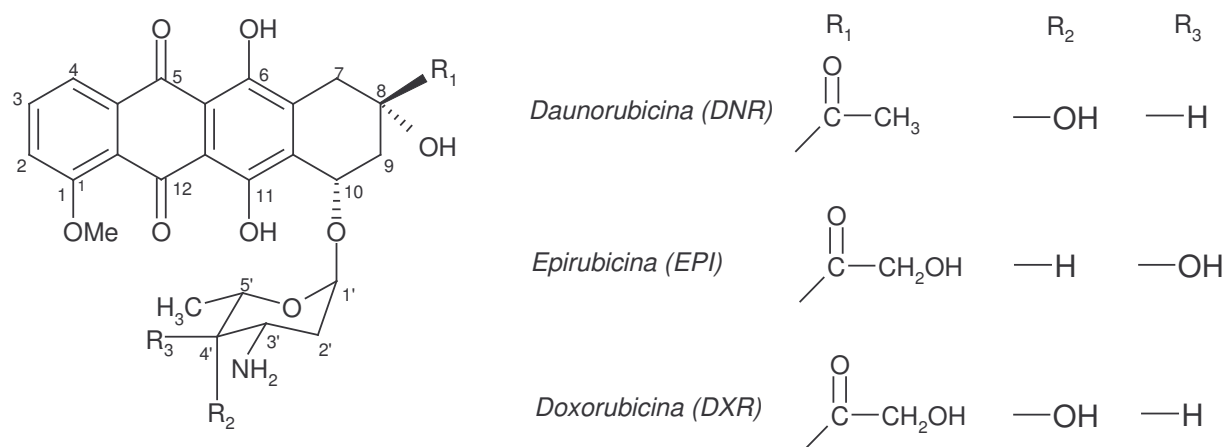


Figura 3.11: Struttura di epirubicina, doxorubicina e daunorubicina a confronto

Le antracicline sono da tempo utilizzate come agenti antineoplastici nella cura di un'ampia varietà di tumori solidi e di leucemie. Epirubicina, commercializzata dal 1984, è stata approvata dalla FDA nel 1999. In clinica viene maggiormente utilizzata la forma cloridrata, la quale è stabile sia allo stato solido che in soluzione acquosa ad un pH compreso tra 3.0 e 6.5, mentre si decompone a velocità crescente quando il pH va da 6.5 a 12.0.

3.5.1 Metabolismo

La rapida metabolizzazione, che si verifica soprattutto nel fegato e nei globuli rossi, può seguire quattro vie differenti [127-130]: (1) riduzione del chetogruppo C-13, con la formazione del 13(S)-diidro derivato, epirubicinolo; (2) coniugazione del farmaco immodificato e dell'epirubicinolo con acido glucuronico; (3) perdita dell'ammino-zucchero attraverso un processo di idrolisi che porta alla formazione degli agliconi di doxorubicina e doxorubicinolo; (4) perdita della daunosamina attraverso un meccanismo riduttivo, con formazione del 10-deossi-aglicone di doxorubicina e doxorubicinolo. Le formule di struttura di questi metaboliti sono riportate in figura 3.12.

La 4'-O-glucuronidazione (2) si verifica solo quando l'ossidrile in 4' è in posizione equatoriale e quindi non è permessa a doxorubicina. I glucuronidi non hanno attività citotossica; è stato però ipotizzato che possano ostacolare la riduzione semichinonica del farmaco e quindi la formazione di radicali liberi, principale causa della cardiotossicità delle antracicline. Questo spiegherebbe la maggior tollerabilità di epirubicina rispetto a doxorubicina [129].

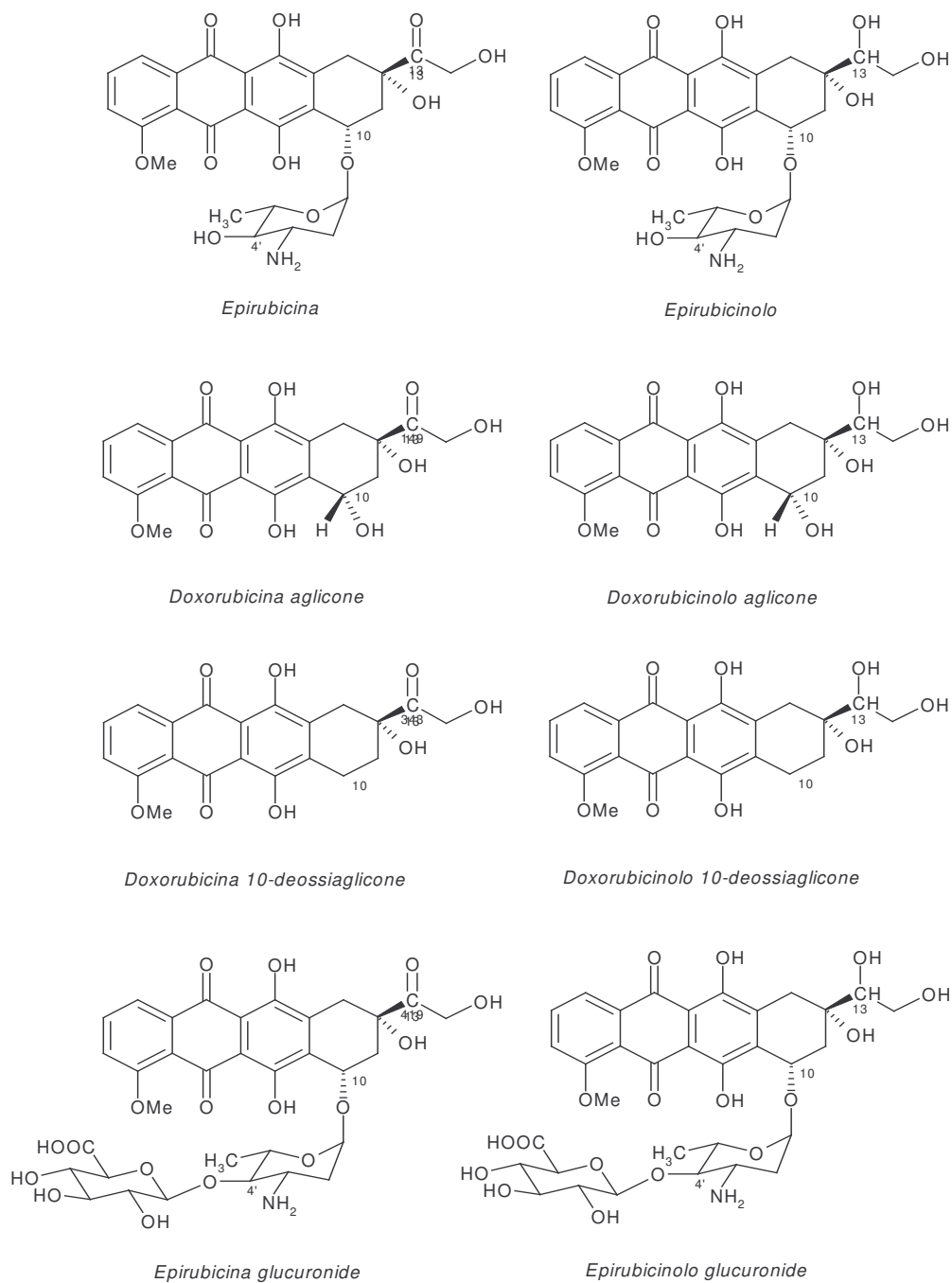


Figura 3.12: Formule di struttura di epirubicina e metaboliti

3.5.2 Meccanismo d'azione

Le antracicline vengono classificate come farmaci antineoplastici intercalanti. Sono però caratterizzate da un meccanismo d'azione molteplice, che si esplica a più livelli: intercalazione nella catena di DNA, interazione con le membrane e produzione di specie attive di ossigeno.

1) Intercalazione nella catena di DNA: epirubicina è in grado di intercalarsi tra le coppie di basi del DNA. Il sistema aromatico planare si inserisce perpendicolarmente all'asse della doppia elica e instaura interazioni π - π con gli anelli purinici e pirimidinici delle basi azotate; l'ammino-zucchero conferisce ulteriore stabilità a questo complesso formando legami di tipo ionico con lo scheletro zucchero-fosfato. Come conseguenza si ha:

- inibizione di DNA- e RNA-polimerasi, DNA-elicasi e topoisomerasi II con conseguente blocco della replicazione e trascrizione del DNA. Topoisomerasi II è l'enzima nucleare deputato a determinare una transitoria rottura e un rilassamento dei filamenti del DNA necessari per i processi di replicazione e trascrizione; le antracicline sono in grado di stabilizzare il complesso topoisomerasi II-DNA nello stato di taglio, con conseguente inibizione dell'attività dell'enzima;
- inibizione degli enzimi di riparazione del DNA. Oltre ad un'inibizione enzimatica diretta, l'interazione determina variazioni della topografia del DNA cromatinico che lo rendono irriconoscibile agli enzimi di riparo;
- rottura di uno o entrambi i filamenti in seguito a produzione di radicali liberi.

2) Interazione con le membrane: in seguito all'interazione con le membrane plasmatiche e mitocondriali, si osserva un'alterazione della fluidità, della struttura e dell'attività di scambio ionico. A livello mitocondriale si ha inoltre inibizione della fosforilazione ossidativa.

3) Produzione di specie attive di ossigeno: in presenza di sistemi enzimatici elettrondonatori (NADPH/NADH deidrogenasi, NADPH/citocromo P-450 reductasi) il nucleo chinonico del farmaco viene ridotto a radicale semichinonico. La successiva riossidazione per trasferimento di un elettrone ad una molecola d'acqua, determina la formazione dell'anione superossido. Quest'ultimo può trasformarsi, ad opera della superossido dismutasi, in perossido d'idrogeno e successivamente in radicale idrossile, oppure può innescare un processo di perossidazione lipidica. I radicali generati danneggiano il DNA, le membrane cellulari e le macromolecole biologiche [127].

3.5.3 Farmacocinetica clinica

Epirubicina viene somministrata per via endovenosa in dosi che variano dai 50 ai 120-180 mg/m² a seconda del tipo di tumore, ogni 3 o 4 settimane [127,128].

In seguito a somministrazione intravenosa, epirubicina è soggetta ad una *clearance* plasmatica trifasica [128, 129], caratterizzata da: una rapida fase di distribuzione iniziale (α), il cui valore medio di emivita è pari a 3.2 minuti; una fase intermedia (β), il cui $t_{1/2}$ medio è di 2.5

ore; una fase terminale lenta di eliminazione (γ) con un $t_{1/2}$ medio di 32 ore. La *clearance* plasmatica totale è pari a 46 l/h/m²; è influenzata da età e sesso. Epirubicina diffonde rapidamente ed estensivamente ai tessuti; presenta infatti un volume di distribuzione elevato, il cui valore è compreso tra 13 e 52 l/kg (1000 l/m²). Il legame con le proteine plasmatiche, soprattutto albumina, è di circa il 77% e non è influenzato dalla concentrazione di farmaco [127].

Epirubicina è eliminata principalmente dal sistema epatobiliare; solo una bassa percentuale della dose somministrata (11-15%) viene eliminata attraverso l'urina sotto forma di farmaco immodificato o di metaboliti. I pazienti con disfunzioni epatiche presentano una ridotta *clearance* di epirubicina con conseguenti concentrazioni plasmatiche del farmaco elevate.

3.5.4 Attività antitumorale

Epirubicina si è rivelata efficace nel trattamento di diversi tipi di tumore: cancro al seno, al polmone, allo stomaco, alle ovaie, alla vescica, linfoma non-Hodgkin, carcinoma epatocellulare.

Cancro al seno: negli ultimi decenni la mortalità del tumore al seno è diminuita notevolmente, grazie al trattamento sistemico già in fase precoce della malattia. Il regime terapeutico più ampiamente e tradizionalmente utilizzato prevede il trattamento con antracicline, in genere doxorubicina o epirubicina: a causa dei ridotti effetti tossici di epirubicina, questa viene preferita rispetto al suo precursore, soprattutto in Europa, mentre è più limitato in USA dove la FDA ne ha approvato l'uso in terapia solo a partire dal 1999. Migliori risultati sono stati ottenuti recentemente dall'associazione di antracicline con tassani [131, 132].

Cancro al polmone: il cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC) rimane in molti casi incurabile, in quanto la diagnosi avviene già in stadio avanzato. Fra i farmaci più utilizzati in passato si può citare etoposide, cisplatino, più recentemente tassani, gemcitabina e da ultimo le antracicline. Inizialmente è stata impiegata doxorubicina, anche in terapia di associazione, ma a questa si preferisce oggi il suo epimero epirubicina, dati i minori effetti tossici anche a dosi piuttosto elevate. Sono in corso anche studi con terapie di associazione di epirubicina con ifosfamide, etoposide o gemcitabina [133].

3.5.5 Tossicità

L'effetto collaterale che limita il dosaggio a lungo termine delle antracicline è la cardiotoxicità. Gli effetti acuti di ipotensione, tachicardia ed aritmie non hanno in generale grande significato dal punto di vista clinico, mentre effetti a lungo termine (degenerazione vacuolare del reticolo sarcoplasmatico, distruzione dei mitocondri, perdita di miofibrille) che portano ad insufficienza cardiaca congestizia e/o cardiomiopatia possono mettere a repentaglio la sopravvivenza e impongono la sospensione della terapia. Gli effetti cronici si manifestano dopo settimane o mesi di terapia e perdurano per anni dopo la sospensione del farmaco.

La cardiotoxicità delle antracicline è principalmente imputabile al danno prodotto dalle specie radicaliche generate dalla riossidazione del nucleo semichinonico dell'aglicone. I radicali liberi danneggiano le membrane cellulari e gli organelli citoplasmatici, alterando i normali meccanismi di trasporto intracellulare e di omeostasi del calcio; si osserva infatti una rapida liberazione del calcio dal reticolo sarcoplasmatico, in seguito ad ossidazione dei gruppi sulfidrilici dei canali di membrana che determina livelli intracellulari dello ione molto superiori a quelli fisiologici. Normalmente le specie radicaliche vengono neutralizzate da specifici sistemi enzimatici quali superossido dismutasi, catalasi e glutatione redattasi; nel miocardio questi sistemi enzimatici sono poco rappresentati e vengono ulteriormente compromessi dalla terapia con antracicline. La tossicità a livello cardiaco è determinata anche dal rilascio di sostanze vasoattive come istamina e catecolamine e dall'accumulo di doxorubicinolo, metabolita dell'epirubicina, che è un potente inibitore della sodio-potassio ATPasi, magnesio ATPasi e calcio ATPasi.

Il trattamento con epirubicina comporta una minor incidenza di cardiotoxicità rispetto ad una terapia con dosi equimolari di doxorubicina, probabilmente per il più rapido rilascio di epirubicina dal tessuto cardiaco nel periodo che segue l'infusione. La massima dose cumulativa raccomandata per epirubicina (1000 mg/m^2), quasi il doppio di quella di doxorubicina (550 mg/m^2) consente di ripetere un maggior numero di cicli chemioterapici e/o di aumentare le dosi.

Il più importante effetto tossico dose-limitante di epirubicina è la mielodepressione [127,128], che si manifesta principalmente come leucopenia e meno frequentemente come trombocitopenia e anemia. Studi comparativi, in vitro e clinici, hanno dimostrato che la tossicità ematologica di epirubicina è inferiore a quella di dosi equimolari di doxorubicina. La minore tossicità ematologica, unita all'inferiore cardiotoxicità, consente di intensificare le dosi nei trattamenti con epirubicina.

Altri effetti collaterali che possono insorgere con frequenza e intensità variabile durante la terapia con epirubicina sono: nausea, vomito, diarrea, febbre, alopecia, ulcerazioni orali e gastro-intestinali.

3.5.6 Formulazione

La specialità per uso clinico a base di epirubicina attualmente impiegata è costituita da fiale monodose pronte all'uso di soluzione di epirubicina cloridrato, commercializzata con nomi diversi a seconda dei paesi da Pfizer Inc, New York, NY, USA. Si presenta come una soluzione limpida di colore rosso. Le fiale contengono 50 mg o 200 mg di epirubicina cloridrato rispettivamente in 25 ml o in 100 ml, formulata con cloruro sodico e acqua per preparazioni iniettabili; ogni ml di soluzione contiene una dose di farmaco di 2 mg. Il pH della soluzione viene stabilizzato a 3.0 con l'aggiunta di acido cloridrico. Le fiale sono in forma sterile e sono solo per uso endovenoso. Devono essere conservate al riparo dalla luce a una temperatura compresa fra 2 e 8°C [127].

3.6 Acido folico

Un significativo interesse nel campo della terapia antitumorale è rappresentato dallo studio di meccanismi di endocitosi naturali per il *targeting* attivo di farmaci, ad esempio legando a *carrier* polimerici [134] molecole come ormoni, vitamine o fattori di crescita i cui recettori sono notoriamente espressi o sovraespressi nei tessuti tumorali [8]. Particolare interesse in questo campo ha recentemente mostrato il recettore per la vitamina acido folico (FR), altrimenti conosciuto come la proteina di membrana ad alta affinità per il folato.

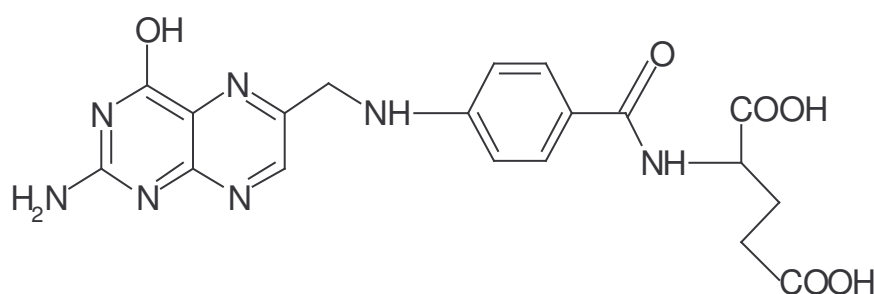


Figura 3.13: Struttura di acido folico

FR è una glicoproteina con un peso molecolare di circa 38 kDa. Nell'uomo ne sono state identificate tre isoforme, denominate α , β e γ/γ' . FR- α e FR- β sono proteine di membrana ancorate al glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI), mentre FR- γ e FR- γ' (una forma troncata della proteina) sono forme solubili, perché prive dell'ancora di GPI [135]. FR- α è l'isoforma a più alta affinità per il folato, con una costante di dissociazione $K_D \sim 0.1$ nM, mentre FR- β presenta una K_D più alta, ~ 1 nM e FR- γ intermedia $K_D \sim 0.4$ nM [135,136].

Mentre un'elevata espressione di FR è stata frequentemente osservata in vari tipi di cancro umano, il recettore è generalmente assente nella maggior parte dei normali tessuti con l'eccezione dei plessi corioidei, della placenta e a livelli più bassi in polmone, tiroide e reni [136,137]. FR è frequentemente sovraespresso in cellule tumorali in coltura e in tumori epiteliali, in particolare nel carcinoma ovarico (90% dei casi), di cui costituisce anche un utile marker [138,134]. Altri tipi di tumore sovraesprimono questo recettore, in particolare quello all'endometrio, al cervello, al polmone, al seno e al rene [139]. L'isoforma FR- α è sovraespressa

nei tumori maligni epiteliali, mentre quella FR- β in sarcomi e leucemie mieloidi, permettendo così il *targeting* ad un vasto numero di neoplasie [135].

Va inoltre precisato come il recettore sia fisiologicamente presente solo nella membrana apicale delle cellule epiteliali, quindi, essendo questa inaccessibile al flusso sanguigno, la cellula è protetta dall'azione di farmaci derivatizzati con acido folico. Dopo la trasformazione maligna la polarità della cellula viene persa e il recettore diventa accessibile al flusso ematico [135].

Le cause della sovraespressione di FR nei tessuti tumorali rimangono non del tutto chiare. Innanzitutto i folati sono essenziali per la sopravvivenza della cellula; essi, dopo l'attivazione a tetraidrofolati, sono richiesti per numerosi processi biochimici, inclusi sintesi di DNA e RNA e reazioni di transmetilazione, quindi particolarmente importanti per cellule in rapida divisione. Studi recenti hanno però mostrato che elevati livelli di FR inducono proliferazione cellulare non solo mediando l'*uptake* del folato, ma anche generando segnali regolatori; si ipotizza infatti che FR partecipi ad un complesso macromolecolare che genera segnali intracellulari implicati nel modulare processi di sopravvivenza cellulare e proliferazione [140].

Le cellule, tramite specifici recettori, sono in grado di endocitare diversi tipi di macromolecole. FR internalizza l'acido folico seguendo un processo di endocitosi mediante vescicole non rivestite di clatrina, detta potocitosi. Il recettore è raggruppato in caveole, piccole invaginazioni della membrana non rivestite; queste, come conseguenza del legame dell'acido folico al suo recettore, si sigillano creando una vescicola che rimane legata alla membrana plasmatica. Il contenuto della vescicola viene rapidamente acidificato con conseguente dissociazione di acido folico da FR, permettendo così alla vitamina di passare nel citoplasma attraversando la membrana tramite una proteina *carrier*. Infine le caveole si aprono e riespongono FR nuovamente verso lo spazio extracellulare [141,142,143].

Sono state sviluppate due diverse strategie per il *targeting* di farmaci a FR: il legame ad anticorpi monoclonali (es: MOV18) per FR e il legame all'acido folico. Il primo approccio, rispetto al secondo, ha due grandi svantaggi: la dimensione dell'anticorpo che conferisce una bassa capacità di diffusione attraverso barriere biologiche e l'immunogenicità che non consente somministrazioni successive. Inoltre acido folico è stabile, non costoso, ha un'affinità molto elevata per il suo recettore e viene endocitato molto efficacemente [144,136]. Infatti quando il folato è covalentemente legato ad una macromolecola *carrier*, come il PEG, tramite il suo residuo γ -carbossilico la sua affinità per FR rimane inalterata. Risulta quindi più promettente l'uso del ligando endogeno rispetto a quello di un anticorpo monoclonale [145].

4. Materiali e Metodi

4.1 Materiali

4.1.1 Reagenti

Gemcitabina è stata gentilmente fornita dal Prof. Luigi Cattel dell'Università di Torino, laboratorio di Chimica Farmaceutica Applicata. Epirubicina è stata acquistata da Dong-A Pharm. Co LTD (Seul, Corea). I vari tipi di poli-(etilenglicole) sono stati acquistati da Nektar Corp (Huntsville, AL, USA). Acido folico, acido L-2-aminoadipico e 1,5-diaminopentano sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA).

Terbutilato di potassio, *tert*-butilbromoacetato, N-idrossisuccinimide (NHS), N,N'-dicicloesilcarbodiimide (DCC), acido trifluoroacetico (TFA), trietilamina e iodio sono stati acquistati da Fluka Chemika (Masserschmittstr, D). Acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS), BaCl₂, p-nitrofenil-cloroformiato e paraformaldeide sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA). Glicil-glicina (Gly-Gly) è stata fornita da Merk (Darmstadt, Germania). I solventi: toluene, *tert*-butanolo, alcol-etilico, diclorometano, cloroformio, acetonitrile, dimetilsolfossido (normale e sterile) e dimetilsolfossido-d₆ sono stati forniti da Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA), dietil-etero è stato acquistato da Carlo Erba (Milano, Italia), N,N-dimetilformamide (DMF) e piridina sono state acquistate da Fluka Chemika (Masserschmittstr, D). I sali sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA).

L'enzima ricombinante umano citidin-deaminasi (attività specifica 21 U/ml) è stato gentilmente fornito da Vicenzetti e collaboratori (Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Camerino, Italia) e la sua attività enzimatica è stata valutata in accordo con Vicenzetti e collaboratori.

L'anticorpo monoclonale primario anti-FR Mov18 è stato acquistato da Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA) mentre l'anticorpo secondario di capra IgG anti-topo coniugato con fluoresceina-isotiocianato è stato acquistato da Jackson Immunoresearch Europe Ltd (Suffolk, UK).

I terreni di coltura RPMI 1640, F-12 Ham, DMEM e FDMEM sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA). Siero bovino fetale e siero bovino neonatale sono stati

acquistati da Seromed GmbH (Wien, Austria). Penicillina, streptomina e amfotericina B sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). L-glutamina, tripsina, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT), leu-peptina e il colorante vitale trypan-blue sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

Il mezzo di montaggio per gli studi di immunofluorescenza è stato acquistato da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

4.1.2 Strumentazione

Le misurazioni di pH sono state eseguite con un pHmetro mod. 82 radiometer (Copenhagen, Danimarca) con elettrodo METTLER Toledo Inlab 422.

Le titolazioni sono state eseguite con un titolatore automatico Basic Tritino mod. 794 della ditta Metrohm (Herisau, Svizzera).

Per la sterilizzazione delle soluzioni acquose è stato utilizzato un sistema Millipore (Benford, MA, USA) con filtri a porosità 0.22 μm .

Le misure spettrofotometriche sono state realizzate con spettrofotometri UV-VIS λ_1 e λ_{25} Perkin-Elmer (Northwolk, CT, USA).

Per l'evaporazione di grandi volumi di solventi organici è stato usato un evaporatore rotante Rotavapor mod. R110 della ditta Buchi. Per l'evaporazione di piccoli volumi di solventi organici è stato usato uno strumento Heto Vacuum Centrifuge della ditta HETO Lab. Equipment (Birkerod, Danimarca).

Per la liofilizzazione delle soluzioni è stato usato un liofilizzatore Hetosicc della ditta HETO Lab. Equipment (Birkerod, Danimarca).

Le separazioni cromatografiche sono state condotte mediante un sistema di gel-filtrazione della ditta Pharmacia Biotech (Uppsala, Svezia) con colonna Pharmacia Fine Chemicals (l=100cm; \varnothing =2.5cm), resina LH-60, pompa PUMP P-50 Pharmacia Biotech e raccoglitore di frazioni Pharmacia LKB RediFrac.

Le analisi cromatografiche in HPLC sono state eseguite usando uno strumento costituito da due pompe LC-10 AD, collegate ad un rivelatore UV SPD-10AV e ad un integratore Class VP Chromatography Data System Version 4.2 della ditta Shimadzu (Kioto, Giappone). Per l'analisi in RP-HPLC è stata usata una colonna analitica Jupiter C₁₈ Phenomenex (250 x 4.6 mm, 5 μm) mentre per la cromatografia di gel-filtrazione in HPLC è stata usata una colonna Superose 12 HR.

Gli eluenti usati per le analisi in RP-HPLC sono stati sonicati con un sistema ad ultrasuoni Ultrasonic Cleaner mod. 5210 Branson (Dambury, CT, USA).

Gli spettri NMR sono stati eseguiti con uno strumento Bruker Spectrospin 300 MHz.

Per gli studi di rilascio e di stabilità le soluzioni sono state mantenute in un bagno termostato HETO Lab. Equipment (Birkerød, Danimarca), provvisto di agitatore.

Per la centrifugazione di soluzioni di piccolo volume è stata usata una centrifuga Eppendorf mod. 5414.

Per le colture cellulari è stato utilizzato un incubatore Water Jacketed CO₂ Incubator Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA).

È stato utilizzato un lettore di piastre Victor² Wallac 1420 Multilabel HTS Counter Perkin Elmer (Northwolk, CT, USA).

Per gli studi di internalizzazione e localizzazione cellulare è stato utilizzato un microscopio confocale Leica della Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D) e un citofluorimetro Cytomics FC500 Beckman Coulter Inc. (Fullerton, CA, USA).

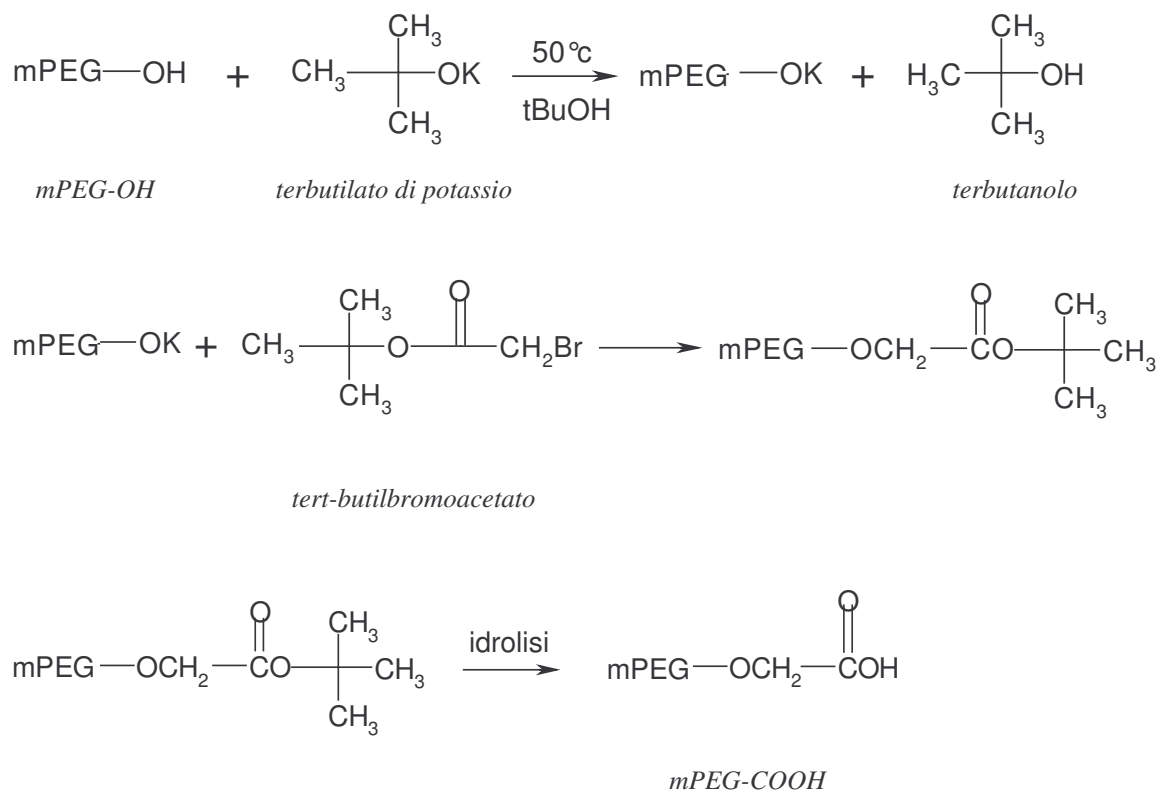
4.1.3 Animali utilizzati per gli studi *in vivo*

Gli studi di farmacocinetica di gemcitabina e coniugati sono stati eseguiti su topi femmina del ceppo Balb/C, del peso di circa 25 g. Le procedure che coinvolgono l'utilizzo di animali e la loro salute sono conformi alle linee guida istituzionali che ottemperano alle leggi e alle politiche nazionali ed internazionali. Gli animali sono stati mantenuti in uno stabulario in condizioni controllate, a temperatura costante (20-25°C), con cicli luce-buio di 12 ore e con cibo ed acqua *ad libidum*. Prima dell'iniezione gli animali sono stati anestetizzati con Zoletil[®] (Virbac Srl) (35 mg/kg) e Rompum[®] (Bayer SpA) (2 mg/kg), mentre per i prelievi sono stati anestetizzati a livello oculare con Novesina[®] (Novartis Farma SpA). Come anticoagulante si usa Eparina Vister[®] (Pfizer Italia Srl).

4.2 Sintesi e caratterizzazione dei coniugati mPEG-gemcitabina

4.2.1 Funzionalizzazione di mPEG-OH a mPEG-OCH₂-COOH

La reazione di derivatizzazione è stata condotta partendo da monometossi-poli(etilenglicole) lineare mPEG-OH di peso molecolare 5 e 20 kDa, come riportato nello schema 4.1.



Schema 4.1: Funzionalizzazione di mPEG-OH a mPEG-OCH₂-COOH

Nella reazione con mPEG₂₀₀₀₀-OH, 2.5 g (0.125 mmoli, PM 20 Da) di polimero vengono anidrificati mediante distillazione dell'acqua in presenza di circa 40 ml di toluene, posti a distillare fino all'evaporazione di circa 30-32 ml di solvente. Si aggiungono sotto continua agitazione 250 µl (0.25 mmoli) di una soluzione 1M di terbutilato di potassio in terbutanolo, preparata sciogliendo a caldo 56.11 mg (0.5 mmoli, PM 112.22 Da) di terbutilato di potassio in 500 µl di terbutanolo. Si lascia reagire per 1 ora a 50°C a refluxo e si aggiungono 37 µl (0.25 mmoli, PM 195.06 Da, d = 1.321 g/ml) di tert-butilbromoacetato. Si lascia reagire per 1 ora a 50°C a refluxo e 18 ore a temperatura ambiente; si filtra su gooch a porosità 4 con celite® per eliminare il KBr formatosi, aggiungendo prima nel pallone di reazione alcuni ml di CH₂Cl₂ per

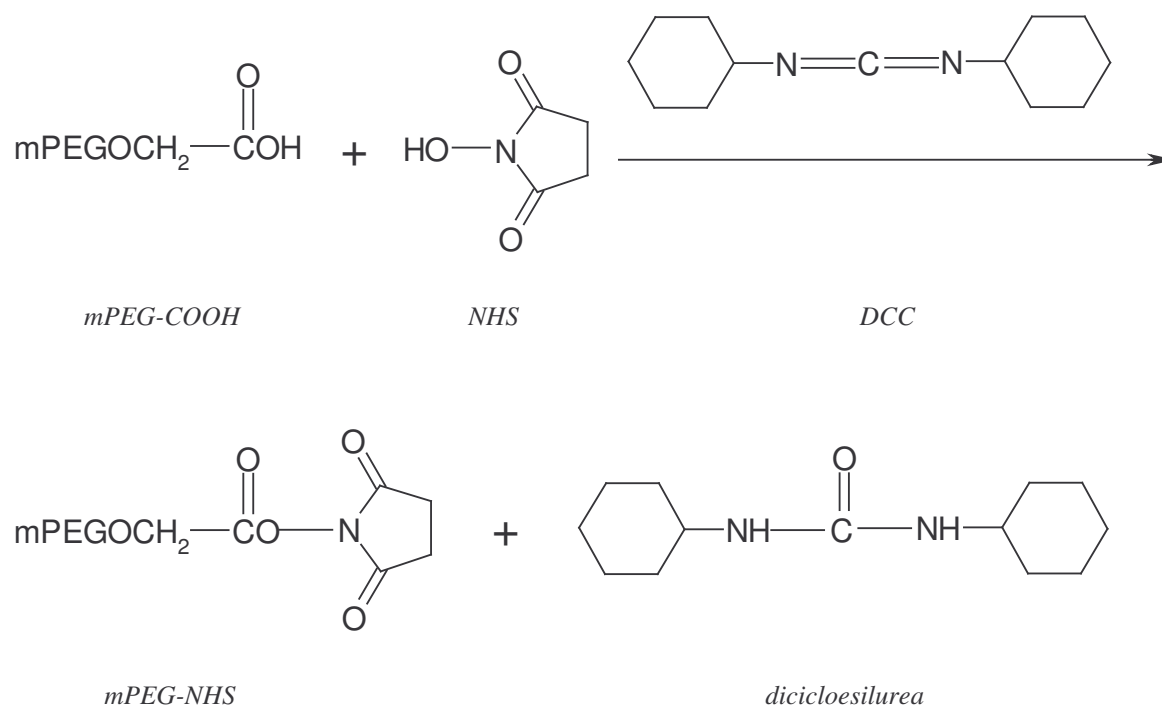
facilitare la filtrazione. Si riduce a piccolo volume all'evaporatore rotante, si aggiungono sotto agitazione 15 ml di una miscela di TFA (45.4%), CH₂Cl₂ (54.5%) e acqua (0.1%) e si lascia reagire per 3 ore. Si elimina il TFA all'evaporatore rotante, riprendendo il residuo con CH₂Cl₂ per 6-7 volte, fino a completa scomparsa di TFA, e si fa precipitare goccia a goccia in circa 250 ml di etanolo: si ottiene un precipitato, costituito da mPEG-COOH, che si lascia riposare a -20°C per 4-5 ore, in seguito si filtra su gooch a porosità 3 e si pone in essiccatore.

Lo stesso procedimento si segue per mPEG₅₀₀₀-OH.

Per determinare l'avvenuta reazione si titolano i gruppi carbossilici con NaOH 0.01N impiegando un titolatore automatico.

4.2.2 Attivazione del gruppo carbossilico di mPEG-COOH con N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) e N-idrossuccinimide (NHS)

mPEG₂₀₀₀₀-COOH viene derivatizzato ad estere attivo mediante reazione con N-idrossisuccinimide (NHS), in presenza di N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC), secondo la reazione riportata nello schema 4.2:



Schema 4.2: Formazione dell'estere attivo di mPEG-COOH con DCC e NHS

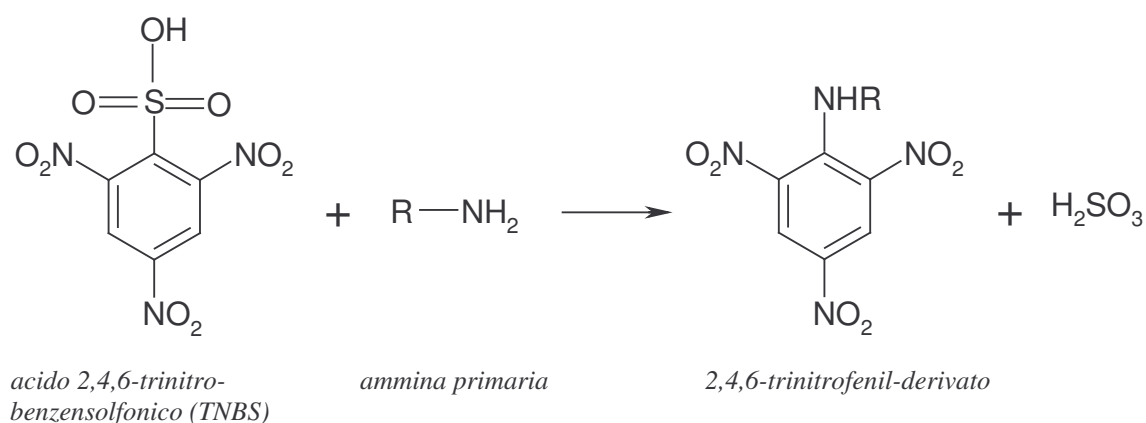
800 mg (0.04 mmoli, PM 20058 Da) di mPEG₂₀₀₀₀-COOH vengono sciolti in 5-6 ml di CH₂Cl₂ anidro sotto agitazione e addizionati di 9.21 mg (0.08 mmoli, PM 115.09 Da) di N-idrossisuccinimide (NHS). A solubilizzazione ultimata si aggiungono 16.51 mg (0.08 mmoli, PM 206.33 Da) di N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) e si lascia reagire per 18 ore. Si filtra su gooch a porosità 4 per eliminare la dicicloesilurea formatasi e la soluzione viene aggiunta goccia a goccia a circa 250 ml di etere etilico e posta a precipitare a -20°C per 4-5 ore. Il precipitato di mPEG-NHS che si forma viene filtrato su gooch e posto in essiccatore.

I polimeri mPEG₅₀₀₀-COOH e mPEG₂₀₀₀₀-COOH vengono attivati ad estere succinimidico con lo stesso procedimento.

Il grado di attivazione viene determinato mediante saggio di Snyder-Sobocinski, come riportato al paragrafo 4.2.3.

4.2.3 Metodo per la determinazione del grado di attivazione di mPEG-NHS

Il grado di attivazione di mPEG-NHS viene determinato facendo reagire il polimero con una quantità equimolare di glicil-glicina (Gly-Gly) e titolando poi i gruppi amminici residui del dipeptide con saggio colorimetrico di Snyder-Sobocinski [146], che utilizza l'acido 2,4,6-trinitro-benzensolfonico (TNBS): questo infatti reagisce in soluzione alcalina prontamente e stechiometricamente con i gruppi amminici alifatici primari dando trinitro-fenil-derivati, di colore giallo, che presentano due picchi di assorbimento, a 340 nm e a 420 nm (schema 4.3).



Schema 4.3: Reazione fra acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico e ammine primarie

A 0.5 ml di una soluzione di glicil-glicina (0.002157 mmoli/ml, PM 132.12 Da) in tampone borato 0.1M a pH 8 vengono aggiunti 21.70 mg (0.001078 mmoli, PM 20125 Da) di

mPEG₂₀₀₀₀-NHS, in modo che il rapporto stechiometrico fra i gruppi carbossilici del PEG e i gruppi amminici del dipeptide sia di 1:1, e si lascia reagire per 30 minuti.

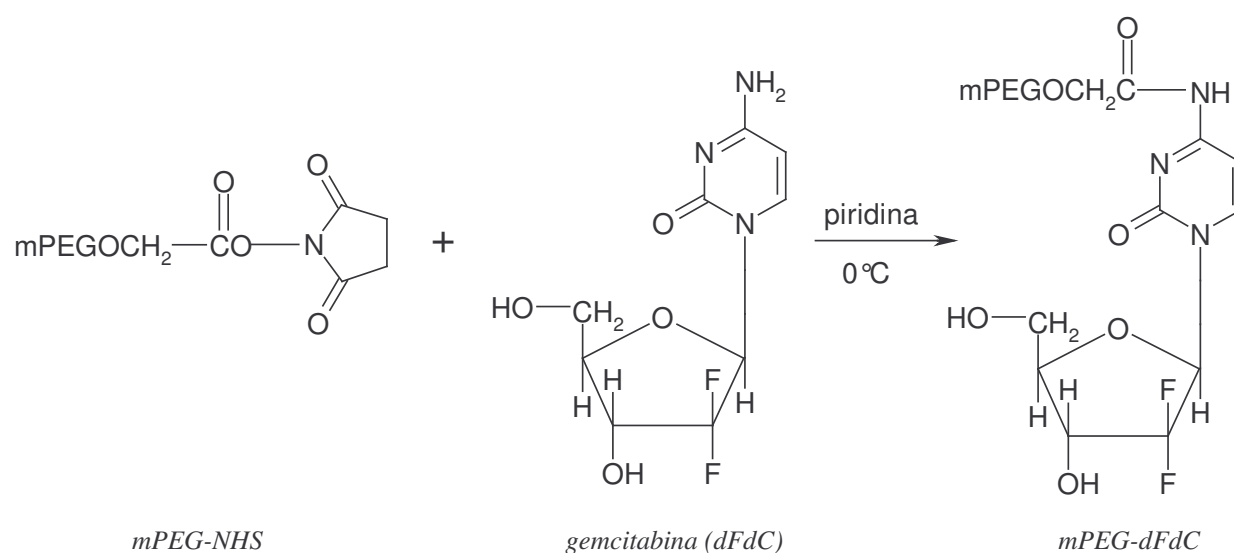
Si esegue il saggio preparando tre soluzioni:

- il bianco, dato da 975 μ l di tampone borato 0.1M a pH 9.3 e 25 μ l di soluzione di TNBS in DMF (7.34 mg/ml);
- il riferimento, dato da 950 μ l di tampone borato, 25 μ l di soluzione di TNBS in DMF e 25 μ l di soluzione di Gly-Gly (0.002157 mmoli/ml);
- il campione, dato da 950 μ l di tampone borato, 25 μ l di soluzione di TNBS in DMF e 25 μ l di miscela di reazione polimero+Gly-Gly.

Dopo 30 minuti si misura l'assorbanza a 420 nm.

4.2.4 Sintesi e purificazione dei coniugati mPEG-dFdC

I coniugati mPEG-dFdC, a diverso peso molecolare e a diversa struttura, si ottengono mediante legame ammidico fra il gruppo carbossilico attivato del mPEG e il gruppo amminico primario aromatico di gemcitabina, secondo lo schema di reazione 4.4. Studi preliminari hanno dimostrato che le migliori rese di reazione in termini di percentuale di farmaco coniugato si ottengono utilizzando un rapporto molare polimero/farmaco di 1:3.



Schema 4.4: Sintesi di mPEG-dFdC

Si sciolgono 29.22 mg (0.111 mmoli, PM 263.20 Da) di gemcitabina in 5 ml di piridina anidra e poi si aggiungono a 0°C in bagno di ghiaccio e sotto agitazione 750 mg (0.037 mmoli, PM 20125 Da) di mPEG₂₀₀₀₀-NHS. Si lascia reagire a temperatura ambiente per 72 ore.

Il prodotto mPEG₂₀₀₀₀-dFdC viene separato da gemcitabina in eccesso mediante cromatografia di gel-filtrazione su colonna LH-60 preparativa (l=100cm; Ø=2.5cm), eluendo con N,N-dimetilformammide (DMF) ad un flusso di 0.4 ml/min in un sistema cromatografico Pharmacia. Sulle frazioni raccolte si eseguono letture spettrofotometriche a 268 nm, per gemcitabina, e a 535 nm con saggio allo iodio come riportato al paragrafo 4.2.5 [147], per individuare il PEG. Le frazioni contenenti il coniugato vengono riunite e portate a secchezza mediante evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con CH₂Cl₂ anidro e aggiunto goccia a goccia in circa 250 ml di etere etilico. Dopo 4-5 ore a -20°C il precipitato di mPEG₂₀₀₀₀-dFdC formatosi viene filtrato su gooch e posto in essiccatore.

I prodotti mPEG₅₀₀₀-dFdC e mPEG₂₀₀₀₀-dFdC si ottengono con la stessa procedura.

4.2.5 Saggio allo iodio per la determinazione del mPEG presente nelle frazioni

Per la determinazione qualitativa di mPEG si sfrutta il complesso colorato che questo forma per reazione con iodio.

A 500 µl di acqua si aggiungono 25 µl della soluzione contenente il polimero, 250 µl di una soluzione al 5% di BaCl₂ in HCl 1N e 250 µl di una soluzione di I₂ (1.27 g di I₂ in 100 ml di KI al 2% in acqua). Nel caso di frazioni contenenti DMF, si aggiungono 125 µl di soluzione di BaCl₂ e 125 µl di soluzione di I₂, perché DMF dà interferenza nel saggio. Dopo 15 minuti di reazione si misura l'assorbanza a 535 nm.

4.2.6 Caratterizzazione dei coniugati mPEG-dFdC

I prodotti ottenuti vengono caratterizzati mediante spettrofotometria UV-Vis in soluzione acquosa tamponata a pH 7.4, spettroscopia ¹H-NMR in DMSO-d₆, cromatografia liquida ad alte prestazioni su fase inversa (RP-HPLC) e cromatografia di gel-filtrazione in HPLC.

Per la caratterizzazione in RP-HPLC, i campioni vengono sciolti in tampone fosfato NaH₂PO₄ 2.5mM a pH 7.0 e analizzati in colonna analitica C₁₈ utilizzando come eluenti tampone

fosfato NaH_2PO_4 2.5mM a pH 7.0 (eluente A) e una miscela di tampone e acetonitrile al 50% (eluente B), con il gradiente di B riportato in tabella 4.1:

Tempo di corsa (minuti)	% di B nella fase mobile
0	5
5	5
15	50
20	100
30	100
40	5

Tabella 4.1: Gradiente di eluizione in RP-HPLC

I cromatogrammi vengono registrati mediante misura di assorbanza a 268 nm. La quantità di gemcitabina libera non legata covalentemente, presente nei campioni di mPEG-dFdc come impurezza, si può determinare direttamente dall'area del picco mentre gemcitabina legata viene determinata sempre mediante HPLC, dopo idrolisi basica in NaOH 0.1N a 40°C per un'ora.

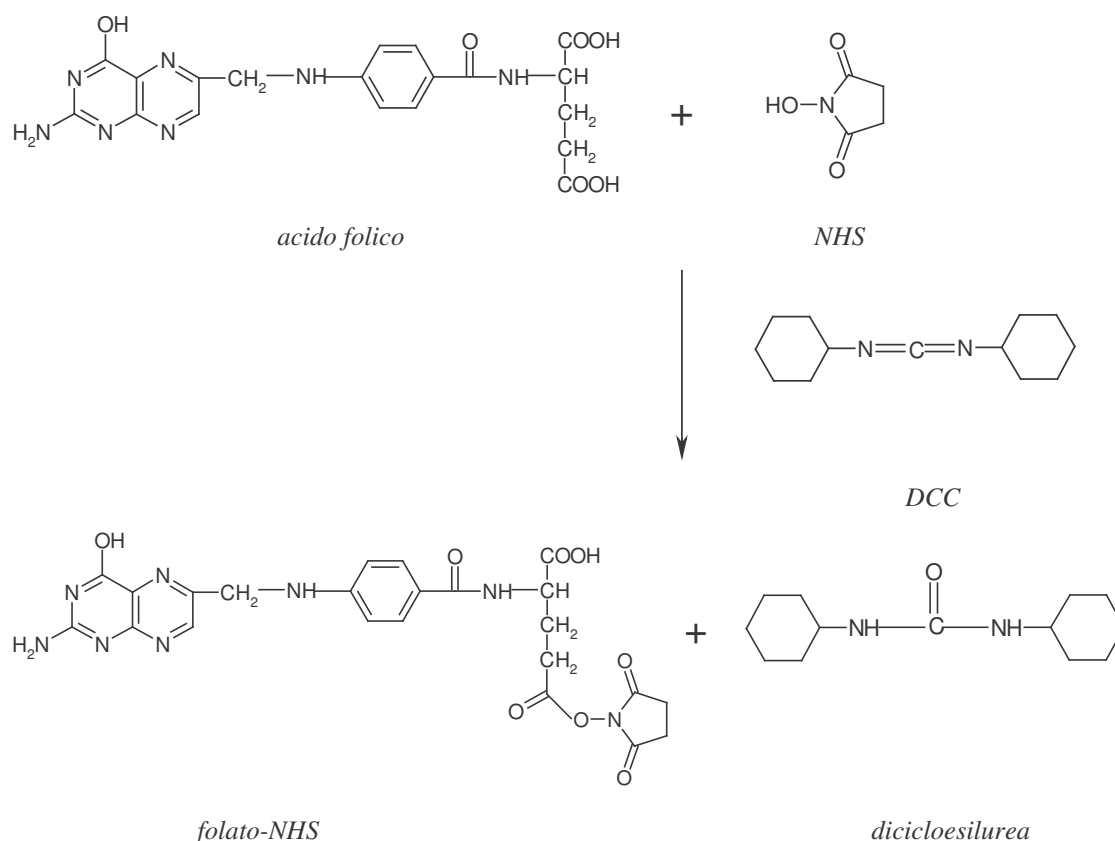
Infine per la caratterizzazione cromatografica di gel-filtrazione in HPLC i diversi coniugati vengono sciolti in acqua ed analizzati in HPLC con colonna Superose 12 HR usando come eluente tampone TRIS 0.02M e NaCl 0.1M a pH 7.5 e un rivelatore RI; vengono analizzati anche dei campioni di mPEG-OH a diverso peso molecolare per confronto.

4.3 Sintesi e caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-gemcitabina

4.3.1 Sintesi del coniugato folato-PEG₄₈₀₀-gemcitabina

4.3.1.1. Sintesi dell'estere attivo dell'acido folico (folato-NHS)

Il derivato folato-NHS è preparato per esterificazione del carbossile in γ dell'acido folico con N-idrossisuccinimide (NHS) in dimetilsolfossido anidro, in presenza di N,N'-dicioesilcarbodiimide (DCC) e trietilamina [148], come riportato nello schema 4.5.



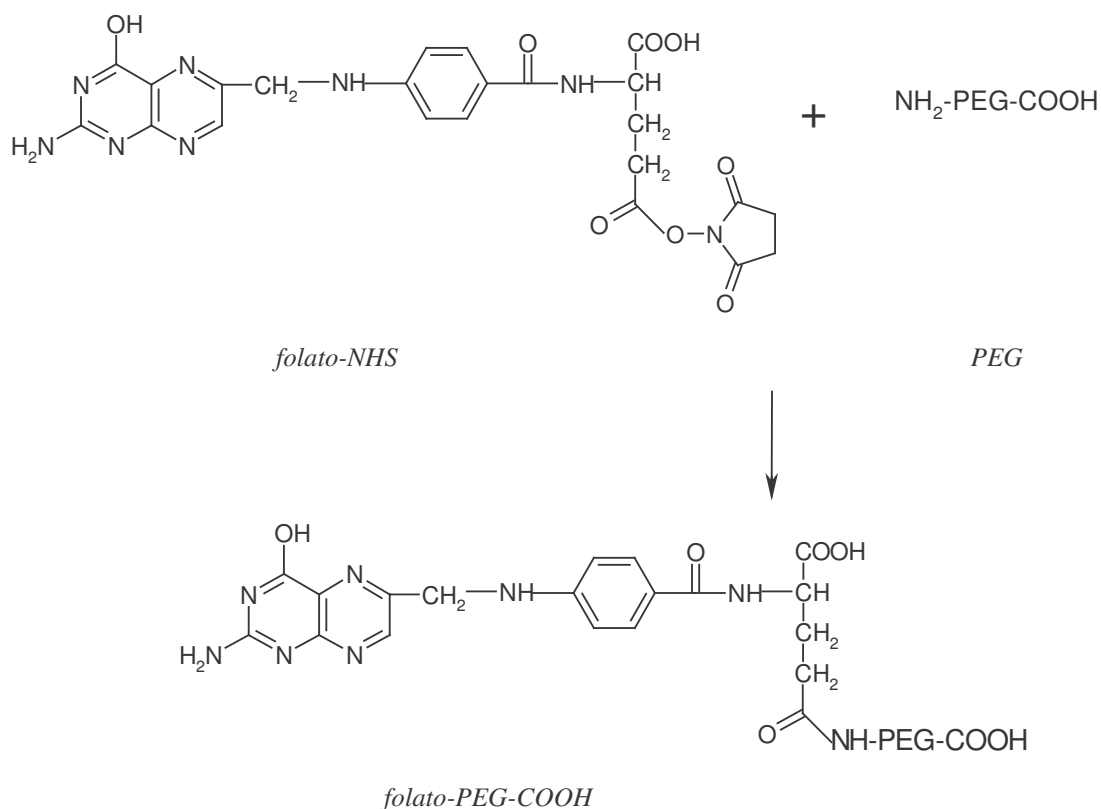
Schema 4.5: Sintesi dell'estere succinimidico di acido folico

A 500 mg (1.133 mmoli, PM 441.40 Da) di acido folico, sciolti in 10 ml di DMSO anidro, vengono aggiunti 240 μ l (1.699 mmoli, PM 101.19 Da, $d=0.726$ g/ml) di trietilamina, poi 260.79 mg (2.266 mmoli, PM 115.09 Da) di NHS e 467.54 mg (2.266 mmoli, PM 206.33 Da) di DCC e si lascia reagire sotto agitazione al riparo dalla luce tutta la notte. Si filtra su gooch a porosità 4 per eliminare la dicioesilurea formatasi e la soluzione viene aggiunta goccia a goccia a 200 ml di etere etilico e posta a precipitare a -20°C per 4 ore. Il precipitato di folato-NHS viene filtrato su gooch a porosità 3, lavato più volte con etere etilico per eliminare il DMSO residuo e posto in essiccatore.

Il grado di attivazione viene determinato mediante saggio colorimetrico di Snyder-Sobocinski; in questo caso però viene preparata anche una quarta soluzione per determinare eventuali interferenze dell'acido folico che assorbe alla stessa lunghezza d'onda a cui si esegue il saggio. La soluzione è costituita da 950 μ l di tampone borato 0.1M a pH 9.3, 25 μ l di soluzione di TNBS e 25 μ l di soluzione di folato-NHS in tampone borato 0.1M a pH 8.0, equimolare rispetto alla soluzione aggiunta nel campione.

4.3.1.2 Sintesi e purificazione di folato-PEG-COOH

Il prodotto folato-PEG-COOH si ottiene mediante la formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossilico in γ dell'acido folico, attivato ad estere succinimmidico, e il gruppo amminico del PEG eterobifunzionale, come riportato nello schema 4.6. Le migliori rese di reazione si sono ottenute impiegando un rapporto molare polimero/acido folico di 1:4, come riportato in studi precedenti [149].



Schema 4.6: Sintesi di folato-PEG-COOH

359.7 mg (0.668 mmoli, PM 538.47 Da) di folato-NHS, sciolti in 6 ml di DMSO anidro, vengono aggiunti goccia a goccia a 800 mg (0,167 mmoli, PM 4800 Da) di NH₂-PEG-COOH, precedentemente solubilizzati in 6 ml di DMSO anidro. Si aggiusta il pH della reazione a 9 e si lascia reagire una notte a temperatura ambiente e sotto agitazione.

Alla miscela di reazione si aggiungono 5 ml di acqua, si porta il pH a un valore di circa 7.5, si aggiungono poi 5 ml di DMF e 2-3 ml di soluzione satura di NaCl (BRINE) per facilitare la separazione di fase, e si purifica il prodotto folato-PEG-COOH da acido folico in eccesso mediante estrazioni dalla fase acquosa con CHCl₃ (8 x 80 ml). La fase organica raccolta viene anidrificata con Na₂SO₄, filtrata su gooch per eliminare il sale, e aggiunta goccia a goccia a 200 ml di etere etilico sotto agitazione. Dopo 4 ore a -20°C, il precipitato di folato-PEG-COOH viene raccolto per filtrazione su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

La quantità di acido folico legato alla catena di PEG viene determinata mediante saggio colorimetrico con TNBS, come riportato al paragrafo 4.3.1.3.

4.3.1.3 Determinazione della quantità di acido folico coniugato con TNBS

La quantità di acido folico legato alla catena di PEG viene determinata titolando i gruppi amminici che non hanno reagito con TNBS, seguendo il principio alla base del saggio di Snyder-Sobocinski.

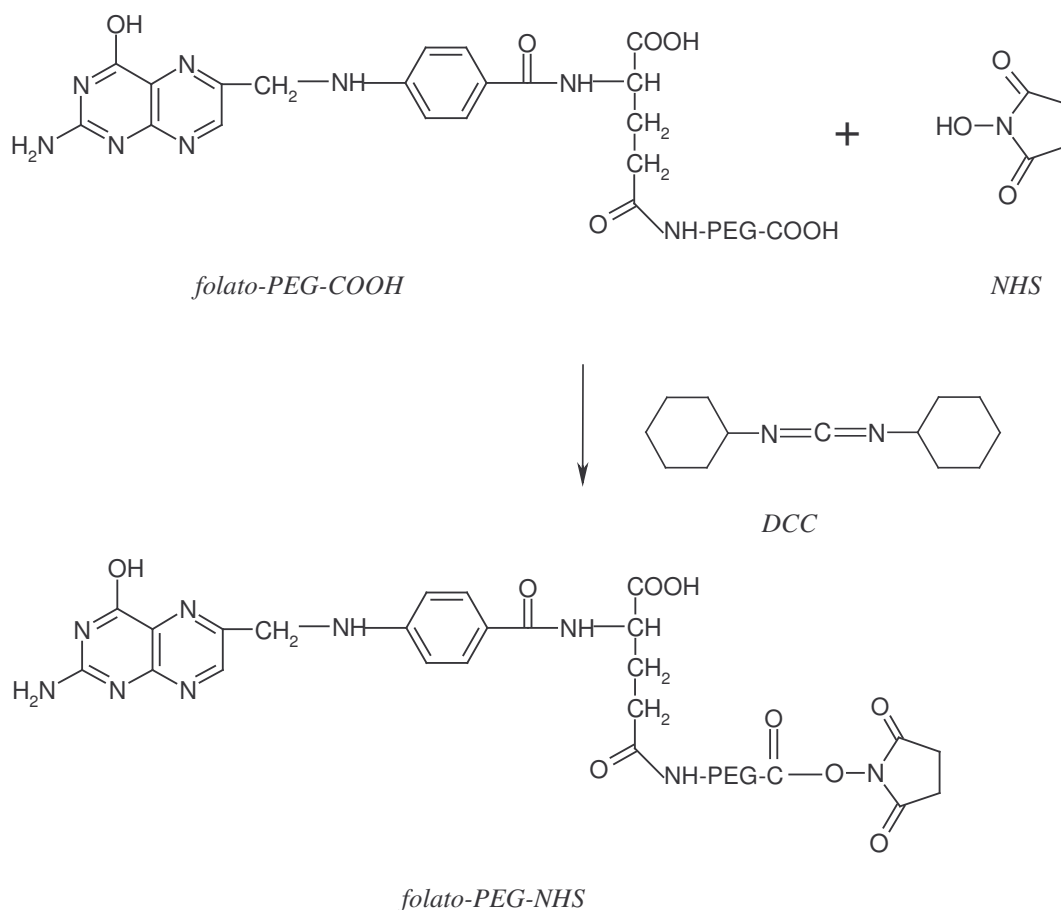
Il saggio si esegue preparando, anche in questo caso, 4 soluzioni:

- il bianco, dato da 975 µl di tampone borato 0.1M a pH 9.3 e 25 µl di soluzione di TNBS in DMF (7.34 mg/ml)
- il campione, dato da 950 µl di tampone borato 0.1M a pH 9.3, 25 µl di soluzione di TNBS e 25 µl di una soluzione di folato-PEG-COOH in tampone borato 0.1M a pH 8.0 (0.002157 mmoli/ml)
- il riferimento, dato da 950 µl di tampone borato 0.1M a pH 9.3, 25 µl di soluzione di TNBS e 25 µl di una soluzione di NH₂-PEG-COOH in tampone borato 0.1M a pH 8.0 (0.002157 mmoli/ml)
- la soluzione per valutare l'interferenza dell'acido folico, data da 975 µl di tampone borato 0.1M a pH 9.3 e 25 µl di soluzione di folato-PEG-COOH in tampone borato 0.1M a pH 8.0 (0.002157 mmoli/ml).

Dopo 30 minuti di reazione, si misura l'assorbanza a 420 nm.

4.3.1.4 Attivazione del gruppo carbossilico di folato-PEG-COOH con DCC e NHS

Il gruppo carbossilico di folato-PEG-COOH viene attivato ad estere succinimmidico mediante reazione con NHS e DCC, come riportato nello schema 4.7.



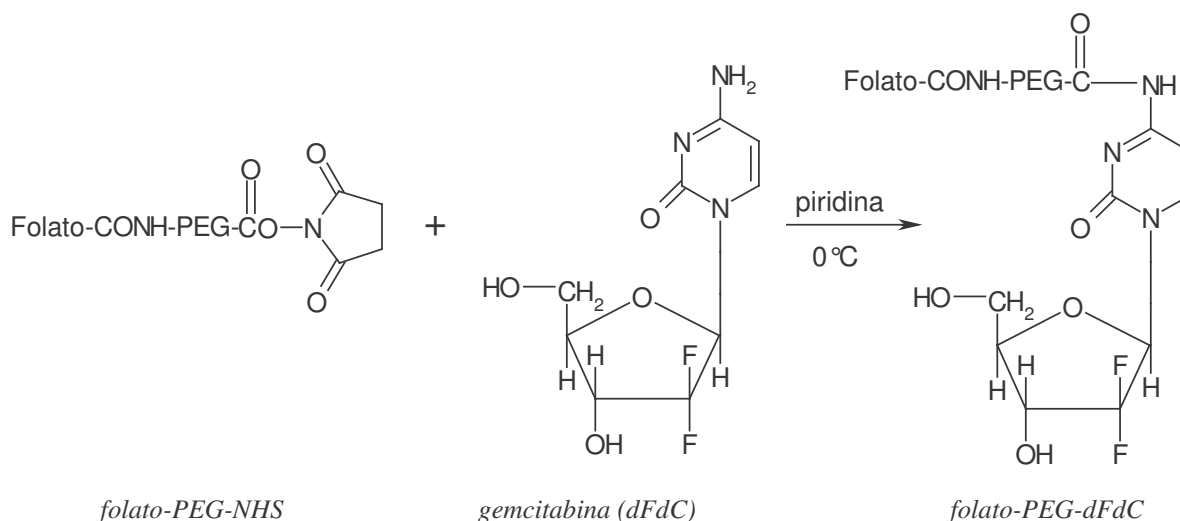
Schema 4.7: Sintesi dell'estere attivo di folato-PEG-COOH

A 700 mg (0.134 mmoli, PM 5241.40 Da) di folato-PEG-COOH solubilizzati in 5 ml di CH_2Cl_2 anidro vengono aggiunti 30.84 mg (0.268 mmoli, PM 115.09 Da) di NHS e 55.30 mg (0.268 mmoli, PM 206.33 Da) di DCC e si lascia reagire sotto costante agitazione per 4 ore. Si filtra poi su gooch a porosità 3 per eliminare la dicicloesilurea formatasi e si fa gocciolare in circa 200 ml di etere etilico sotto agitazione. Dopo 4 ore a -20°C il precipitato di folato-PEG-NHS viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

Il grado di attivazione viene calcolato con saggio colorimetrico di Snyder-Sobocinski, come riportato al paragrafo 4.2.3.

4.3.1.5 Sintesi e purificazione di folato-PEG-gemcitabina

Il coniugato folato-PEG-dFdC si ottiene per formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossilico attivato del PEG e il gruppo amminico aromatico di gemcitabina, come riportato nello schema 4.8.

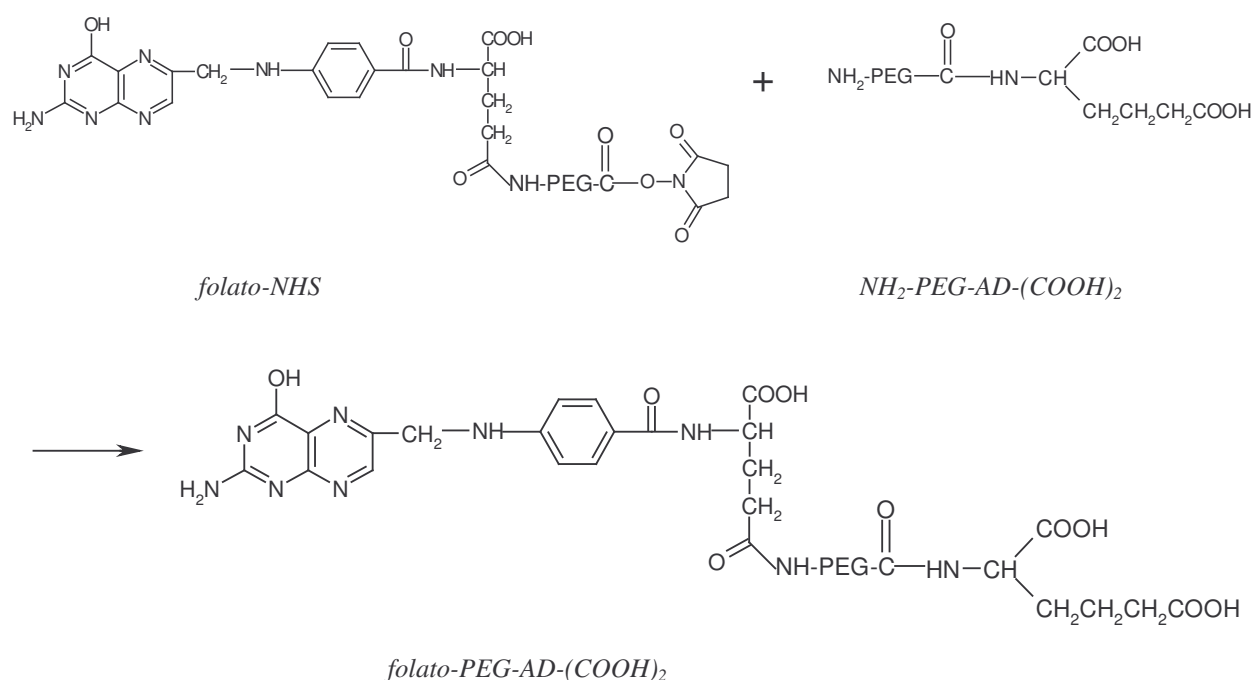


Schema 4.8: Sintesi di folato-PEG-dFdC

Si sciolgono 96.33 mg (0.366 mmoli, PM 263.20 Da) di gemcitabina in 5 ml di piridina anidra, in seguito si aggiungono 650 mg (0.122 mmoli, PM 5322.87 Da) di folato-PEG-NHS sotto agitazione a 0°C in bagno di ghiaccio e si lascia reagire per 72 ore a temperatura ambiente sotto costante agitazione.

Il prodotto folato-PEG-dFdC viene separato da gemcitabina in eccesso e da piridina mediante cromatografia di gel-filtrazione con colonna LH-60 preparativa (100 x 2.5 cm), eluendo con DMF con un flusso di 0.4 ml/min in un sistema cromatografico Pharmacia. Sulle frazioni raccolte si eseguono letture spettrofotometriche a 268 nm, per gemcitabina, e a 535 nm con saggio allo iodio come riportato al paragrafo 4.2.5, per PEG. Le frazioni contenenti il coniugato vengono riunite e portate a secchezza mediante evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con CH₂Cl₂ anidro e aggiunto goccia a goccia in circa 250 ml di etere etilico. Dopo 4-5 ore a -20°C il precipitato di folato-PEG-dFdC formatosi viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

La determinazione della quantità di gemcitabina legata si esegue mediante idrolisi selettiva del legame ammidico fra farmaco e polimero in ambiente basico di NaOH 0.1N a 40°C per un'ora e successiva analisi RP-HPLC.



Schema 4.11: Sintesi di folato-PEG-AD-(COOH)₂

Il procedimento è analogo a quello impiegato nella sintesi di folato-PEG-COOH, riportato al paragrafo 4.3.1.2. In breve: si aggiungono 267.09 mg (0.496 mmoli, PM 538.47 Da) di folato-NHS, sciolti in 7 ml di DMSO anidro, a una soluzione di 590 mg (0.124 mmoli, PM 4745.95 Da) di NH₂-PEG-AD-(COOH)₂ in 5 ml di DMSO anidro, si aggiungono 52 µl (0.372 mmoli, PM 101.19, d=0.726 g/ml) di trietilammina e si lascia reagire overnight al buio sotto agitazione e a temperatura ambiente. Il prodotto viene purificato dall'eccesso di acido folico mediante estrazioni con CHCl₃ (8 x 80 ml), come riportato al paragrafo 4.3.1.2. La fase organica raccolta, opportunamente disidratata con Na₂SO₄, filtrata su gooch per eliminare il sale e concentrata a piccolo volume con evaporatore rotante, viene fatta gocciolare in circa 150 ml di etere etilico sotto forte agitazione e dopo 4 ore a -20°C il precipitato di folato-PEG-AD-(COOH)₂ viene raccolto per filtrazione su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

Il prodotto ottenuto viene caratterizzato mediante spettroscopia ¹H-NMR e cromatografia RP-HPLC e la quantità di acido folico legato viene determinata mediante saggio colorimetrico con TNBS.

Analogo procedimento viene seguito per la sintesi di folato-PEG-βGlu-(COOH)₂.

4.3.2.3 Attivazione dei gruppi carbossilici di folato-PEG-AD-(COOH)₂ e folato-PEG-βGlu-(COOH)₂ con DCC e NHS

I gruppi carbossilici del derivato folato-PEG-AD-(COOH)₂ vengono attivati ad estere succinimmidico con NHS e DCC, come riportato al paragrafo 4.3.1.4.

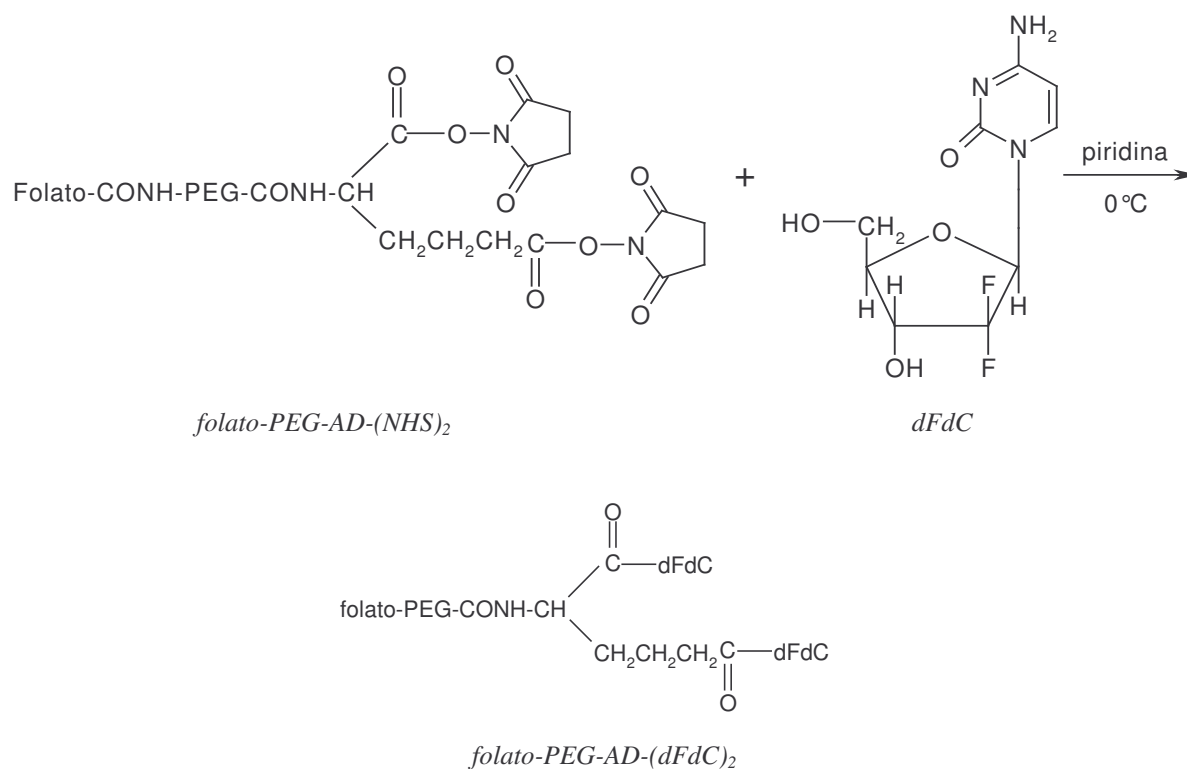
In breve: a 480 mg (0.093 mmoli, PM 5169.33 Da) di folato-PEG-AD-(COOH)₂, sciolti in 5-6 ml di CH₂Cl₂ anidro, si aggiungono 42.81 mg (0.372 mmoli, PM 115.09 Da) di NHS e 76.75 mg (0.372 mmoli, PM 206.33 Da) di DCC e si lascia reagire per 3 ore sotto agitazione. Si filtra poi su gooch a porosità 3 per eliminare la dicicloesilurea formatasi e si fa gocciolare la soluzione in circa 150 ml di etere etilico sotto forte agitazione, posto poi a -20°C per 4 ore. Il precipitato di folato-PEG-AD-(NHS)₂, raccolto per filtrazione su gooch a porosità 4, viene poi posto in essiccatore.

Si procedente in modo analogo per l'attivazione dei gruppi carbossilici di folato-PEG-βGlu-(COOH)₂.

Il grado di attivazione viene calcolato con il saggio di Snyder-Sobocinski, come riportato ai paragrafi 4.2.3 e 4.3.1.1.

4.3.2.4 Sintesi e purificazione di folato-PEG-AD-(dFdC)₂ e folato-PEG-βGlu-(dFdC)₂

La coniugazione di gemcitabina alla catena polimerica avviene per formazione di un legame ammidico fra i gruppi carbossilici attivati dell'amminoacido legato al PEG e il gruppo amminico aromatico del farmaco, secondo lo schema di reazione 4.12, con un procedimento analogo a quello seguito per la sintesi di folato-PEG-dFdC, riportato al paragrafo 4.3.1.5.



Schema 4.12: Sintesi di *folato-PEG-AD-(dFdC)₂*

Brevemente, si sciolgono 64.75 mg (0.246 mmoli, PM 263.20 Da) di gemcitabina in 5 ml di piridina anidra, si raffredda poi la soluzione a 0°C in bagno di ghiaccio e si aggiungono sotto agitazione 220 mg (0.041 mmoli, PM 5363.48 Da) di folato-PEG-AD-(NHS)₂ e si lascia reagire a temperatura ambiente sotto agitazione per 72 ore. Il prodotto folato-PEG-AD-(dFdC)₂ viene purificato da gemcitabina in eccesso e da piridina mediante cromatografia di gel-filtrazione con colonna LH-60 preparativa, eluendo con DMF con un flusso di 0.4 ml/min. Sulle frazioni raccolte si eseguono letture spettrofotometriche a 268 nm, per individuare gemcitabina, e a 535 nm con saggio allo iodio come riportato al paragrafo 4.2.5, per individuare PEG. Le frazioni contenenti il coniugato folato-PEG-AD-(dFdC)₂ vengono riunite e portate a secchezza mediante evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con CH₂Cl₂ anidro e aggiunto goccia a goccia in circa 250 ml di etere etilico sotto forte agitazione e, dopo 4-5 ore a -20°C, il precipitato di folato-PEG-AD-(dFdC)₂ formatosi viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

Per la sintesi di folato-PEG-βGlu-(dFdC)₂ si segue la stessa procedura.

La determinazione della quantità di gemcitabina legata viene effettuata dopo idrolisi selettiva del legame ammidico fra farmaco e polimero in ambiente alcalino per NaOH 0.1N a 40°C per un'ora e successiva analisi RP-HPLC.

4.3.3 Caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-dFdC e folato-PEG-(dFdC)₂

I prodotti folato-PEG-dFdC, folato-PEG-AD-(dFdC)₂ e folato-PEG-βGlu-(dFdC)₂ vengono caratterizzati mediante spettrofotometria UV-Vis in soluzione acquosa tamponata a pH 7.4, spettroscopia ¹H-NMR e ¹³C-NMR in CDCl₃ o in DMSO-d₆ e cromatografia liquida ad alte prestazioni a fase inversa RP-HPLC.

Per la caratterizzazione mediante RP-HPLC si usa una colonna C₁₈ utilizzando gli eluenti e il gradiente riportato in tabella 4.1. I cromatogrammi vengono registrati mediante misura di assorbanza a 268 nm.

4.4 Studi eseguiti sui coniugati PEG-gemcitabina

4.4.1 Studi di rilascio di gemcitabina in soluzione tampone a diverso pH

Gli studi di rilascio di gemcitabina dai diversi coniugati vengono condotti in soluzione tampone fosfato NaH_2PO_4 2.5mM a pH 6.0, 7.4 e 8.0 in bagno termostato a 37°C alla concentrazione di farmaco di 0.3 mg/ml. A vari intervalli di tempo vengono prelevati dei campioni fino a 7 giorni ed analizzati mediante RP-HPLC con colonna C_{18} analitica, nelle condizioni riportate in precedenza al paragrafo 4.2.6. Dall'area del picco di gemcitabina è possibile determinare la quantità di farmaco rilasciata nel tempo.

4.4.2 Studi di stabilità dei coniugati in plasma di topo

Gli studi di stabilità vengono condotti incubando i coniugati in plasma di topi femmine Balb/C a 37°C. A vari intervalli di tempo si eseguono dei prelievi analizzati poi via RP-HPLC con colonna C_{18} analitica usando le condizioni già riportate al paragrafo 4.2.6.

A titolo di esempio 15.61 mg di coniugato mPEG₂₀₀₀₀-dFdC vengono addizionati a 600 µl di plasma, ottenuto per centrifugazione di sangue di topo a 12000 rpm per 1 minuto, e posti ad incubare in bagno termostato a 37°C sotto costante agitazione. A vari intervalli di tempo si eseguono dei prelievi di 30 µl, cui si aggiungono 15 µl di una soluzione di ara-U (0.18 mg/ml in tampone fosfato 2.5mM a pH 7.0), utilizzato come standard interno, e 135 µl di ACN, per deproteinizzare la soluzione plasmatica. Si centrifuga per 3 minuti a 12000 rpm e si prelevano 150 µl del surnatante che vengono poi liofilizzati in Speed-Vac Concentrator. Il residuo viene ripreso con 50 µl di tampone fosfato 2.5mM a pH 7.0 e analizzato in RP-HPLC, nelle condizioni riportate precedentemente. La quantità di farmaco rilasciata viene calcolata in base all'area del picco di gemcitabina e del suo metabolita dFdU, eluiti a tempi differenti, tramite rette di taratura precedentemente calcolate.

Gli studi di stabilità vengono condotti anche su mPEG₂₀₀₀₀-dFdC (28.4 mg in 570 µl di plasma), su mPEG₅₀₀₀-dFdC (7.45 mg in 550 µl di plasma), su folato-PEG₄₈₀₀-dFdC (8.52 mg in 550 µl di plasma) e su folato-PEG₄₈₀₀-AD-(dFdC)₂ (2.35 mg in 600 µl di plasma).

4.4.3 Studi di stabilità nei confronti dell'enzima citidin-deaminasi

L'enzima plasmatico citidin-deaminasi (CDA) è il principale responsabile dell'inattivazione in circolo di gemcitabina, che viene convertita per deaminazione ossidativa in 2',2'-difluoro-2'-deossiuridina (dFdU), completamente inattivo. La coniugazione del PEG al gruppo amminico aromatico di gemcitabina permette di evitare tale inattivazione.

Il saggio enzimatico viene eseguito su gemcitabina libera e sui coniugati PEG-dFdC e viene monitorato tramite spettrofotometria UV-Vis e tramite analisi RP-HPLC.

Il saggio per via spettrofotometrica viene eseguito aggiungendo in una cuvetta a 960 µl di tampone TRIS 0.1M a pH 7.5, 30 µl di una soluzione acquosa di gemcitabina (1 mg/ml) o di PEG-dFdC (1 mg/ml in gemcitabina) e 10 µl della soluzione di enzima CDA (14.5 µg/ml) e monitorando la variazione di assorbanza nel tempo di 30 minuti a 248 nm, lunghezza d'onda alla quale è minima l'assorbanza di dFdU.

Per l'analisi in RP-HPLC si preparano due soluzioni costituite ciascuna da 960 µl di tampone TRIS 0.1M a pH 7.5 e 30 µl di soluzione acquosa di gemcitabina (1 mg/ml) o di PEG-dFdC (1 mg/ml in gemcitabina) e vengono poste in bagno termostato a 37°C per 10 minuti. Si aggiungono poi 10 µl di soluzione di CDA in una e 10 µl di tampone TRIS nell'altra e vengono rimesse in bagno termostato. Ogni 10 minuti si eseguono prelievi di 60 µl da ciascuna soluzione, ai quali si aggiungono 30 µl di ACN per denaturare l'enzima e vengono posti in Speed-Vac Concentrator fino a secchezza. Il residuo viene ripreso con 100 µl di acqua mQ e analizzato in RP-HPLC a 268 nm, utilizzando le condizioni riportate in precedenza al paragrafo 4.2.6.

4.4.4 Studi farmacocinetici

Gli studi farmacocinetici vengono condotti su gruppi di 5 topi femmina Balb/C del peso medio di 25 g alimentati *ad libidum*. Sugli animali anestetizzati con Zoletil[®] (tiletamina cloridrato/zolazepam cloridrato in rapporto 1:1, alla dose di 35 mg/kg di peso) e Rompum[®] (xilazina cloridrato, alla dose di 2 mg/kg di peso), vengono iniettati attraverso la vena caudale campioni di 150 µl di soluzione di gemcitabina o di PEG-dFdC in tampone fosfato NaH₂PO₄ 2.5mM a pH 7.0. In tempi successivi sugli animali anestetizzati a livello oculare con Novesina[®] (oxibuprocaina cloridrato) si eseguono dei prelievi di sangue retrobulbare (circa 100 µl) utilizzando dei capillari eparinizzati e i campioni vengono centrifugati a 12000 rpm per 1 minuto. Si prelevano 50 µl del plasma ottenuto e si aggiungono 50 µl di una soluzione di ara-U

(0.18 mg/ml in tampone fosfato 2.5mM a pH 7.0), quale standard interno, e 400 µl di ACN, per deproteinizzare la soluzione plasmatica. Si centrifuga a 12000 rpm per 3 minuti e si prelevano 450 µl del surnatante che vengono liofilizzati in Speed-Vac Concentrator. Nel caso di gemcitabina il residuo viene ripreso con 150 µl di tampone fosfato NaH_2PO_4 2.5mM a pH 7.0 e analizzato mediante RP-HPLC, utilizzando un gradiente di tampone/ACN riportato in tabella 4.1. Nel caso dei coniugati PEG-dFdC, il residuo ottenuto dopo liofilizzazione in Speed-Vac Concentrator viene ripreso con 100 µl di NaOH 1N e posto in bagno termostato a 40°C per 60 minuti, per liberare gemcitabina. La soluzione, riportata a temperatura ambiente, viene neutralizzata con 50 µl di H_3PO_4 1.4M e analizzata in RP-HPLC nelle stesse condizioni usate per gemcitabina.

La quantità di farmaco libero o di coniugati è calcolata in modo da avere una dose di gemcitabina pari a 10 mg/kg di peso, sulla base di precedenti studi condotti con araC. Vengono preparate le seguenti soluzioni in tampone fosfato NaH_2PO_4 2.5mM a pH 7.0:

- gemcitabina (1.67 mg/ml)
- mPEG₅₀₀₀-dFdC (85.47 mg/ml)
- mPEG₂₀₀₀₀-dFdC (111.1 mg/ml)*
- mPEG₂₀₀₀₀-dFdC (166.67 mg/ml)*
- folato-PEG₄₈₀₀-dFdC (46.89 mg/ml)
- folato-PEG₄₈₀₀-AD-(dFdC)₂ (26.07 mg/ml)

* in questo caso la dose di gemcitabina risulta di 5 mg/kg di peso, poiché la soluzione preparata originariamente non permette la completa solubilizzazione del coniugato.

4.4.5 Studi di attività citotossica

L'attività antiproliferativa dei coniugati PEG-dFdC viene valutata mediante test di inibizione della crescita su cellule HL-60 (leucemia promielocitica umana), HeLa (adenocarcinoma della cervice umano), HT-29 (adenocarcinoma del colon umano), MCF-7 (adenocarcinoma del seno umano) e KB-3-1 (carcinoma orofaringeo umano), opportunamente coltivate *in vitro*, e paragonata all'attività citotossica del farmaco libero, attivo in tutte le linee considerate [150].

Le cellule HL-60 vengono fatte crescere in terreno RPMI 1640 arricchito del 15% di siero bovino fetale, le cellule HeLa in terreno F-12 Ham arricchito del 10% di siero bovino fetale, mentre le cellule HT-29, MCF-7 e KB-3-1 vengono fatte crescere in terreno DMEM

arricchito del 10% di siero bovino fetale, e tutte mantenute a 37°C in incubatore a flusso continuo di aria arricchita con il 5% di CO₂ e fortemente umidificata. Nei diversi terreni di coltura vengono aggiunti 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina e 0.25 µg/ml di amfotericina B.

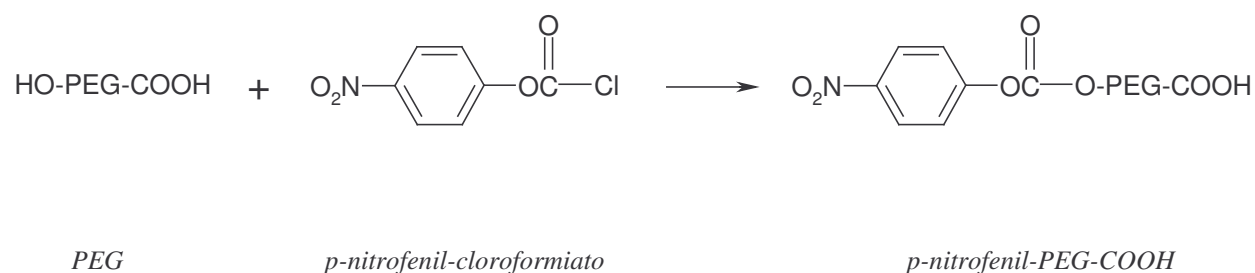
Le cellule vengono seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 4x10⁴ cellule/ml. Nel caso delle cellule KB-3-1 viene utilizzato un terreno di incubazione privo di acido folico (FDMEM). Dopo 24 ore di incubazione il terreno di coltura viene sostituito con terreno fresco in tutte le linee cellulari ad eccezione delle HL-60 (trattandosi di cellule in sospensione) e le cellule vengono trattate con concentrazioni crescenti dei composti in esame o di gemcitabina libera in soluzione acquosa. Un pozzetto privo di trattamento viene utilizzato come controllo mentre uno viene trattato con acqua, per valutare un eventuale effetto del solvente. Dopo 72 ore di incubazione, viene determinata la vitalità cellulare mediante conta al microscopio ottico utilizzando il colorante vitale Trypan-blue. I dati vengono espressi come valore di IC₅₀, ossia la concentrazione di composto alla quale si registra il 50% di morte cellulare, rispetto a colture di controllo.

4.5 Sintesi e caratterizzazione dei coniugati epirubicina-PEG-folato

4.5.1 Sintesi di Epi-PEG-COOH e Epi-PEG-DAP-folato

4.5.1.1 Attivazione del gruppo ossidrilico di HO-PEG₃₅₀₀-COOH con p-nitrofenil-cloroformiato

Il gruppo ossidrilico di HO-PEG-COOH, del peso molecolare di 3500 Da, viene derivatizzato con p-nitrofenil-cloroformiato come riportato nello schema 4.13:



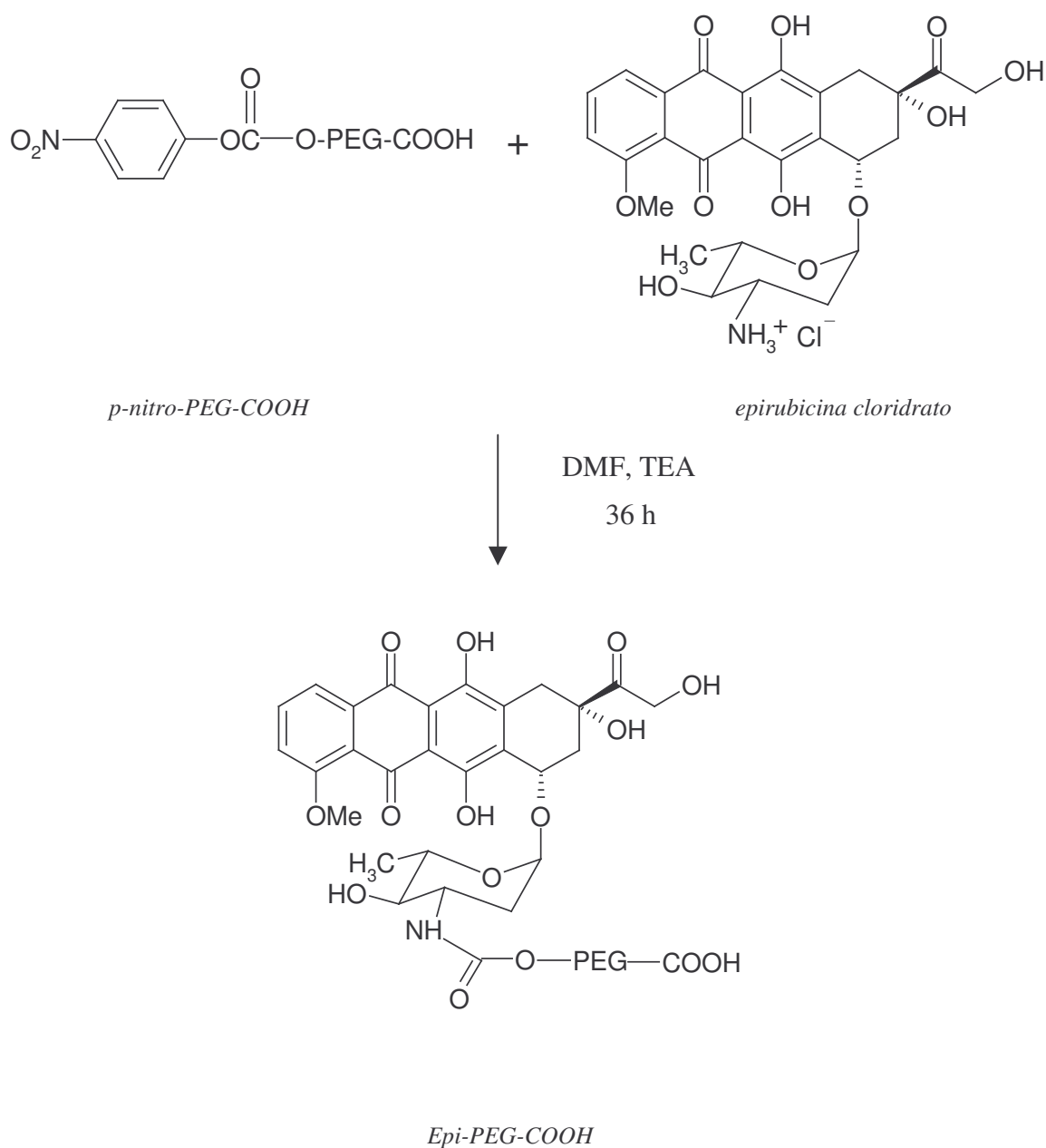
Schema 4.13: Derivatizzazione del gruppo ossidrilico di HO-PEG-COOH con p-nitrofenil-cloroformiato

2 g (0.572 mmoli, PM 3500 Da) di polimero vengono anidrificati mediante distillazione dell'acqua in presenza di circa 40 ml di toluene, posti a distillare fino all'evaporazione di circa 32-34 ml di solvente. Si aggiungono a temperatura ambiente e sotto continua agitazione 5-6 ml di CH₂Cl₂ anidro, 346.21 mg (1.716 mmoli, PM 201.57 Da) di p-nitrofenil-cloroformiato e 239 µl (1.716 mmoli, PM 101.19 Da, d=0.726 g/ml) di trietilammina in modo che il pH della reazione abbia un valore di circa 8-8.5. Si lascia reagire sotto costante agitazione tutta la notte, in seguito si filtra su gooch a porosità 4 e si fa gocciolare in circa 200 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 3 ore a -20°C si filtra su gooch a porosità 3 il precipitato di p-nitro-PEG-COOH formatosi e si pone in essiccatore.

Il grado di attivazione del polimero viene calcolato mediante reazione di idrolisi con NaOH 0.2N e successiva misura di assorbanza del p-nitrofenolo formatosi a 400 nm.

4.5.1.2 Sintesi e purificazione di Epi-PEG-COOH (1COOH)

Il derivato Epi-PEG-COOH si ottiene per formazione di un legame carbammico fra il gruppo amminico della porzione zuccherina della molecola di epirubicina e il gruppo carbonato formatosi con la derivatizzazione del gruppo ossidrilico del PEG con p-nitrofenil-cloroformiato, come riportato nello schema 4.14. Buone rese di legame si ottengono impiegando un rapporto molare polimero/farmaco di 1:1.2, come verificato in studi condotti precedentemente.



Schema 4.14: Sintesi di Epi-PEG-COOH

Si sciolgono 390 mg (0.674 mmoli, PM 580 Da) di epirubicina cloridrato in 7-8 ml di DMF anidra sotto costante agitazione e si aggiungono poi 141 μ l (1.008 mmoli, PM 101.19 Da, $d=0.726$ g/ml) di trietilammina, in modo che l'ambiente di reazione abbia un valore di pH di circa 8-8.5. Infine si aggiungono 2.054 g (0.560 mmoli, PM 3665.11) di p-nitro-PEG-COOH e si lascia reagire al buio e sotto costante agitazione per 36 ore. Si procede alla purificazione del prodotto da epirubicina in eccesso aggiungendo alla miscela di reazione, trasferita in imbuto separatore, circa 150 ml di CHCl_3 ed eseguendo estrazioni con HCl 0.1N saturo di NaCl (6 x 100 ml). La fase organica raccolta viene disidratata con Na_2SO_4 , filtrata su gooch a porosità 3 per eliminare il sale, concentrata a piccolo volume con evaporatore rotante e fatta gocciolare in circa 200 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 4 ore a -20°C il precipitato di Epi-PEG-COOH viene raccolto per filtrazione su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

La percentuale di epirubicina legata al polimero viene determinata mediante idrolisi selettiva del legame fra la porzione zuccherina e l'aglicone della molecola di epirubicina in ambiente acido e successiva analisi RP-HPLC della quantità di aglicone liberato.

A 200 μ l di una soluzione 1 mg/ml del coniugato in acqua si aggiungono 200 μ l di HCl 2N e si lascia reagire a 50°C in bagno termostato per 2 ore. Si aggiungono poi 1.2 ml di DMSO, per solubilizzare l'aglicone liberatosi e si analizza mediante tecnica RP-HPLC con colonna analitica C_{18} utilizzando come eluenti H_2O (eluente A) e ACN (eluente B), entrambi addizionati di 0.05% TFA, con il gradiente di B riportato in tabella 4.2. I cromatogrammi vengono registrati misurando l'assorbanza a 480 nm.

Tempo di corsa (minuti)	% di B nella fase mobile
0	25
10	30
15	80
20	25

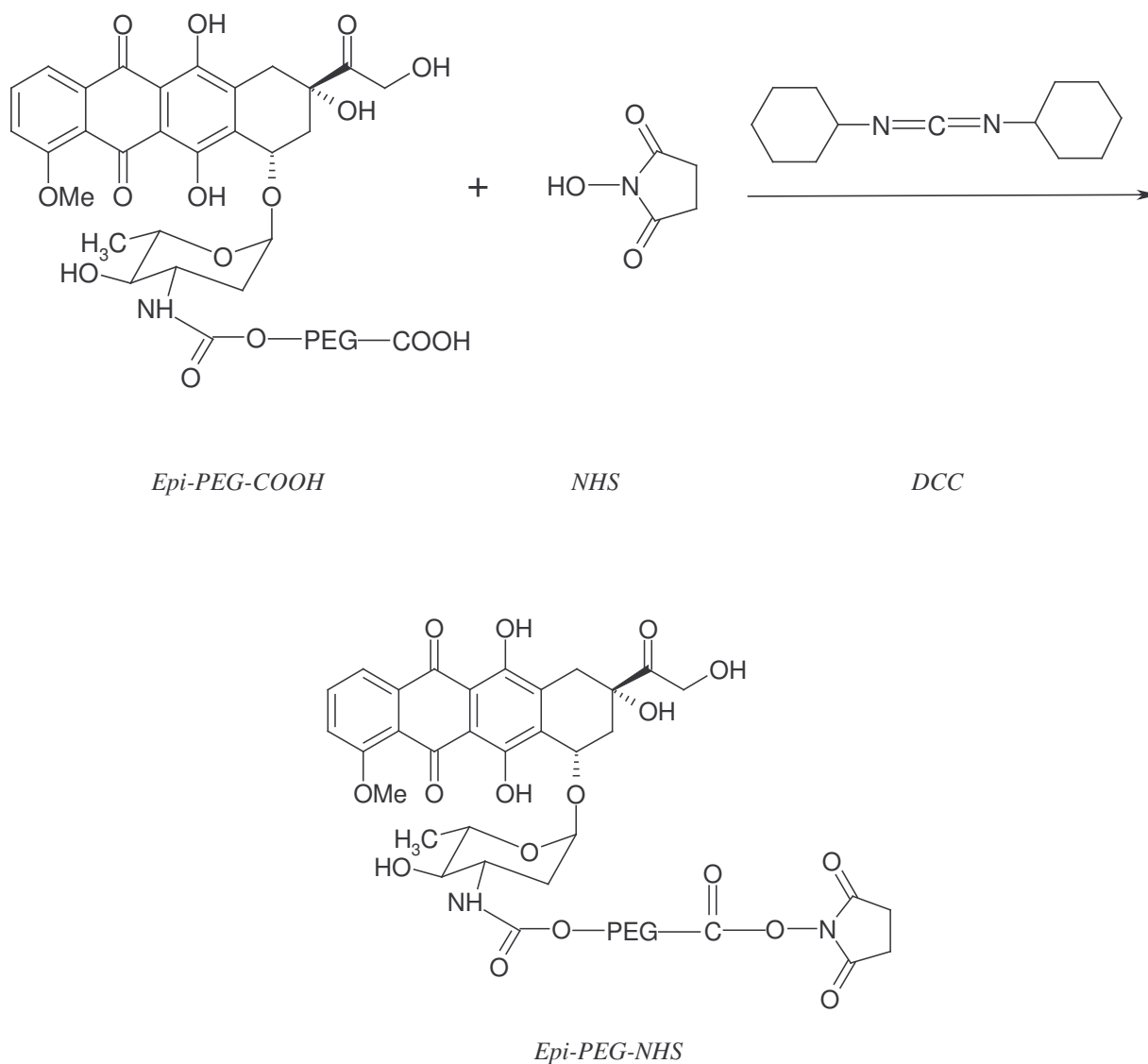
Tabella 4.2: Gradiente di eluizione in RP-HPLC

Dall'area del picco dell'aglicone liberato, mediante una retta di taratura precedentemente calcolata nelle medesime condizioni, è possibile determinare la quantità di farmaco legato al PEG. La quantità di epirubicina libera, presente come impurezza, invece, viene determinata

mediante analisi RP-HPLC di una soluzione 1 mg/ml di coniugato in acqua, nelle medesime condizioni riportate precedentemente.

4.5.1.3 Attivazione del gruppo carbossilico di Epi-PEG-COOH con DCC e NHS

Il gruppo carbossilico di Epi-PEG-COOH viene attivato ad estere attivo con N,N'-dicicloesilcarbodiimide (DCC) e N-idrossisuccinimide (NHS), come riportato nello schema 4.15:



Schema 4.15: Attivazione del gruppo carbossilico di Epi-PEG-COOH con DCC e NHS

Si sciolgono 1.9 g (0.465 mmoli, PM 4069.53 Da) di Epi-PEG-COOH in circa 8 ml di CH_2Cl_2 anidro e si aggiungono poi 81.73 mg (0.710 mmoli, PM 115.09) di NHS e 289 mg (1.401 mmoli, PM 206.33) di DCC. Si lascia reagire al buio e sotto costante agitazione per 3 ore, si filtra su gooch a porosità 3 per eliminare la dicioesilurea formatasi e si fa gocciolare in circa 200 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 4 ore a -20°C il precipitato di Epi-PEG-NHS viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

Il grado di attivazione viene calcolato con saggio colorimetrico di Snyder-Sobocinski, come riportato al paragrafo 4.2.3 e 4.5.1.4.

4.5.1.4 Determinazione del grado di attivazione di Epi-PEG-NHS

La percentuale del grado di attivazione del polimero viene determinata mediante saggio colorimetrico di Snyder-Sobocinski con acido 2,4,6-trinitro-benzensolfonico (TNBS), come riportato anche al paragrafo 4.2.3: il polimero viene fatto reagire con una quantità equimolare, rispetto ai gruppi carbossilici, di dipeptide glicil-glicina (Gly-Gly) e i gruppi amminici residui del dipeptide vengono poi titolati con TNBS dando trinitro-fenil-derivati, di colore giallo, che presentano due picchi di assorbimento, a 340 nm e a 420 nm.

A 1 ml di una soluzione di glicil-glicina (0.002157 mmoli/ml, PM 132.12 Da) in tampone borato 0.1M a pH 8 vengono aggiunti 9 mg (0.002157 mmoli, PM 4166.6 Da) di Epi-PEG-NHS, in modo che il rapporto stechiometrico fra i gruppi carbossilici del PEG e i gruppi amminici del dipeptide sia di 1:1, e si lascia reagire per 30 minuti. Per evitare interferenze nella misura di assorbanza date dalla presenza di epirubicina, si prepara anche una soluzione equimolare di polimero Epi-PEG-NHS in tampone borato 0.1M a pH 8.

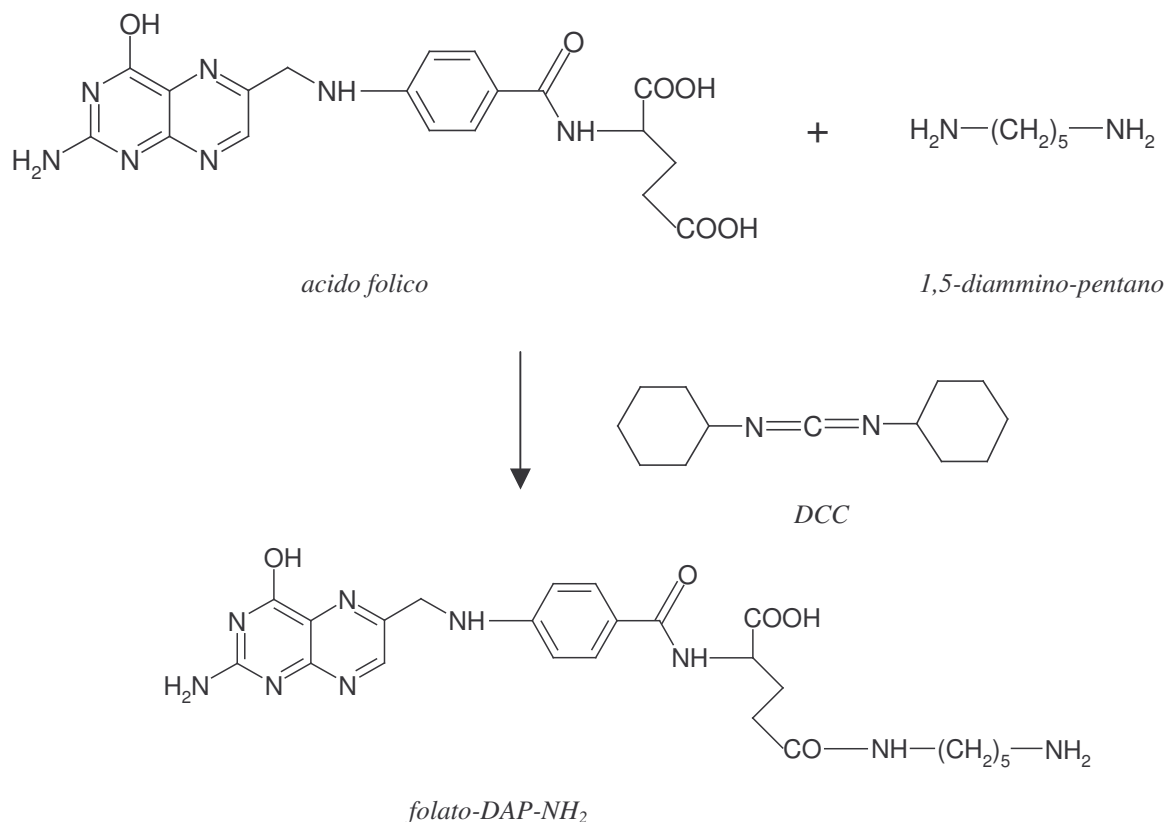
Si esegue il saggio preparando quattro soluzioni:

- il bianco, dato da 975 μl di tampone borato 0.1M a pH 9.3 e 25 μl di soluzione di TNBS in DMF (7.34 mg/ml);
- il riferimento, dato da 950 μl di tampone borato, 25 μl di soluzione di TNBS in DMF e 25 μl di soluzione di Gly-Gly (0.002157 mmoli/ml);
- il campione, dato da 950 μl di tampone borato, 25 μl di soluzione di TNBS in DMF e 25 μl di miscela di reazione polimero+Gly-Gly.;
- la soluzione per valutare l'interferenza, data da 975 μl di tampone borato, 25 μl di soluzione di polimero in tampone.

Dopo 30 minuti si misura l'assorbanza a 420 nm.

4.5.1.5 Sintesi di folato-DAP-NH₂

La reazione fra il gruppo carbossilico in γ dell'acido folico e il gruppo amminico di 1,5-diammino-pentano (DAP) porta alla formazione del derivato folato-DAP-NH₂ [151], come riportato nello schema di reazione 4.16:



Schema 4.16: Reazione fra acido folico e 1,5-diamminopentano

Si sciolgono 500 mg (1.133 mmoli, PM 441.41 Da) di acido folico in 20 ml di DMSO anidro in bagno riscaldato sotto costante agitazione. Dopo completa solubilizzazione si aggiungono a temperatura ambiente 1.325 ml (11.33 mmoli, PM 102.18 Da, d=0.873 g/ml) di 1,5-diamminopentano (DAP) e 580 mg (2.832 mmoli, PM 206.33 Da) di DCC e si lascia reagire per 4 ore. Si fa gocciolare poi in circa 300 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione e dopo 5-6 ore a -20°C si filtra su gooch a porosità 4, lavando bene il precipitato con etere freddo per eliminare completamente il DMSO e si pone in essiccatore.

La quantità di acido folico legato alla diammina si calcola mediante saggio colorimetrico con TNBS, come riportato al paragrafo 4.5.1.6.

4.5.1.6 Determinazione della quantità di acido folico legato

Per determinare la quantità di acido folico legato alla diammina si procede alla quantificazione dei gruppi amminici liberi mediante saggio colorimetrico con TNBS.

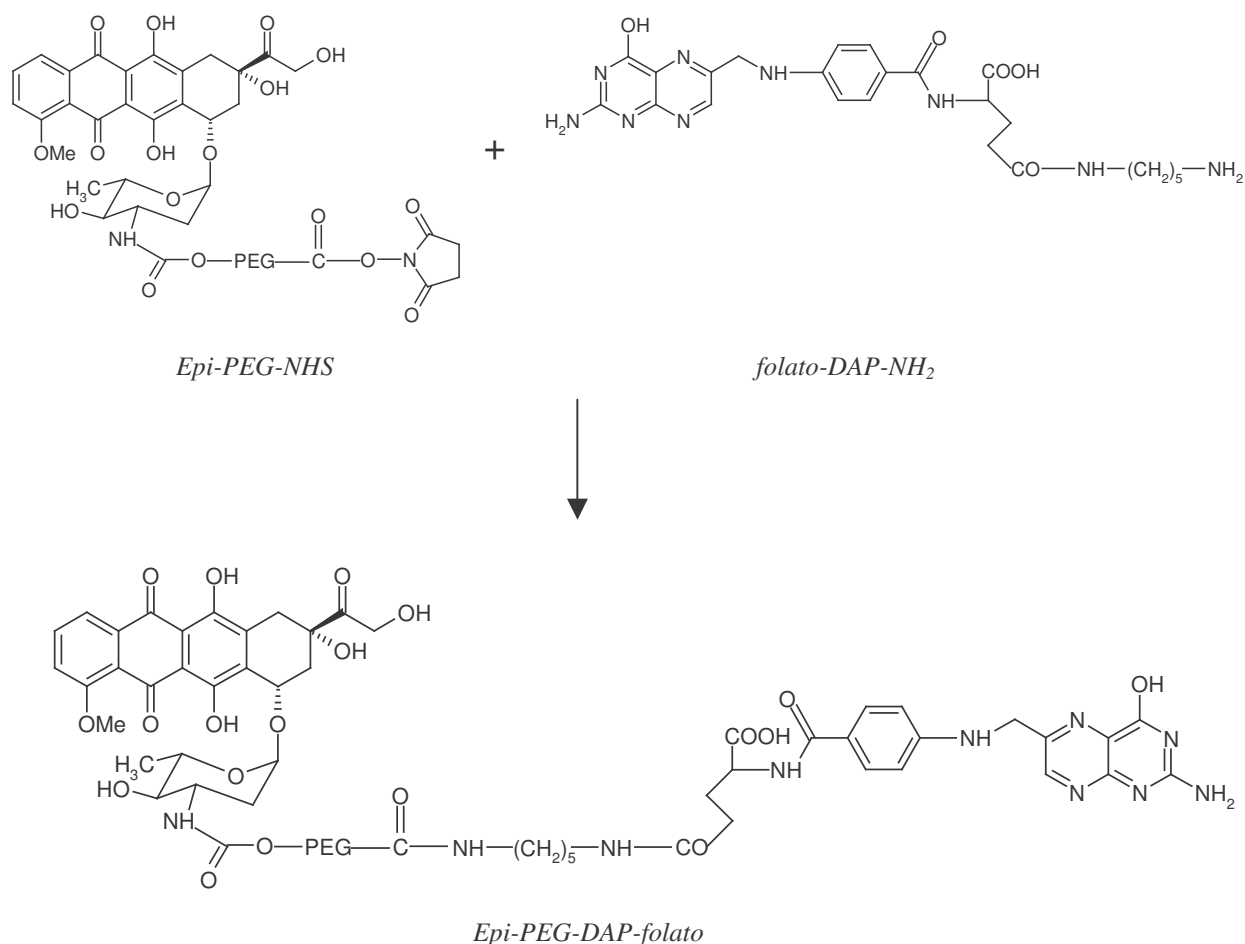
Si prepara una soluzione a concentrazione 0.002157 mmoli/ml di folato-DAP-NH₂ sciogliendo 4.5 mg di prodotto in 4 ml di una miscela al 50% di DMSO e tampone borato 0.1M a pH 8.0. Si prepara inoltre una soluzione di DAP in DMSO/tampone borato 50/50, come riferimento, in modo che i gruppi amminici siano equimolari rispetto alla soluzione di folato-DAP. Si procede poi al saggio con TNBS preparando le seguenti soluzioni:

- il bianco, dato da 962.5 µl di tampone borato 0.1M a pH 9.3, 12.5 µl di DMSO e 25 µl di soluzione di TNBS in DMF (7.34 mg/ml);
- il campione, dato da 950 µl di tampone borato, 25 µl di soluzione di TNBS in DMF e 25 µl di soluzione di folato-DAP-NH₂ in DMSO/tampone borato pH 8.0 (50/50);
- il riferimento, dato da 950 µl di tampone borato, 25 µl di soluzione di TNBS in DMF e 25 µl di soluzione di NH₂-DAP-NH₂ in DMSO/tampone borato a pH 8.0 (50/50);
- una soluzione per l'interferenza dell'acido folico, data da 975 µl di tampone borato e 25 µl di soluzione di folato-DAP-NH₂ in DMSO/tampone borato a pH 8.0 (50/50).

Dopo 30 minuti di reazione si misura l'assorbanza delle soluzioni a 420 nm.

4.5.1.7 Sintesi e purificazione di Epi-PEG-DAP-folato (1FOL)

Il prodotto Epi-PEG-DAP-folato si ottiene per formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossilico del PEG, attivato ad estere succinimmidico, e il gruppo amminico del derivato folato-DAP-NH₂, come riportato nello schema 4.17, con un rapporto molare fra i gruppi carbossilici attivati del PEG e i gruppi amminici liberi di folato-DAP-NH₂ di 1:1.5.



Schema 4.17: Sintesi di Epi-PEG-DAP-folato

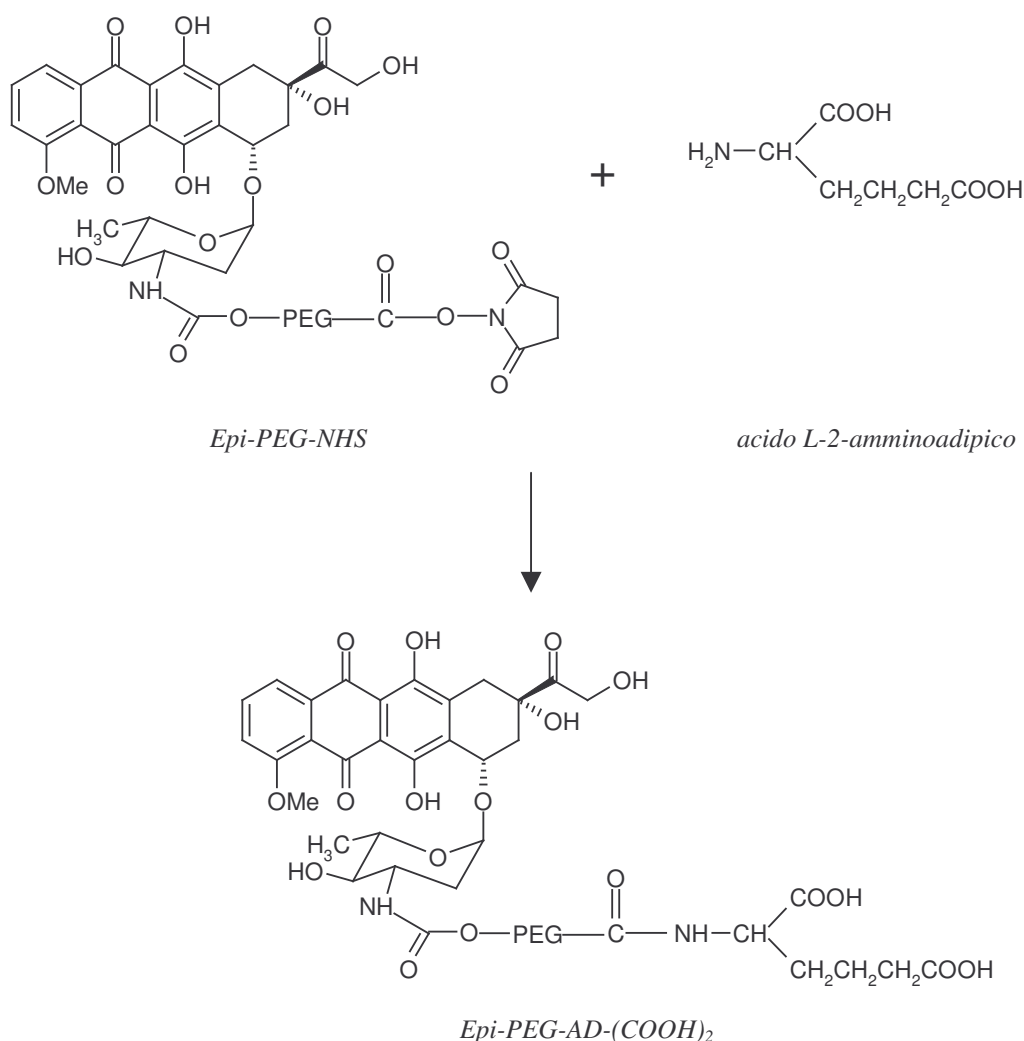
Si sciolgono 100 mg (0.024 mmoli, PM 4166.6 Da) di Epi-PEG-NHS in circa 5 ml di DMF anidra. A parte si solubilizzano 11.6 mg (0.022 mmoli, PM 525.6 Da) di folato-DAP-NH₂ in 1 ml di DMSO anidro in bagno riscaldato. A solubilizzazione completata si aggiunge goccia a goccia sotto costante agitazione la soluzione di folato-DAP-NH₂ a temperatura ambiente alla soluzione di PEG e si lascia reagire tutta la notte al buio a temperatura ambiente e sotto costante agitazione.

Si aggiungono circa 8 ml di acqua, circa 6 ml di HCl 0.1N e 2-3 ml di BRINE (soluzione satura di NaCl) e si purifica il prodotto ottenuto mediante estrazioni con CHCl₃ (4 x 80 ml). La fase organica raccolta viene disidratata con Na₂SO₄, filtrata su gooch a porosità 3 per eliminare il sale, concentrata a piccolo volume mediante evaporatore rotante e fatta gocciolare in circa 80 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 3 ore a -20°C il precipitato di Epi-PEG-DAP-folato viene recuperato mediante centrifugazione a 2500 rpm per 10 minuti a 10°C e posto in essiccatore.

4.5.2 Sintesi di Epi-PEG-AD-(COOH)₂ e Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂

4.5.2.1 Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-(COOH)₂ (2COOH)

Il prodotto Epi-PEG-AD-(COOH)₂ si ottiene per formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossilico attivato del derivato Epi-PEG-COOH e il gruppo amminico dell'acido L-2-amminoadipico (AD), come riportato nello schema 4.18, impiegando un rapporto molare polimero/amminoacido di 1:3.



Schema 4.18: Sintesi di Epi-PEG-AD-(COOH)₂

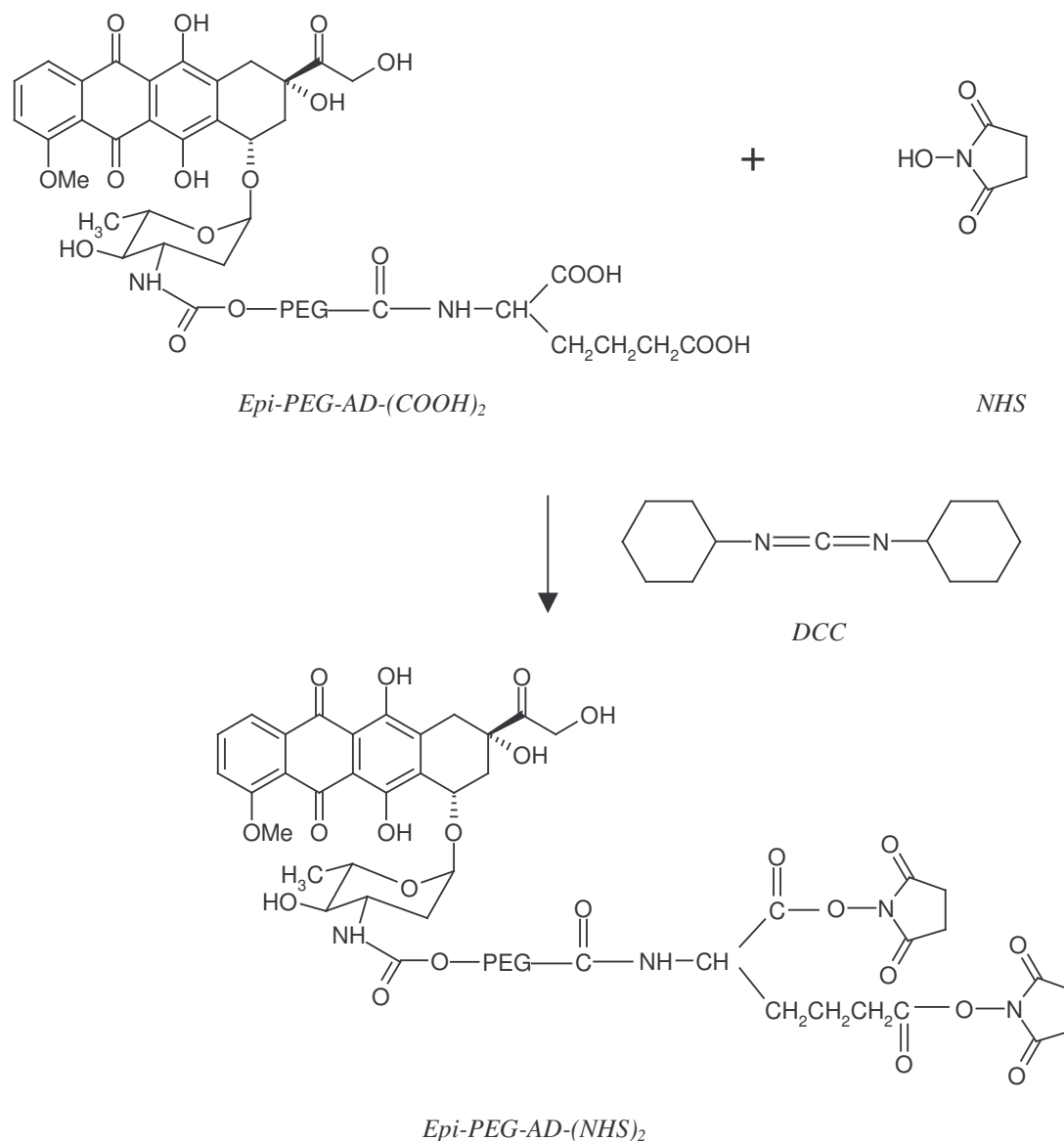
Si sciolgono 104 mg (0.648 mmoli, PM 161.16 Da) di acido L-2-amminoadipico in circa 10 ml di tampone borato 0.1M a pH 8.0, si aggiungono sotto costante agitazione 900 mg (0.216 mmoli, PM 4166.6 Da) di Epi-PEG-NHS e si lascia reagire al buio per mezz'ora, procurando di mantenere il pH della reazione a un valore di 8.0-8.5. Si aggiunge poi HCl 0.2N in modo che il

valore di pH scenda a circa 4.0-4.5 e si procede alla purificazione del prodotto ottenuto mediante estrazioni con CHCl_3 (2 x 80 ml), aggiungendo anche qualche ml di BRINE per facilitare la separazione di fase. La fase organica raccolta viene disidratata con Na_2SO_4 , filtrata su gooch a porosità 3 per eliminare il sale, concentrata a piccolo volume con evaporatore rotante e fatta gocciolare in circa 300 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 3 ore a -20°C , il precipitato di Epi-PEG-AD-(COOH)₂ formatosi viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

La quantità di amminoacido legata viene determinata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 .

4.5.2.2 Attivazione dei gruppi carbossilici di Epi-PEG-AD-(COOH)₂ con DCC e NHS

I gruppi carbossilici del derivato vengono attivati ad estere succinimmidico mediante reazione con DCC e NHS, come riportato nello schema 4.19:



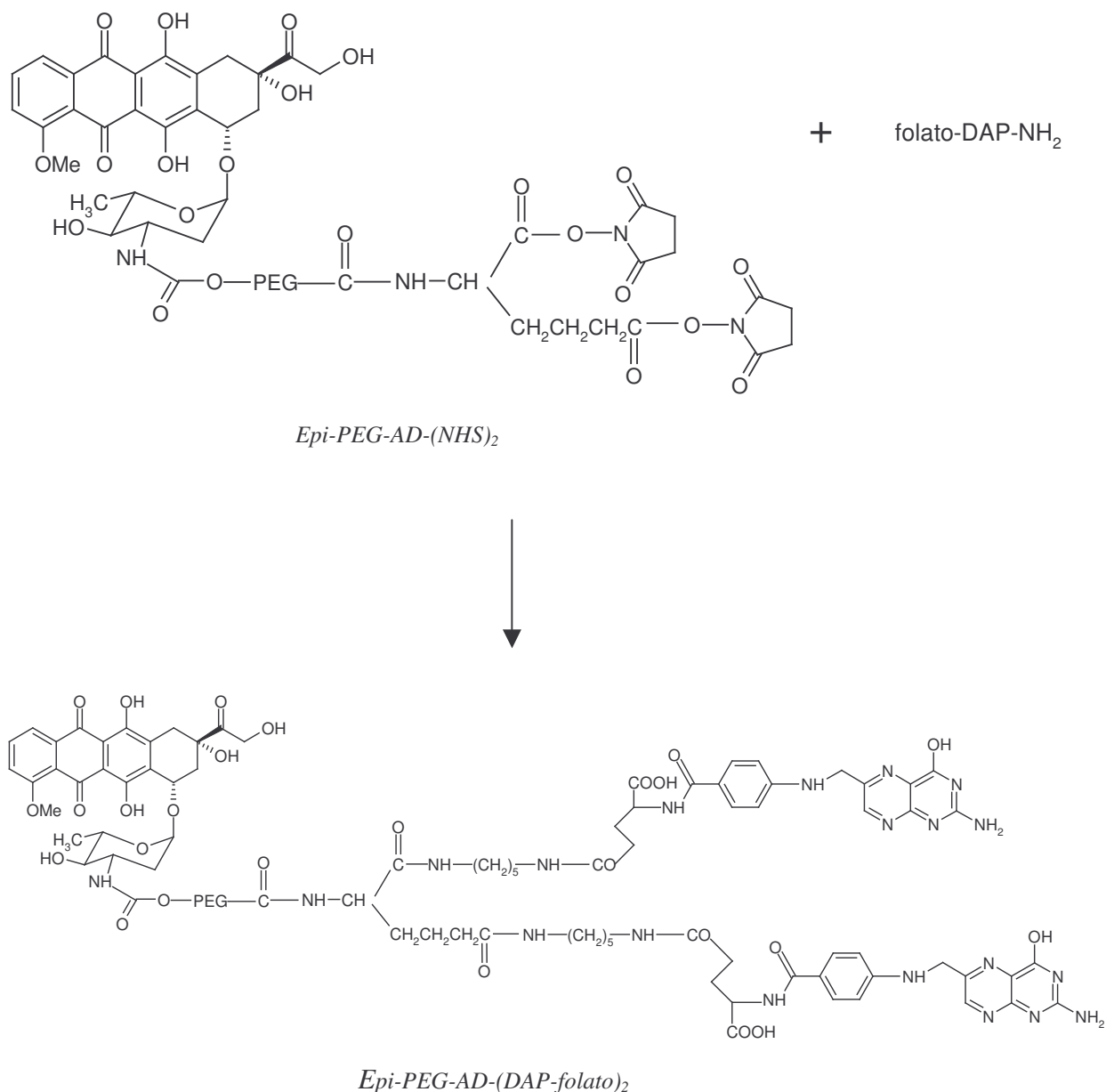
Schema 4.19: Attivazione dei gruppi carbossilici di $\text{Epi-PEG-AD-(COOH)}_2$ con DCC e NHS

Si sciolgono 700 mg (0.166 mmoli, PM 4212.67 Da) di $\text{Epi-PEG-AD-(COOH)}_2$ in circa 10 ml di CH_2Cl_2 anidro sotto costante agitazione. Si aggiungono poi 76.4 mg (0.664 mmoli, PM 115.09 Da) di NHS e 205.5 mg (0.996 mmoli, PM 206.33 Da) di DCC e si lascia reagire al buio per 2 ore. Si filtra poi su gooch a porosità 3 per eliminare la dicicloesilurea formatasi e si fa gocciolare in circa 250 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 4 ore a -20°C il precipitato di $\text{Epi-PEG-AD-(NHS)}_2$ formatosi viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

Il grado di attivazione viene determinato mediante saggio colorimetrico con TNBS come riportato al paragrafo 4.5.1.4.

4.5.2.3 Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂ (2FOL)

Il coniugato Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂ si ottiene per reazione fra il derivato folato-DAP-NH₂ e il derivato attivato Epi-PEG-AD-(NHS)₂, come riportato nello schema 4.20. Anche in questo caso il rapporto molare fra i gruppi carbossilici attivati del derivato polimerico e i gruppi amminici liberi del derivato folato-DAP-NH₂ è di 1:1.5.



Schema 4.20: Sintesi di Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂

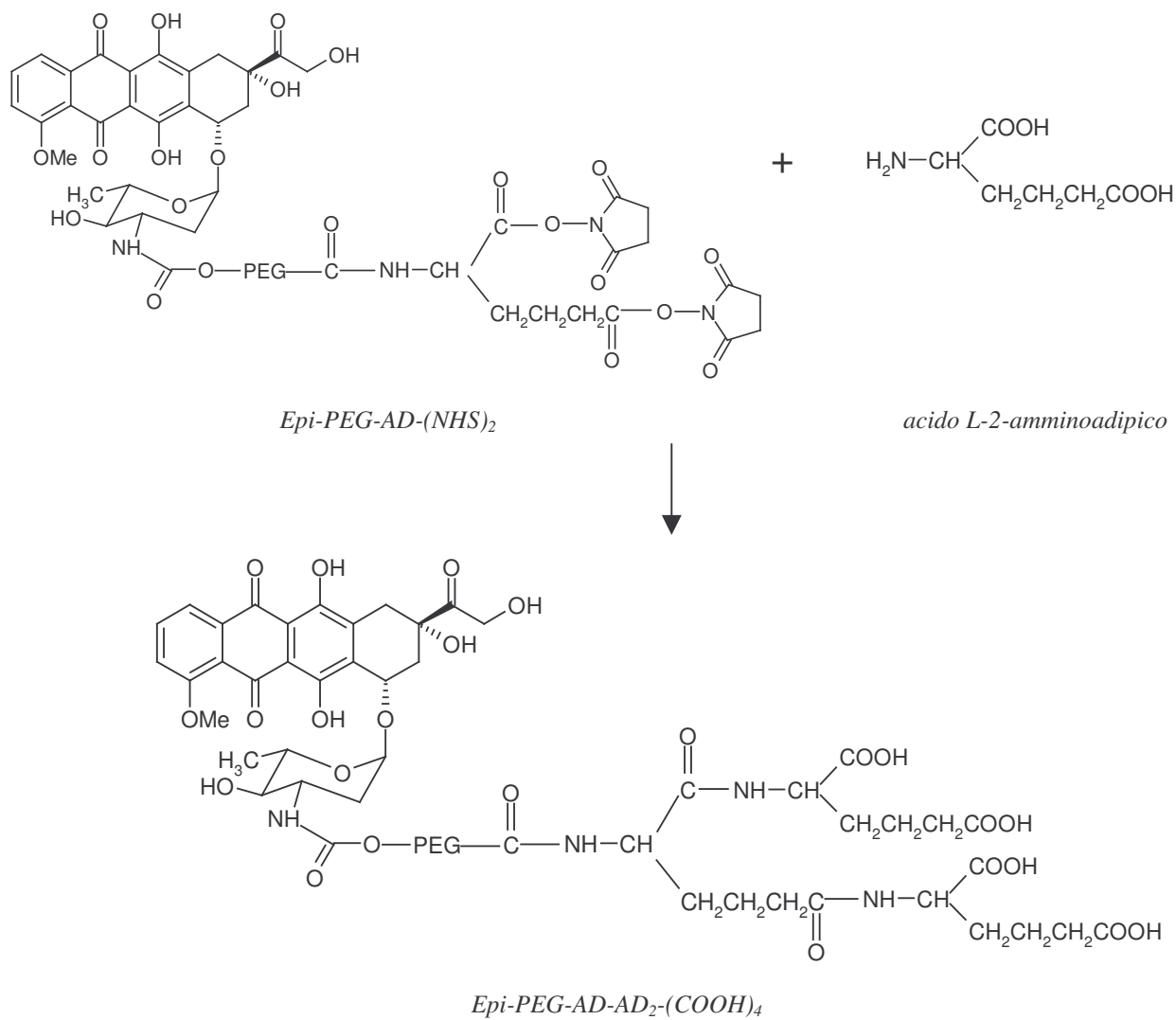
Si sciolgono 100 mg (0.023 mmoli, PM 4406.82 Da) di Epi-PEG-AD-(NHS)₂ in circa 5 ml di DMF anidra sotto costante agitazione. A parte si solubilizzano 11 mg (0.021 mmoli, PM

525.6 Da) di folato-DAP-NH₂ in 1 ml di DMSO anidro in bagno riscaldato. A solubilizzazione completata alla soluzione di PEG si aggiunge goccia a goccia la soluzione di folato-DAP-NH₂, a temperatura ambiente e si lascia reagire tutta la notte al buio e sotto costante agitazione. Si aggiungono poi circa 10 ml di acqua, 6-7 ml di HCl 0.1N e 2-3 ml di BRINE e si purifica il prodotto dall'eccesso di folato mediante estrazioni con CHCl₃ (4 x 80 ml). La fase organica raccolta viene disidratata con Na₂SO₄, filtrata su gooch a porosità 3 per eliminare il sale, concentrata a piccolo volume con evaporatore rotante e fatta gocciolare in circa 80 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 4 ore a -20°C il precipitato di Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂ viene raccolto per centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti a 10°C e posto in essiccatore.

4.5.3 Sintesi di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄ e di Epi-PEG-AD-AD₂-(DAP-folato)₄

4.5.3.1 Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄ (4COOH)

Il derivato Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄ si ottiene per reazione del derivato 2COOH, attivato ad estere succinimmidico, con acido L-2-amminoadipico, come riportato nello schema 4.21, impiegando un rapporto molare polimero/amminoacido di 1:6 (1:3 rispetto ai gruppi COOH).



Schema 4.21: Sintesi di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄

Si sciolgono 98.6 mg (0.612 mmoli, PM 161.16 Da) di acido L-2-amminoadipico in circa 10 ml di tampone borato 0.1M a pH 8.0 sotto costante agitazione, si aggiungono poi 450 mg (0.102 mmoli, PM 4406.82 Da) di Epi-PEG-AD-(NHS)₂ e si lascia reagire al buio per 30 minuti, mantenendo il pH della reazione a un valore di circa 8.0-8.5. Dopodiché si abbassa il pH della reazione a circa 4.0 con HCl 2N, si aggiungono 3-4 ml di BRINE e 3-4 ml di DMF e si purifica il prodotto dall'eccesso di amminoacido mediante estrazioni con CHCl₃ (3 x 80 ml). La fase organica raccolta viene disidratata con Na₂SO₄, filtrata su gooch a porosità 3 per eliminare il sale, concentrata a piccolo volume in evaporatore rotante e fatta gocciolare in circa 200 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 4 ore a -20°C il precipitato di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄ viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

La quantità di amminoacido legato viene determinata mediante analisi ¹H-NMR in DMSO-d₆.

4.5.3.2 Attivazione dei gruppi carbossilici di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄ con DCC e NHS

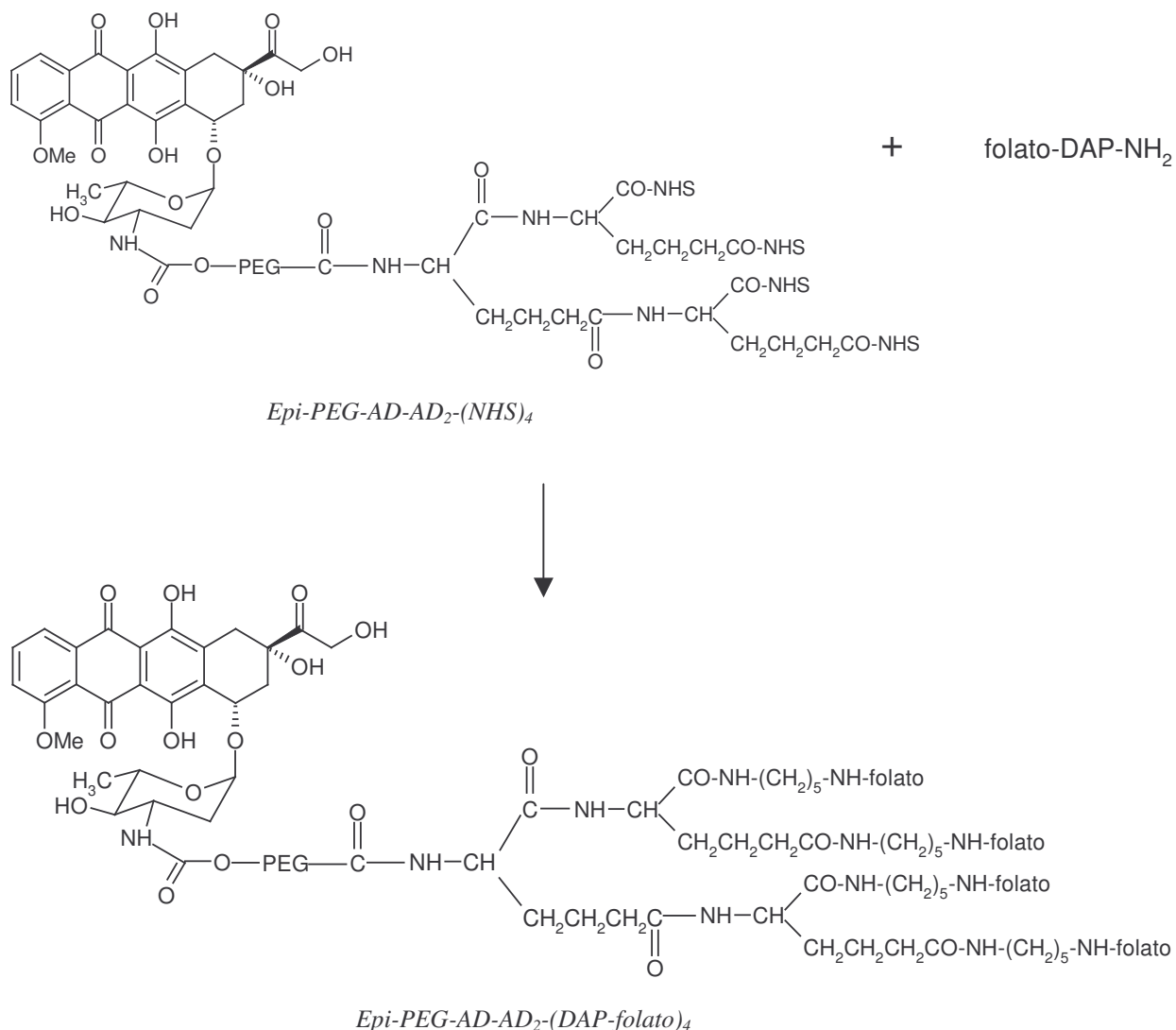
I 4 gruppi carbossilici del derivato 4COOH vengono attivati ad estere succinimmidico con DCC e NHS, con reazione analoga a quella riportata per il derivato 2COOH (schema 4.19).

Si sciolgono 330 mg (0.073 mmoli, PM 4498.96 Da) di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄ in circa 10 ml di CH₂Cl₂ anidro sotto costante agitazione e si aggiungono poi 67.2 mg (0.584 mmoli, PM 115.09 Da) di NHS e 180.7 mg (0.876 mmoli, PM 206.33 Da) di DCC. Si lascia reagire per 2 ore al buio e sotto agitazione, poi si filtra su gooch a porosità 3 per eliminare la dicicloesilurea formatasi e si fa gocciolare in circa 200 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 3 ore a -20°C il precipitato di Epi-PEG-AD-AD₂-(NHS)₄ formatosi viene filtrato su gooch a porosità 4 e posto in essiccatore.

Il grado di attivazione viene determinato mediante saggio colorimetrico con TNBS, come riportato al paragrafo 4.5.1.4.

4.5.3.3 Sintesi e purificazione di Epi-PEG-AD-AD₂-(DAP-folato)₄ (4FOL)

Il derivato Epi-PEG-AD-AD₂-(DAP-folato)₄ si ottiene per reazione del derivato 4COOH, attivato ad estere succinimmidico, con il derivato folato-DAP-NH₂, come riportato nello schema 4.22, con rapporto molare fra i gruppi carbossilici attivati del derivato polimerico e i gruppi amminici del derivato folato-DAP-NH₂ di 1:1.5.



Schema 4.22: Sintesi di Epi-PEG-AD-AD₂-(DAP-folato)₄

Si sciolgono 100 mg (0.020 mmoli, PM 4887.25 Da) di Epi-PEG-AD-AD₂-(NHS)₄ in circa 6 ml di DMF anidra sotto costante agitazione. A parte si solubilizzano 10.25 mg (0.0195 mmoli, PM 525.6 Da) di folato-DAP-NH₂ in 1 ml di DMSO anidro in bagno riscaldato. A solubilizzazione completata, alla soluzione di PEG si aggiunge goccia a goccia la soluzione di folato a temperatura ambiente e si lascia reagire tutta la notte al buio e sotto costante agitazione. Si aggiungono circa 6 ml di acqua, 6-7 ml di HCl 0.1N e 2-3 ml di BRINE e si purifica il prodotto dall'eccesso di acido folico mediante estrazioni con CHCl₃ (4 x 80 ml). La fase organica raccolta viene disidratata con Na₂SO₄, filtrata su gooch a porosità 3 per eliminare il sale, concentrata a piccolo volume con evaporatore rotante e fatta gocciolare in circa 80 ml di etere etilico freddo sotto forte agitazione. Dopo 4 ore a -20°C il precipitato di Epi-PEG-AD-

AD₂-(DAP-folato)₄ formatosi viene recuperato mediante filtrazione a 3000 rpm per 10 minuti a 10°C e posto in essiccatore.

4.5.4 Caratterizzazione dei coniugati PEG-epirubicina

Tutti i coniugati sintetizzati, nonché gli intermedi di reazione, vengono caratterizzati mediante spettroscopia ¹H-NMR, sciogliendo i campioni in DMSO deuterato, e mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC), utilizzando una colonna analitica C₁₈ ed eluendo con acqua (eluente A) e ACN (eluente B) entrambi addizionati di 0.05% di TFA. Per la caratterizzazione del derivato folato-DAP-NH₂ è utilizzato un gradiente di B diverso rispetto a quello utilizzato per la caratterizzazione dei coniugati, come riportato in tabella 4.3. I cromatogrammi vengono registrati a 480 nm per i coniugati e a 420 nm per il derivato folato-DAP-NH₂.

	Coniugati PEG-epirubicina		Derivato folato-DAP-NH ₂	
Eluente A	H ₂ O + 0.05% TFA		H ₂ O + 0.05% TFA	
Eluente B	ACN + 0.05% TFA		ACN + 0.05% TFA	
λ (nm)	480nm		420nm	
Gradiente di eluizione	Tempo (minuti)	% di B nella fase mobile	Tempo (minuti)	% di B nella fase mobile
	0	25	0	5
	10	30	30	60
	15	80	35	90
	20	25	40	5

Tabella 4.3: Condizioni di eluizione in RP-HPLC dei coniugati e del derivato intermedio folato-DAP-NH₂

4.6 Studi eseguiti sui coniugati PEG-epirubicina

Tutti gli studi biologici eseguiti sui coniugati PEG-epirubicina vengono condotti utilizzando tre diverse linee cellulari umane: cellule A549, di carcinoma epiteliale del polmone, negative per quanto riguarda l'espressione dei recettori per l'acido folico (FR-) [152,153], cellule HeLa, di carcinoma epiteliale della cervice, positive per i recettori FR (FR+) [152], e cellule KB-3-1, di carcinoma orofaringeo, in cui è presente una sovraespressione dei recettori FR (FR++) [153].

4.6.1 Curve di accrescimento

Si studiano le curve di accrescimento delle tre linee cellulari, per determinare la giusta concentrazione alla quale devono poi essere seminate per eseguire i tests e i tempi di incubazione per i diversi esperimenti.

Le cellule vengono fatte crescere in terreno FDMEM, carente di acido folico, arricchito del 10% di siero bovino fetale (FBS) e mantenute a 37°C in incubatore a flusso continuo di aria arricchita con il 5% di CO₂ e fortemente umidificata.

Le cellule vengono seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 1.0x10⁴, 1.5x10⁴ e 2.0x10⁴ cellule/ml per le A549, e 1.5x10⁴, 2x10⁴ e 2.5x10⁴ cellule/ml per le HeLa e le KB-3-1 e contate ad intervalli di 24 ore mediante saggio con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro): in ogni pozzetto vengono aggiunti 20 µl di una soluzione 5 mg/ml in acqua di MTT e dopo 4 ore a 37°C viene rimosso il terreno di coltura e i cristalli di tetrazolio formati disciolti con 100 µl di DMSO. L'assorbanza di ogni pozzetto viene misurata mediante lettore di piastre Victor² Wallac a 570nm. I dati vengono espressi come variazione di assorbanza nel tempo.

4.6.2 Valutazione dei recettori dell'acido folico (FR) mediante saggio di immunofluorescenza

La determinazione della presenza dei recettori per l'acido folico nelle diverse linee cellulari considerate viene eseguita mediante saggio di immunofluorescenza [154].

Le cellule vengono fatte crescere in terreno FDMEM, carente di acido folico, arricchito del 10% di siero bovino fetale (FBS) e mantenute a 37°C in incubatore a flusso continuo di aria arricchita con il 5% di CO₂ e fortemente umidificata.

Le cellule vengono seminate in piastre da 48 pozzetti, in cui è stato prima adagiato un vetrino sterilizzato, alla densità di 5×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore, le cellule vengono lavate 2 volte con PBS a 37°C e fissate mediante incubazione con 200 µl di paraformaldeide al 2% in PBS per 30 minuti a 37°C. Dopo altri 3 lavaggi con PBS per eliminare la paraformaldeide, le cellule vengono incubate con 200 µl di tampone di blocco contenente il 10% di siero bovino neonatale (NBS) in PBS per 1 ora a 37°C. Il tampone viene rimosso e le cellule vengono poste ad incubare con 60 µl dell'anticorpo monoclonale primario anti-FR Mov 18, alla concentrazione di 2 µg/ml in tampone di blocco, tutta la notte a 4°C. Le cellule vengono lavate 3 volte con PBS per eliminare l'eccesso di anticorpo e poste ad incubare con 60 µl dell'anticorpo secondario coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) alla diluizione di 1:25 (in tampone di blocco) per 1 ora al buio a temperatura ambiente. I vetrini, rimossi e montati su vetrini coprioggetto, utilizzando un mezzo di montaggio contenente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato), vengono analizzati al microscopio confocale.

4.6.3 Studi di attività citotossica

L'attività antiproliferativa dei coniugati PEG-epirubicina viene valutata mediante test di inibizione della crescita sulle tre linee cellulari citate, opportunamente coltivate *in vitro*, e paragonata all'attività citotossica del farmaco libero [152,153].

Le cellule vengono fatte crescere in terreno FDMEM, carente di acido folico, arricchito del 10% di siero bovino fetale (FBS) e mantenute a 37°C in incubatore a flusso continuo di aria arricchita con il 5% di CO₂ e fortemente umidificata.

Le cellule vengono seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 2×10^4 cellule/ml per A549 e di 2.5×10^4 per HeLa e KB-3-1. Dopo 24 ore di incubazione il terreno di coltura viene rimosso e nel caso dei coniugati le cellule vengono trattate con concentrazioni crescenti dei composti sciolti nel terreno stesso. Nel caso invece di epirubicina libera, il terreno viene sostituito con terreno fresco e le cellule vengono trattate con concentrazioni crescenti di epirubicina sciolta in DMSO. Si esegue anche un controllo con solo DMSO per valutare gli effetti del solvente. Alcuni pozzetti vengono mantenuti senza trattamento e costituiscono il riferimento del 100% di vitalità. Dopo 72 ore di incubazione, viene determinata la vitalità

cellulare mediante saggio con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro): in ogni pozzetto vengono aggiunti 20 μ l di una soluzione 5 mg/ml in acqua di MTT e dopo 4 ore a 37°C viene rimosso il terreno di coltura e i cristalli di tetrazolio formati vengono dissolti con 100 μ l di DMSO. L'assorbanza di ogni pozzetto viene misurata mediante lettore di piastre Victor² Wallac a 570nm.

I dati vengono espressi come valore di IC₅₀, ossia la concentrazione di composto alla quale si registra il 50% di morte cellulare, rispetto al controllo.

4.6.4 Studi di *uptake* cellulare mediante citofluorimetria di flusso

Per valutare il grado e la velocità di internalizzazione dei diversi coniugati nelle tre linee cellulari vengono condotti studi di citofluorimetria di flusso, sfruttando le caratteristiche di fluorescenza della molecola di epirubicina. Si utilizza uno strumento Cytomics FC500 (Beckman Coulter Inc.) munito di un laser singolo ad argon con lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm. I dati vengono acquisiti in 1024 canali coinvolgendo 15000 eventi per campione con un filtro di emissione FL3 a 530 nm e vengono analizzati con il software Beckman Coulter CXP. Gli esperimenti vengono condotti a 37°C, per studiare l'*uptake* dei coniugati, e a 4°C per valutare le interazioni dei coniugati con la membrana cellulare.

Le cellule vengono seminate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 3.5×10^5 cellule/ml e lasciate in incubazione per 48 ore. Si trattano poi aggiungendo ad ogni pozzetto 10 μ l della soluzione dei coniugati sciolti in PBS, alla concentrazione di 0.01 mg/ml in epirubicina, per tempi diversi di 0, 5, 15 e 30 minuti, 1, 2 e 5 ore. Ogni trattamento viene eseguito in triplo. Negli esperimenti a 4°C le piastre vengono poste 30 minuti prima del trattamento alla temperatura di 4°C e mantenute in queste condizioni per tutta la durata dell'esperimento. Alla fine del periodo di incubazione le piastre vengono messe in ghiaccio, per bloccare il processo di internalizzazione, viene rimosso il terreno di coltura e si eseguono 2 lavaggi con PBS freddo (circa 3 ml). Viene poi aggiunto 1 ml di PBS freddo, vengono rimosse le cellule con un apposito strumento che permette di raschiarle dalla superficie del pozzetto, vengono trasferite in tubo da citofluorimetria e analizzate al citofluorimetro. In tutti gli esperimenti vengono anche analizzate sospensioni di cellule non trattate come controllo, per valutare l'eventuale presenza di autofluorescenza.

I dati vengono espressi in termini di fluorescenza associata alle cellule, valutata come media geometrica della popolazione cellulare, nel tempo.

4.6.5 Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale

Il destino intracellulare dei diversi coniugati è valutato mediante microscopia confocale, sfruttando ancora le caratteristiche di fluorescenza della molecola di epirubicina. Viene utilizzato un microscopio confocale Leica munito di laser ad argon (548, 476, 488, 496 e 514 nm) e di un diodo blue (405 nm). Il microscopio è provvisto di un divisore acustico di raggio ottico e anche di un obiettivo ad immersione in olio l-blu 63 e di un sistema di supporto TCS SP2, che permette l'acquisizione di immagini in cellule vive, non fissate. Le immagini sono acquisite su una scala di grigio 8-bit e processate con un software LCS (versione 2.5.1347a).

Le cellule vengono seminate su piastre Petri da 10 cm², in cui è prima adagiato un vetrino sterilizzato, alla densità di 3.5×10^5 cellule/ml e lasciate incubare per 24 ore. Vengono poi trattate aggiungendo 10 µl della soluzione dei coniugati sciolti in PBS, in modo da avere una concentrazione finale di epirubicina di 0.01 mg/ml. Vengono condotti degli esperimenti di *pulse and chase*: dopo un primo periodo di contatto delle cellule con il coniugato, di 5 minuti per i tempi brevi e di 1 ora per i tempi più lunghi, viene rimosso il terreno e sostituito con terreno fresco privo del farmaco, lasciando in incubazione a 37°C per 5 o 15 minuti, nel caso dei tempi brevi, e per 1, 2 o 5 ore nel caso dei tempi lunghi. Nel caso del trattamento a 5 ore, viene anche condotto un esperimento in presenza di leupeptina, un inibitore dell'enzima catepsina B, responsabile del rilascio del farmaco dal coniugato, per poter così evidenziare solo la fluorescenza data dal coniugato integro e non da epirubicina libera. In seguito viene rimosso il terreno, si eseguono dei lavaggi con PBS arricchito con il 10% di FBS (3 x 3 ml) ed infine viene rimosso il vetrino e montato su un adattatore per poter poi essere osservato al microscopio confocale.

5. Risultati

5.1 Sintesi e caratterizzazione dei coniugati mPEG-gemcitabina

Per la sintesi dei coniugati mPEG-gemcitabina è stato impiegato monometossi-poli-(etilenglicole) lineare (mPEG-OH) a peso molecolare 5 e 20 kDa e mPEG-COOH a struttura ramificata di peso molecolare 20 kDa.

mPEG-OH a struttura lineare è stato derivatizzato a mPEG-OCH₂-COOH e le percentuali di modifica, determinate per titolazione con NaOH 0.01N, sono riportate in tabella 5.1, unitamente alle rese di reazione:

Polimero	% dei gruppi COOH	Resa di reazione (%)
mPEG ₅₀₀₀ -COOH	81,9	86,5
mPEG ₂₀₀₀₀ -COOH	89,8	92,4

Tabella 5.1: Percentuale di modifica del mPEG-OH lineare e rese di reazione

Successivamente il gruppo carbossilico terminale del PEG è stato attivato ad estere succinimmidico mediante reazione con N-idrossisuccinimide in presenza di N,N'-dicicloesilcarbodiimide. Le rese di reazione e le percentuali di attivazione calcolate mediante saggio colorimetrico con TNBS in presenza di Gly-Gly sono riportate in tabella 5.2.

Polimero	Grado di attivazione (%)	Rese di reazione (%)
mPEG ₅₀₀₀ -NHS	95,2 %	89,4 %
mPEG ₂₀₀₀₀ -NHS	96,8 %	82,1 %
mPEG ₂₀₀₀₀ -NHS	90,6 %	94,3 %

Tabella 5.2: Grado di attivazione del gruppo carbossilico del PEG e rese di reazione

Al gruppo carbossilico così attivato è stato legato il farmaco gemcitabina, attraverso il gruppo amminico primario aromatico in posizione 4, con formazione di un legame ammidico. Critico per la resa della reazione è stato il rapporto molare polimero:farmaco impiegato: in particolare buone rese di coniugazione sono state ottenute quando il rapporto molare è di 1:3. Le rese di reazione sono riportate in tabella 5.3:

Coniugato	Rese di reazione (%)
mPEG ₅₀₀₀ -dFdC	90,2 %
mPEG ₂₀₀₀₀ -dFdC	84,4 %
mPEG ₂₀₀₀₀ -dFdC	86,3 %

Tabella 5.3: Rese di reazione di coniugazione di PEG-gemcitabina

I prodotti di coniugazione sono stati purificati da gemcitabina in eccesso e da piridina mediante cromatografia di gel-filtrazione.

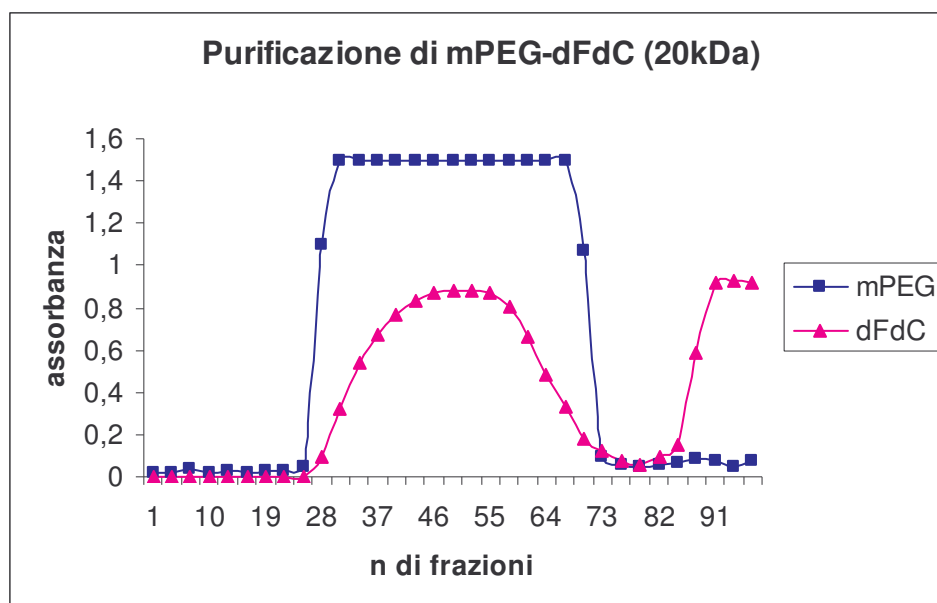


Figura 5.1: Purificazione di mPEG₂₀₀₀₀-dFdC per cromatografia di gel-filtrazione

In figura 5.1 viene riportato il cromatogramma relativo alla purificazione di mPEG₅₀₀₀-dFdC: il picco compreso fra le frazioni 26 e 74 corrisponde al coniugato mPEG-dFdC, mentre quello fra le frazioni 85 e 95 corrisponde a gemcitabina in eccesso, a piridina usata come

solvente di reazione e a N-idrossisuccinimide liberata durante la reazione. Come si può vedere, il picco corrispondente al coniugato è ben separato dagli altri prodotti. Il prodotto così ottenuto è stato caratterizzato mediante spettrofotometria UV-Vis, spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, cromatografia liquida ad alte prestazioni a fase inversa (RP-HPLC) e di gel-filtrazione (GPC-HPLC).

5.1.1 Caratterizzazione dei coniugati mPEG-gemcitabina

5.1.1.1 Caratterizzazione spettrofotometrica

I prodotti sono stati caratterizzati mediante spettrofotometria UV-Vis, confrontando gli spettri di assorbimento dei bioconiugati con quello del farmaco tal quale. Quale esempio in figura 5.2 è riportato in blu lo spettro di assorbimento di gemcitabina, che presenta un massimo di assorbimento a 268 nm, mentre in rosso è riportato lo spettro di assorbimento di mPEG₅₀₀₀-dFdC, che presenta massimi di assorbimento a 300 nm, 242 nm e 207 nm.



Figura 5.2: Spettro di assorbimento di gemcitabina (blu) e di mPEG₅₀₀₀-dFdC (rosso)

Come si può osservare, lo spettro del bioconiugato è nettamente diverso da quello di gemcitabina, e queste variazioni sono dovute all'acilazione del gruppo amminico di gemcitabina da parte del mPEG.

5.1.1.2 Caratterizzazione mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

L'analisi spettroscopica ha permesso di confermare l'avvenuta reazione di coniugazione per acilazione in posizione N4 del farmaco e inoltre di escludere la formazione di specie di-

PEGilate dovute alla formazione di legami esterei per il contemporaneo coinvolgimento dei gruppi ossidrilici della porzione zuccherina del farmaco.

In figura 5.3 è riportato lo spettro NMR di gemcitabina e in figura 5.4 è riportato quello del coniugato mPEG₅₀₀₀-dFdC entrambi in d₆-DMSO, mentre in tabella 5.4 sono riportati i valori ppm dei principali segnali di entrambi gli spettri. Nello spettro del coniugato si nota la scomparsa del segnale a 7.3 ppm, presente nello spettro di gemcitabina libera e corrispondente al gruppo amminico libero, e la comparsa di un segnale a 10.6 ppm, relativo alla formazione del gruppo amidico. I segnali relativi ai gruppi ossidrilici in posizione 3' e 5', presenti a 5.2 ppm e a 6.3 ppm rispettivamente, rimangono invece inalterati, escludendo un loro coinvolgimento nella reazione di coniugazione. Lo shift del segnale dell'idrogeno in posizione 5, da 5.8 ppm in gemcitabina a 7.2 ppm nel coniugato, ha confermato l'avvenuta reazione in posizione 4.

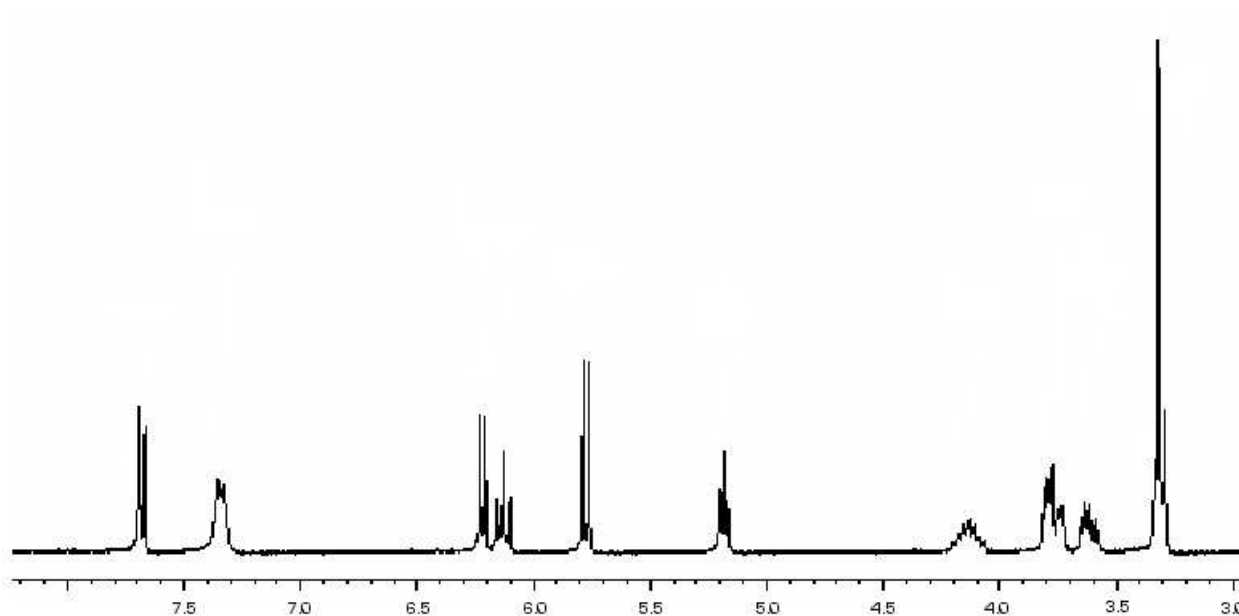


Figura 5.3: Spettro ¹H-NMR di gemcitabina in d₆-DMSO

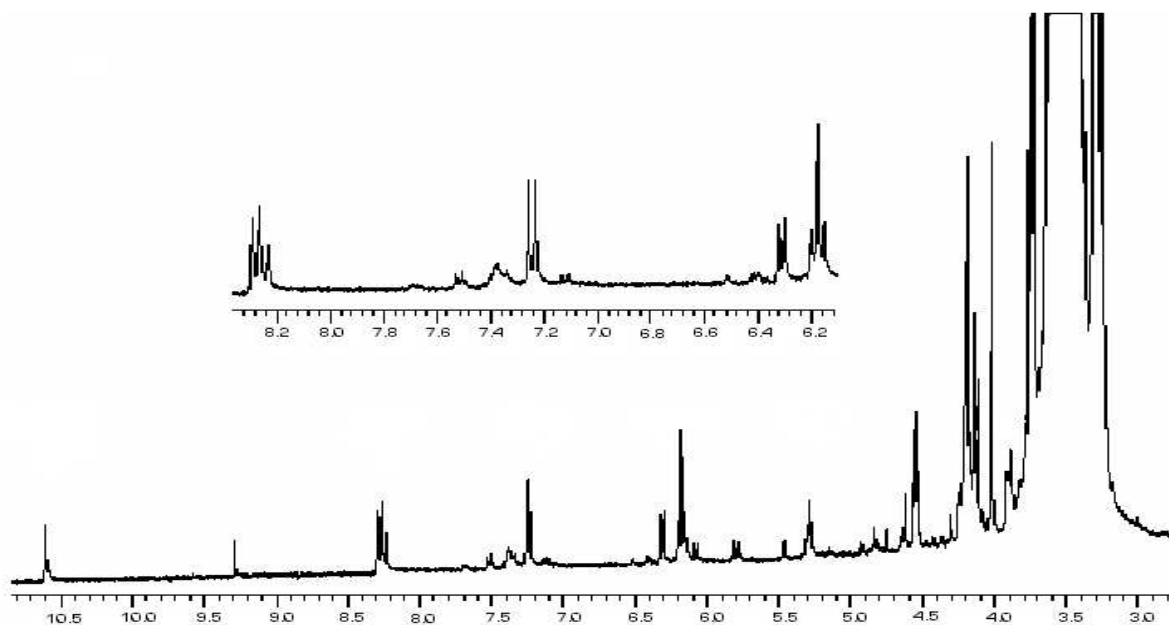


Figura 5.4: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di $m\text{PEG}_{5000}\text{-dFdc}$ in $d_6\text{-DMSO}$

δ_{H} (ppm)	protoni dFdc	molteplicità	δ_{H} (ppm)	protoni PEG-dFdc	molteplicità
3.6	H-C4'	1H, m	3.5	PEG	
3.8	H ₂ -C5'	2H, m	3.6	H-C4'	1H, coperto da PEG
4.1	H-C3'	1H, m	3.8	H ₂ -C5'	2H, m
5.2	HO-C5'	1H, t	5.2	HO-C5'	1H, m
5.8	H-C5	1H, d	6.2	H-C1'	1H, t
6.1	H-C1'	1H, t	6.3	HO-C3'	1H, d
6.3	HO-C3'	1H, d	7.2	H-C5	1H, d
7.3	H ₂ N-C4	2H	8.3	H-C6	1H, d
7.7	H-C6	1H, d	10.6	HN-CO	1H, s

m = multipletto, t = tripletto, d = doppietto, s = singoletto

Tabella 5.4: Principali segnali $^1\text{H-NMR}$ di dFdc e mPEG-dFdc in $d_6\text{-DMSO}$

5.1.1.3 Caratterizzazione mediante cromatografia di gel-filtrazione in HPLC

I bioconiugati sono stati caratterizzati mediante cromatografia di gel-filtrazione in HPLC. In figura 5.5 è riportato il cromatogramma relativo all'eluizione di $m\text{PEG}_{20000}\text{-dFdc}$, che

presenta un unico picco con tempo di ritenzione t_R di 26 minuti, uguale a quello del corrispondente mPEG *branched* non modificato. Questo dato ha permesso di escludere la formazione di specie diPEGilate. Analoghi risultati sono stati ottenuti analizzando anche gli altri coniugati, mPEG₅₀₀₀-dFdC e mPEG₂₀₀₀₀-dFdC.

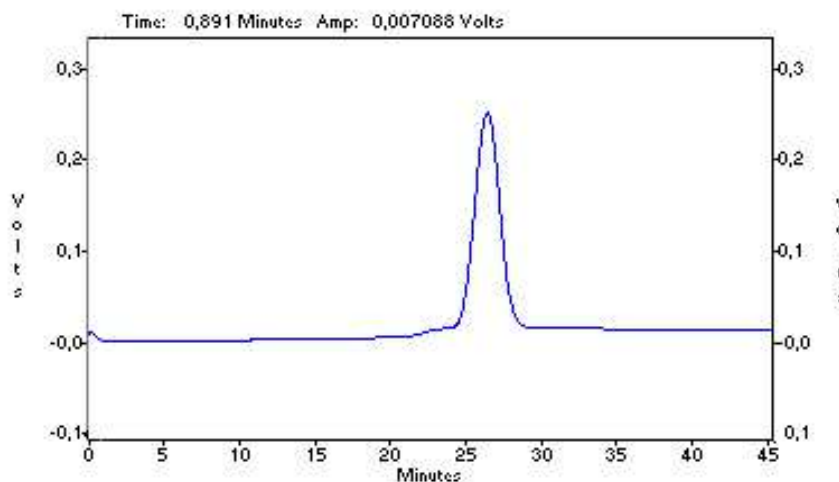


Figura 5.5: Caratterizzazione GP-HPLC di mPEG₂₀₀₀₀-dFdC

5.1.1.4 Caratterizzazione mediante cromatografia liquida a fase inversa RP-HPLC

I prodotti sono stati caratterizzati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC). Come si vede dal cromatogramma di mPEG₂₀₀₀₀-dFdC riportato in figura 5.6, il coniugato viene eluito con un tempo di ritenzione di 22,9 minuti, nettamente diverso da quello di gemcitabina libera, eluita con un tempo di ritenzione di 8,6 minuti. Dall'area del picco di gemcitabina, mediante una retta di taratura calcolata nelle stesse condizioni sperimentali, si è risalito alla quantità di farmaco libero presente nel coniugato come impurezza, espressa come percentuale di gemcitabina libera su gemcitabina totale (tabella 5.5).

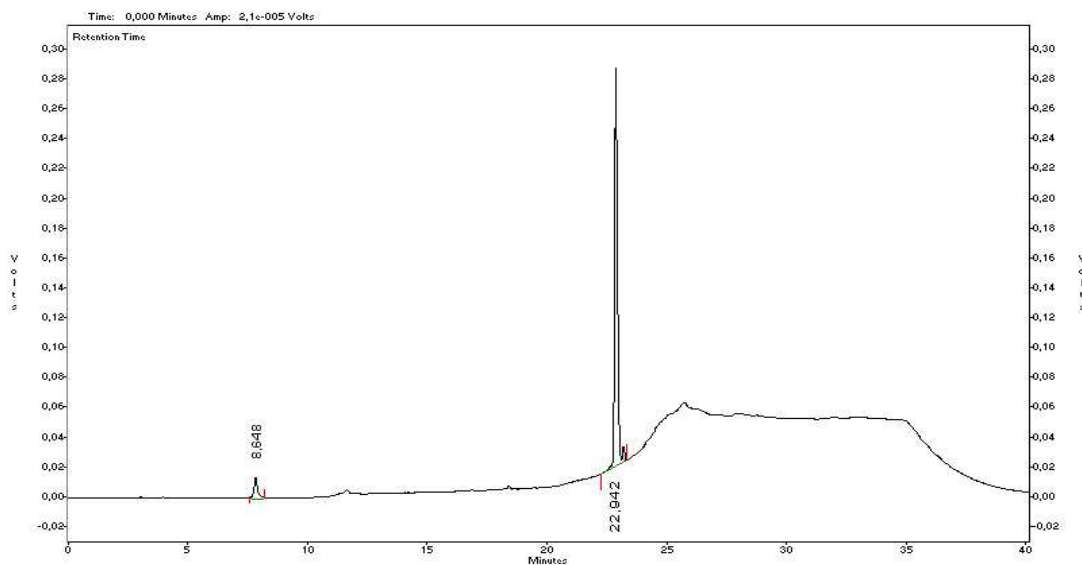


Figura 5.6: Caratterizzazione mediante RP-HPLC di mPEG₅₀₀₀-dFdc

La quantità di gemcitabina legata al polimero è stata determinata previa reazione di idrolisi in ambiente alcalino per NaOH 1N del bioconjugato. Come si può vedere dal cromatogramma riportato in figura 5.7, relativo all'idrolisi di mPEG₅₀₀₀-dFdc, scompare il picco a 23 minuti, corrispondente all'addotto, e compare invece il picco di gemcitabina a 8.6 minuti.

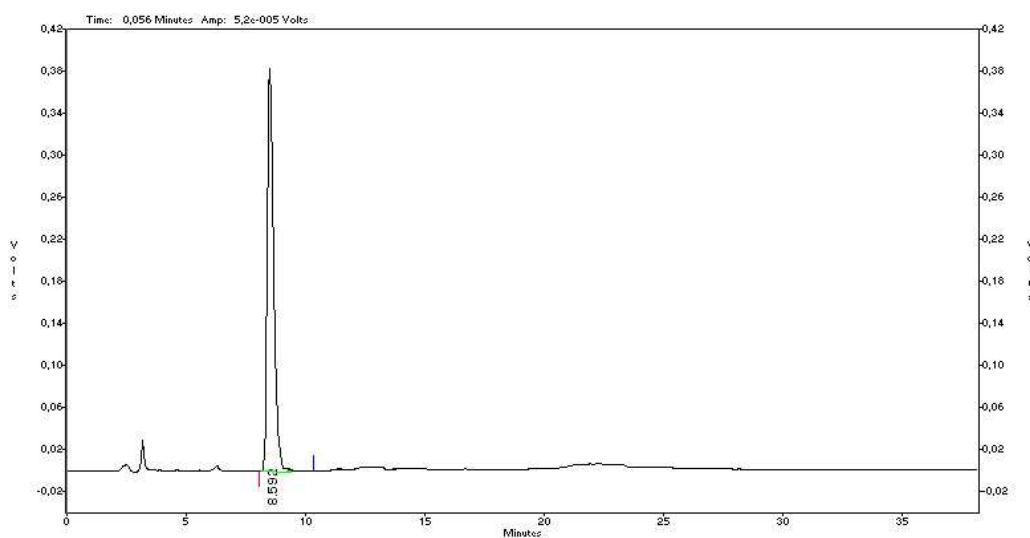


Figura 5.7: Caratterizzazione mediante RP-HPLC del prodotto di idrolisi alcalina di mPEG₅₀₀₀-dFdc

Dall'area di tale picco, corretta della quantità di farmaco libero, è stato possibile risalire alla quantità di gemcitabina legata nel coniugato. I risultati, espressi come percentuale di mPEG-dFdc su mPEG totale e come percentuale di dFdc su mPEG totale, sono riportati in tabella 5.5,

unitamente ai valori di gemcitabina libera, espressi come percentuale di dFdC libera su dFdC totale:

Coniugato	PEG-dFdC/PEG tot % (mol/mol)	dFdC tot/PEG tot % (mol/mol)	dFdC libera/dFdC tot % (mol/mol)
mPEG ₅₀₀₀ -dFdC	77.96	1.95	0.96
mPEG ₂₀₀₀₀ -dFdC	76.51	0.98	0.87
mPEG ₂₀₀₀₀ -dFdC	75.80	0.98	0.11

Tabella 5.5: % di legame di dFdC e % di dFdC libera presente come impurezza

5.2 Sintesi e caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-gemcitabina

Per la coniugazione dell'acido L-2-amminoadipico (AD) o dell'acido β -glutammico (β Glu) al polimero si è utilizzato un PEG eterobifunzionale, avente ad una estremità un gruppo amminico protetto dal gruppo Boc e all'altra estremità un gruppo carbossilico attivato ad estere succinimmidico. La reazione di coniugazione avviene per formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossilico attivato del PEG e il gruppo amminico dell'amminoacido presente in eccesso nella miscela di reazione. Il prodotto ottenuto è stato purificato dall'eccesso di amminoacido mediante estrazioni con cloroformio e successiva precipitazione in etere etilico. La quantità di amminoacido legato è stata determinata mediante titolazione dei gruppi carbossilici con NaOH 0.01N e le percentuali di modifica, assieme alle rese di reazione, sono riportate in tabella 5.6

Coniugato	% amminoacido legato	Resa di reazione (%)
Boc-PEG-AD-(COOH) ₂	91,0 %	88,6 %
Boc-PEG- β glu-(COOH) ₂	46,8 %	67,3 %

Tabella 5.6: Percentuale di legame dell'amminoacido e rese di reazione

In figura 5.8 e 5.9 invece sono riportati rispettivamente lo spettro ¹H-NMR e ¹³C-NMR del prodotto Boc-PEG-AD-(COOH)₂. Nello spettro ¹H-NMR si riconoscono i segnali relativi al gruppo protettore "boc" a δ 1.45 ppm (9H) e i segnali attribuibili ai protoni dell'amminoacido: rispettivamente quelli dei gruppi CH₂ a δ 1.00 ppm, 2.10 ppm e 2.85 ppm, quello al gruppo CH in posizione 2', a δ 4.10 ppm e quello relativo all'ammide a δ 7.45 ppm. Nello spettro ¹³C-NMR sono evidenti invece i segnali relativi ai due gruppi carbossilici liberi dell'amminoacido a δ 176.3 ppm e δ 175.9 ppm.

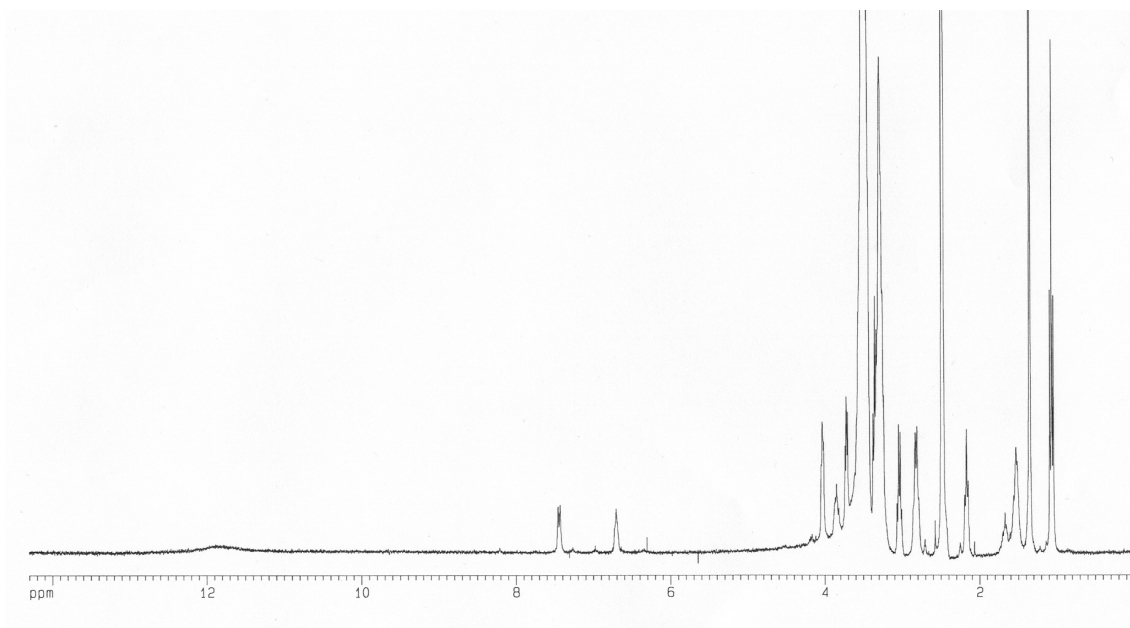


Figura 5.8: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di Boc-PEG-AD-(COOH) $_2$ in $d_6\text{-DMSO}$

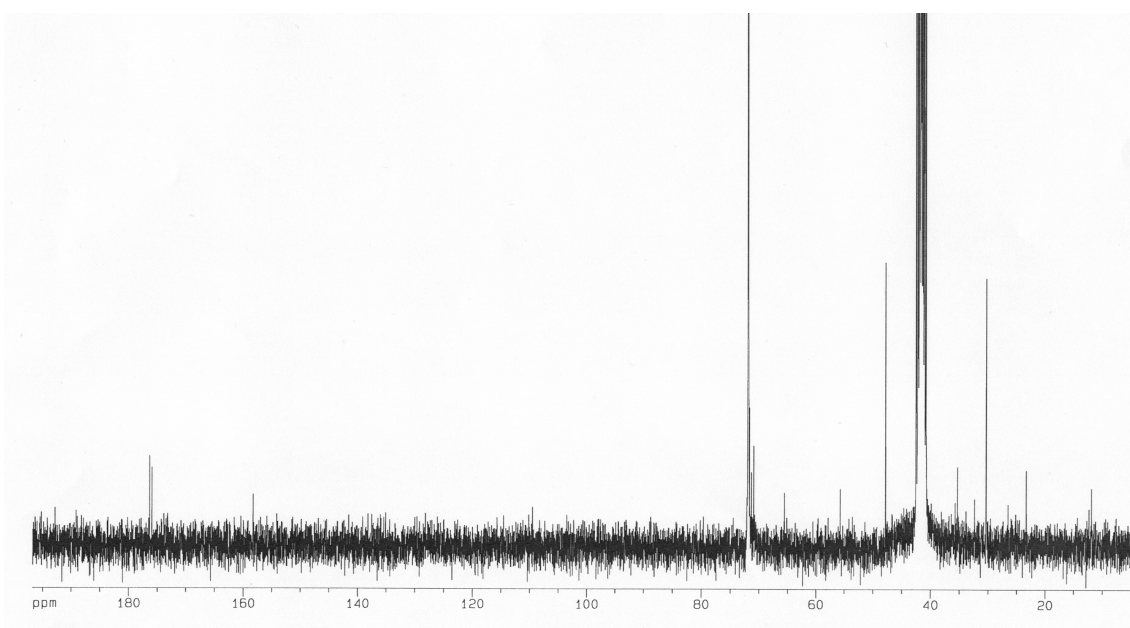


Figura 5.9: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ di Boc-PEG-AD-(COOH) $_2$

La deprotezione del gruppo amminico del PEG è stata condotta mediante reazione di idrolisi acida con TFA. Il grado di idrolisi e le rese di reazione sono riportati in tabella 5.7.

Coniugato	Grado di idrolisi (%)	Resa di reazione (%)
NH $_2$ -PEG-AD-(COOH) $_2$	93,5 %	78,6 %
NH $_2$ -PEG- β Glu-(COOH) $_2$	97,3 %	83,3 %

Tabella 5.7: Grado di idrolisi e rese di reazione

Per la successiva reazione di acido folico al gruppo amminico deprotetto del PEG l'acido folico è stato attivato ad estere succinimmidico sul carbossile in γ mediante reazione con DCC e NHS. Dati di letteratura [153] riportano che il gruppo carbossilico in α viene solo parzialmente coinvolto (18-20%) nella reazione di attivazione. Il grado di attivazione, calcolato con saggio colorimetrico, è risultato essere del 96%, e la resa di reazione del 90,5%.

Le migliori rese di coniugazione si sono ottenute impiegando un rapporto molare polimero/acido folico di 1:4. Il prodotto ottenuto è stato purificato da acido folico in eccesso mediante estrazioni con cloroformio e successiva precipitazione in etere etilico. La quantità di acido folico coniugato è stata determinata mediante saggio colorimetrico con TNBS: le percentuali di legame sono riportate in tabella 5.8, unitamente alle rese di reazione.

Coniugato	% di legame di acido folico	Resa di reazione (%)
Folato-PEG-COOH	92,7 %	81,2 %
Folato-PEG-AD-(COOH) ₂	95,4 %	90,2 %
Folato-PEG- β Glu-(COOH) ₂	97,3 %	59,8 %

Tabella 5.8: Percentuale di coniugazione di acido folico e rese di reazione

I prodotti ottenuti sono stati caratterizzati mediante spettroscopia ¹H-NMR e cromatografia RP-HPLC. Come si può vedere dalle figure 5.11 e 5.12, in cui sono riportati rispettivamente gli spettri ¹H-NMR di acido folico e del coniugato folato-PEG-AD-(COOH)₂, e dai valori di δ dei principali segnali con i relativi protoni riportati in tabella 5.9, lo spettro del coniugato presenta i segnali propri della molecola di acido folico. In particolare il singoletto a δ 8.60 ppm (H-7) ed il doppietto a δ 4.46 ppm (J=5.76 Hz) attribuibile alla posizione H-9, rivelano la presenza dell'anello pteridinico. Si osservano inoltre i doppietti *orto* accoppiati a δ 7.63 ppm (H-3' 5') e a δ 6.62 ppm (H-2' 6') (J=7.86 Hz) relativi all'anello p-amino-benzoico. Sono presenti inoltre segnali dei gruppi amidici ed in particolare il doppietto a δ 7.94 ppm (J=7.2 Hz), relativo all'unità p-amino-benzoica, e un doppietto di doppietti a δ 7.85 ppm, attribuibile al legame amidico fra il carbossile in posizione 5'' dell'acido glutammico e il PEG.

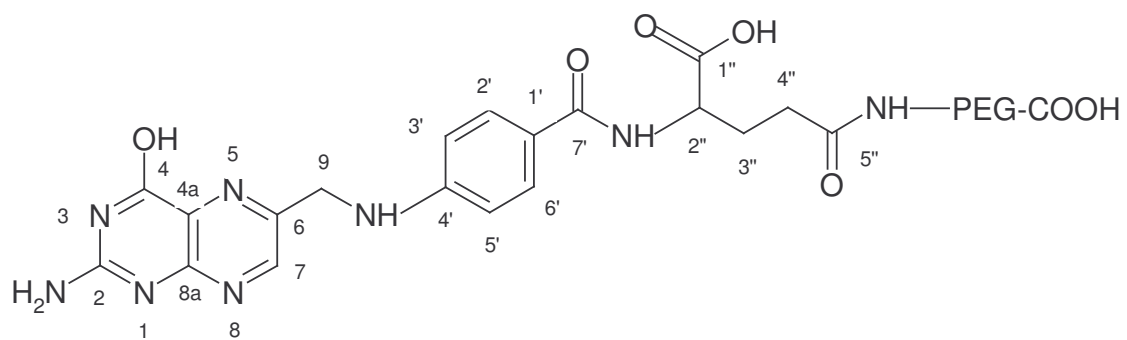


Figura 5.10: Struttura di folato-PEG-COOH

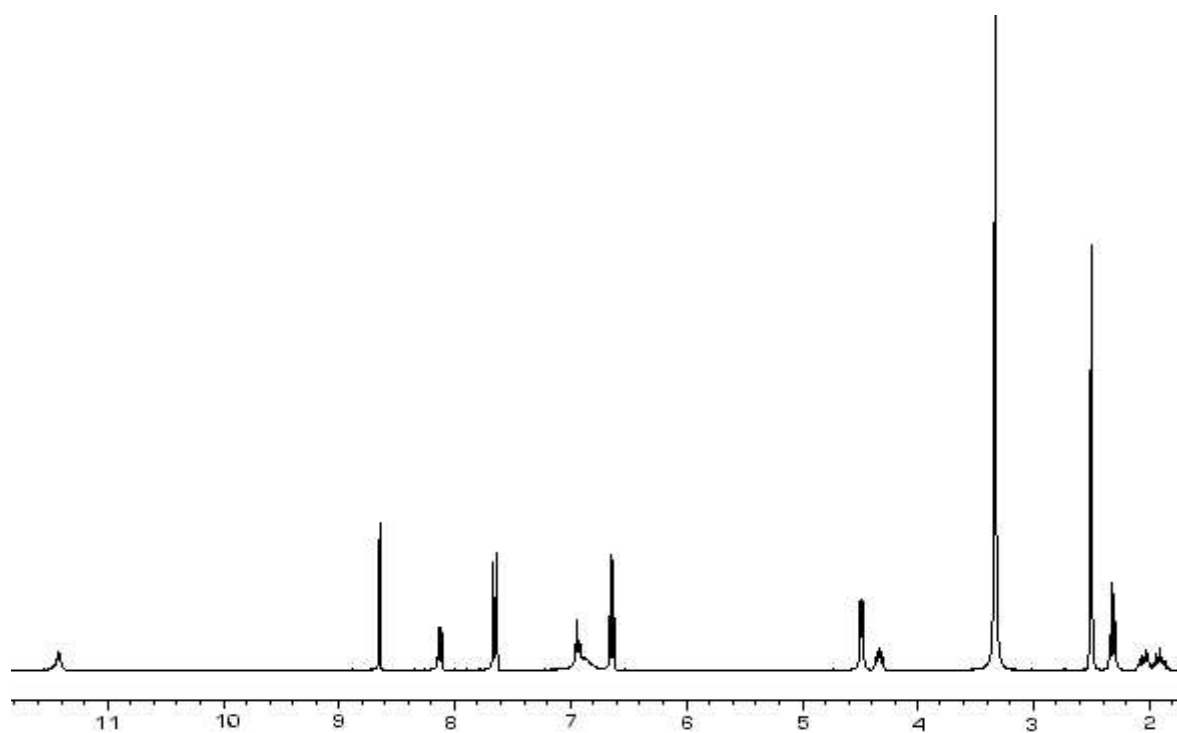


Figura 5.11: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di acido folico in $d_6\text{-DMSO}$

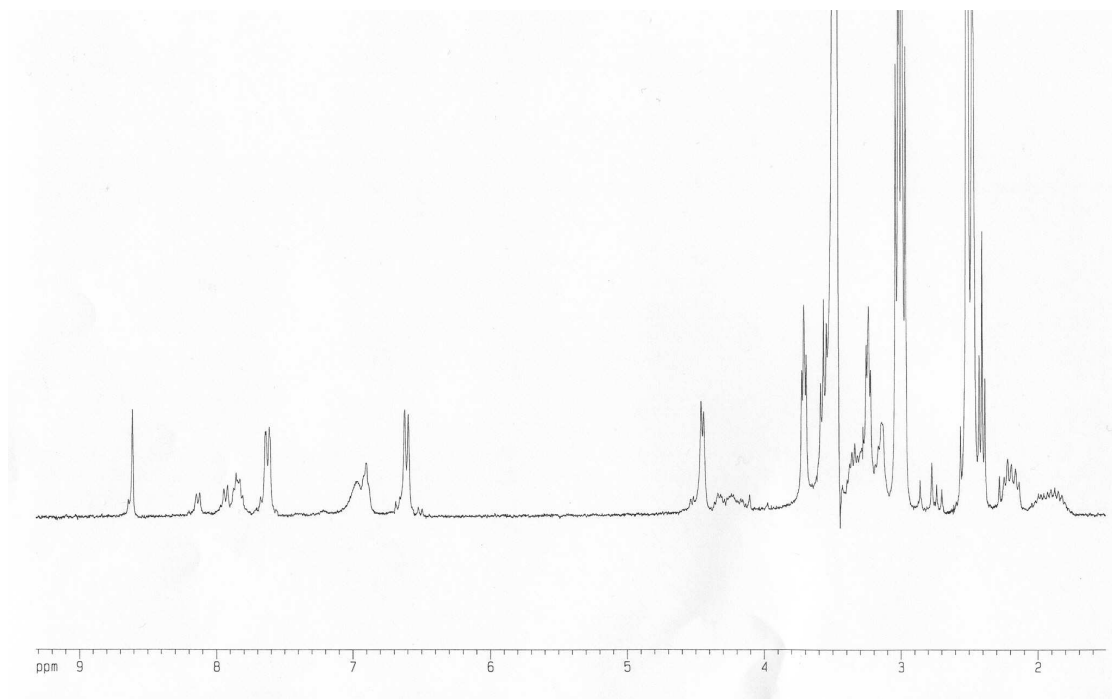


Figura 5.12: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di folato-PEG-COOH in $d_6\text{-DMSO}$

δ_{H} (ppm)	Posizione	molteplicità
8.60	H-C7	1H, s
4.46	H ₂ -C9	2H, d
6.91	H-N10	1H, m
7.63	H-C2'-6'	2H, d
6.62	H-C3'-5'	2H, d
8.08	H-NCO7'	1H, d
11.42	H-OOC1''	1H, s
4.36	H-C2''	1H, m
2.38	H ₂ -C4''	2H, m
2.20-1.80	H ₂ -C3''	2H, t
3.50	CH ₂ -PEG	m
7.85	H-NCO5''	1H, m

Tabella 5.9: Principali segnali $^1\text{H-NMR}$ di acido folico e folato-PEG-COOH in $d_6\text{-DMSO}$

Il cromatogramma RP-HPLC relativo a folato-PEG-COOH riportato in figura 5.13 presenta un picco dato dal coniugato a $t_R=22.6$ minuti, mentre la presenza di acido folico libero a $t_R=10.6$ minuti è praticamente trascurabile, essendo inferiore al 0.1 %.

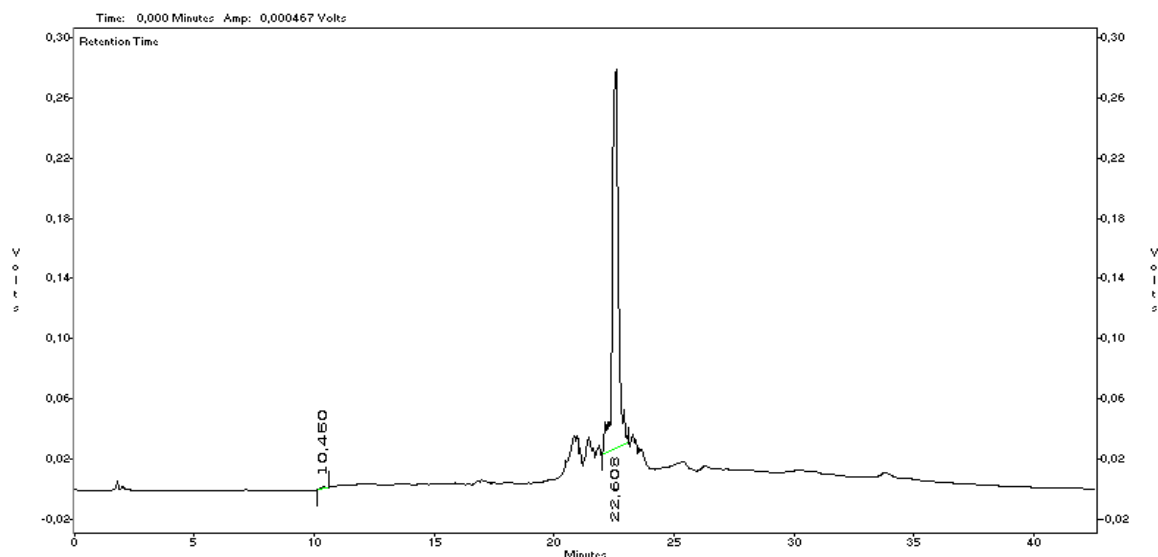


Figura 5.13: Cromatogramma di folato-PEG-COOH

I gruppi carbossilici dei derivati folato-PEG-COOH, folato-PEG-AD-(COOH)₂ e folato-PEG-βGlu-(COOH)₂ sono stati attivati ad estere succinimmidico con DCC e NHS per la successiva reazione di coniugazione con il farmaco. Il grado di attivazione è riportato in tabella 5.10, unitamente alle rese di reazione.

Coniugato	% di gruppi COOH attivati	Resa di reazione (%)
Folato-PEG-COOH	100 %	88,7 %
Folato-PEG-AD-(COOH) ₂	97,3 %	86,8 %
Folato-PEG-βGlu-(COOH) ₂	96,5 %	83,1 %

Tabella 5.10: Percentuale di attivazione dei gruppi carbossilici e rese di reazione

La coniugazione di gemcitabina al polimero avviene per formazione di un legame ammidico fra i gruppi carbossilici attivati di PEG e il gruppo amminico aromatico di

gemcitabina, in presenza di un eccesso di farmaco. I prodotti ottenuti sono stati purificati dall'eccesso di gemcitabina mediante cromatografia di gel-filtrazione. In figura 5.14 è riportato il cromatogramma relativo alla purificazione di folato-PEG-dFdC: il picco compreso fra le frazioni 22 e 66, corrispondente al coniugato, risulta ben separato dal picco compreso fra le frazioni 85 e 95, corrispondente a gemcitabina libera.

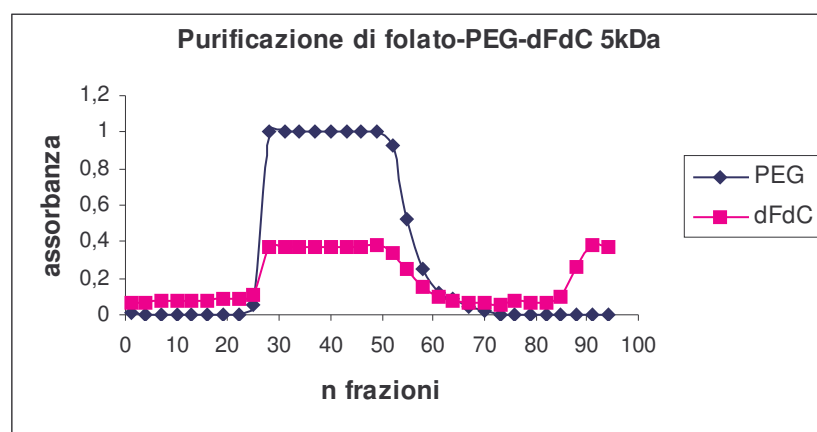


Figura 5.14: Cromatogramma di purificazione di folato-PEG-dFdC

Le rese della reazione, dopo purificazione del prodotto, sono state di 83,3 % per folato-PEG-dFdC, 70,6 % per folato-PEG-AD-(dFdC)₂ e 65,6% per folato-PEG-βGlu-(dFdC)₂.

I prodotti così ottenuti sono stati caratterizzati mediante spettrofotometria UV-Vis, spettroscopia ¹H-NMR e cromatografia liquida in fase inversa RP-HPLC.

5.2.1 Caratterizzazione dei coniugati folato-PEG-gemcitabina

5.2.1.1 Caratterizzazione con spettrofotometria UV-Vis

I coniugati sono stati caratterizzati mediante analisi UV-Vis. Per confronto sono stati registrati anche gli spettri di gemcitabina e di acido folico, nelle stesse condizioni.

In figura 5.15 è riportato lo spettro di gemcitabina, che presenta un massimo di assorbimento a 268 nm, mentre lo spettro di acido folico, riportato in figura 5.16, presenta un massimo di assorbimento a 283 nm.

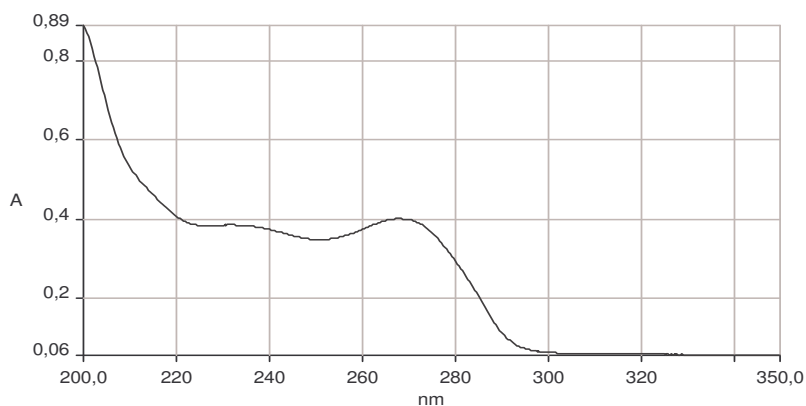


Figura 5.15: Spettro di assorbimento UV-Vis di gemcitabina

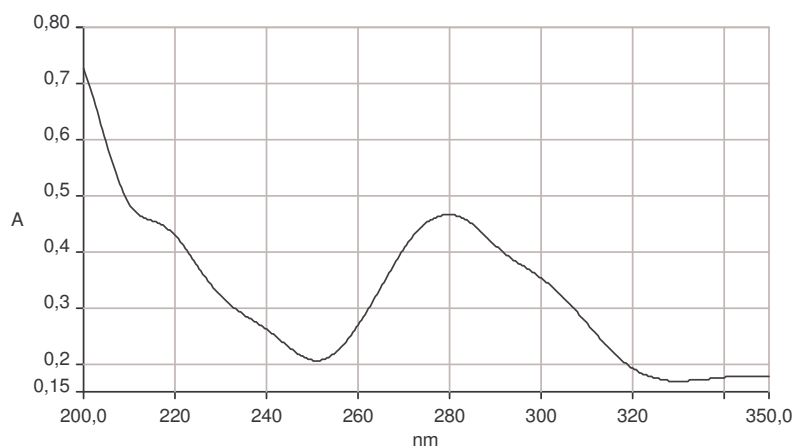


Figura 5.16: Spettro di assorbimento UV-Vis di acido folico

Nello spettro di assorbimento di folato-PEG-dFdC (figura 5.17) invece sono presenti 3 massimi di assorbimento, a 208 nm, a 247 nm e a 285 nm, indice questo della variazione del cromoforo del farmaco per la reazione di acilazione sul gruppo amminico in posizione 4 e della presenza della molecola di acido folico.

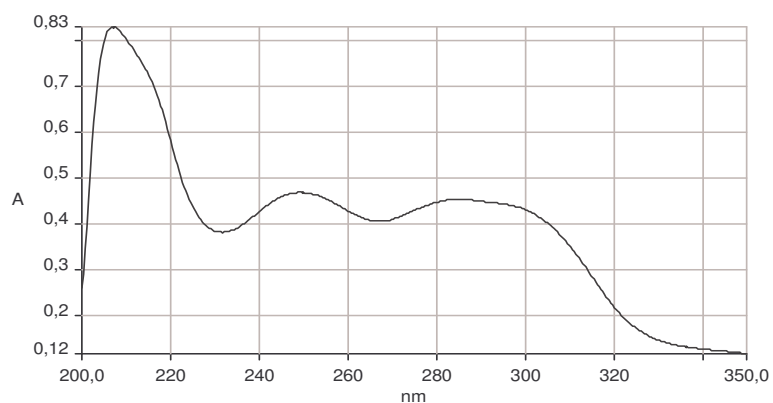


Figura 5.17: Spettro di assorbimento UV-Vis di folato-PEG-dFdC

5.2.1.2 Caratterizzazione con spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

In figura 5.18 è riportato lo spettro NMR del coniugato folato-PEG-dFdC, mentre i principali segnali registrati nello spettro del coniugato, di gemcitabina e di acido folico sono presenti in tabella 5.11. Nello spettro del coniugato si può osservare, oltre ai segnali relativi alla molecola di acido folico già presenti nello spettro di folato-PEG-COOH (figura 5.12, tabella 5.9), anche la comparsa di segnali relativi alla molecola di gemcitabina (figura 5.3, tabella 5.4): i doppietti a δ 7.22 ppm e δ 8.35 ppm, relativi rispettivamente all'idrogeno in posizione 5 e 6, il doppietto e il multipletto relativi agli ossidrili in posizione 3' e 5', rispettivamente a δ 6.58 ppm e δ 5.14 ppm, il multipletto a δ 4.10 ppm dell'idrogeno in posizione 3', e il tripletto relativo all'idrogeno in posizione 1', a δ 6.15 ppm. In particolare il segnale relativo all'idrogeno in posizione 5 del farmaco presenta uno shift a valori di ppm più alti rispetto allo spettro di gemcitabina, da 5.8 ppm a 7.2 ppm, e i segnali relativi ai gruppi ossidrilici della porzione zuccherina rimangono invariati. Questo conferma che la reazione di coniugazione avviene sul gruppo amminico in posizione 4 della molecola di gemcitabina ed esclude invece la presenza di specie di-PEGhilate per formazione di legami esterei dati dal coinvolgimento dei gruppi ossidrilici.

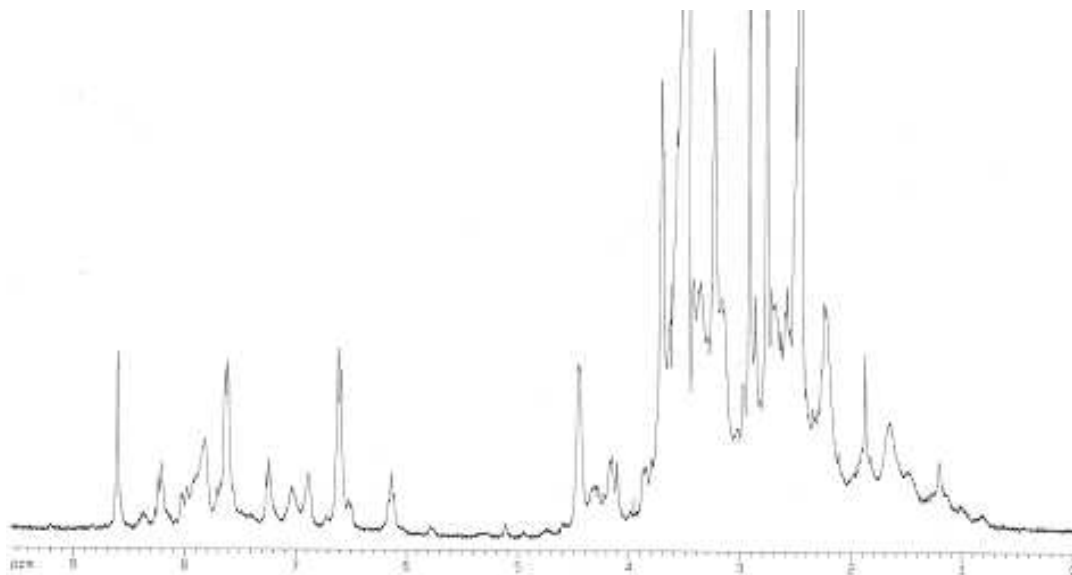


Figura 5.18: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di folato-PEG-dFdC in $d_6\text{-DMSO}$

δ_H (ppm)	posizione	molteplicità
8.60	acido folico H-C7	1H, s
4.46	acido folico H ₂ -C9	2H, d
6.91	acido folico H-N10	1H, m
7.63	acido folico H-C2'-6'	2H, d
6.62	acido folico H-C3'-5'	2H, d
8.08	acido folico H-NCO7'	1H, d
4.36	acido folico H-C2''	1H, m
2.38	acido folico H ₂ -C4''	2H, m
1.80	acido folico H ₂ -C3''	2H, t
3.50	CH ₂ -PEG	m
7.85	acido folico H-NCO5''	1H, m
3.60	dFdC H-C4'	1H, coperto da PEG
3.80	dFdC H ₂ -C5'	2H, coperto da PEG
4.10	dFdC H-C3'	1H, m
5.14	dFdC HO-C5'	1H, m
6.15	dFdC H-C1'	1H, t
6.58	dFdC HO-C3'	1H, d
7.22	dFdC H-C5	1H, d
8.35	dFdC H-C6	1H, d

Tabella 5.11: Principali segnali ¹H-NMR di folato-PEG-dFdC in d₆-DMSO

5.2.1.3 Caratterizzazione con cromatografia RP-HPLC

I prodotti sono stati caratterizzati mediante cromatografia RP-HPLC. Come si vede dal cromatogramma riportato in figura 5.19, relativo a folato-PEG-AD-(dFdC)₂, il coniugato viene eluito a t_R di 22.8 minuti, un tempo di ritenzione nettamente diverso da gemcitabina non coniugata, eluita a t_R 7.8 minuti, e da acido folico libero, presente a t_R di 12.2 minuti.

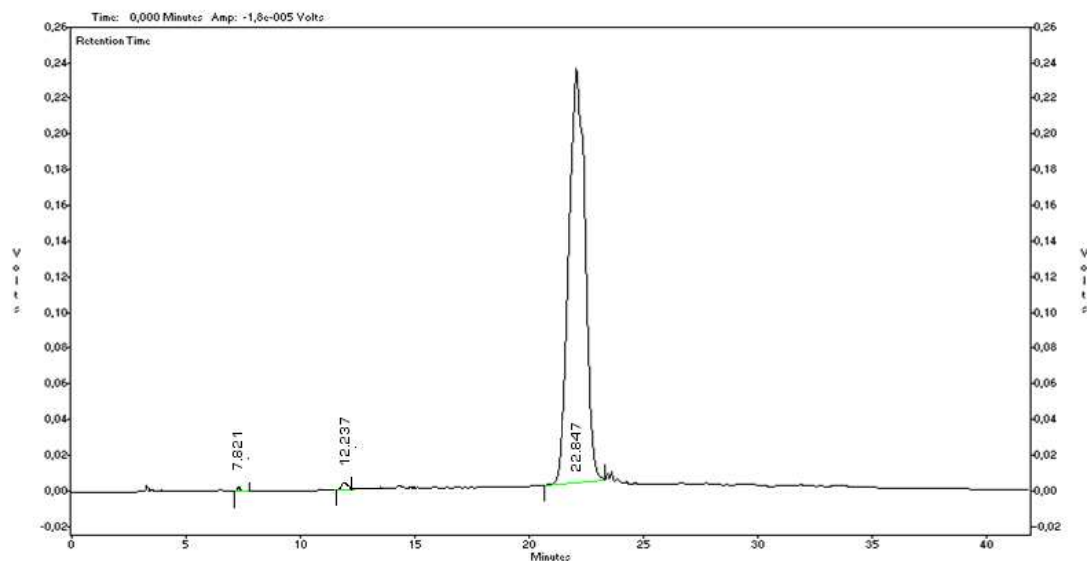


Figura 5.19: Cromatogramma di folato-PEG-dFdC

Dall'area del picco di gemcitabina si è risalito alla quantità di farmaco libero presente come impurezza, espressa come percentuale di farmaco libero rispetto al farmaco totale presente, e, previa reazione di idrolisi in ambiente alcalino, alla quantità di farmaco coniugato. Come si può vedere dal cromatogramma relativo al prodotto di idrolisi del coniugato, riportato in figura 5.20, si ha la comparsa di un picco molto più intenso di gemcitabina, a t_R di 8.0 minuti. Permane inoltre il picco del coniugato, a causa della presenza in esso della molecola di acido folico, che rimane legato al polimero e assorbe alla lunghezza d'onda a cui è settato il rivelatore.

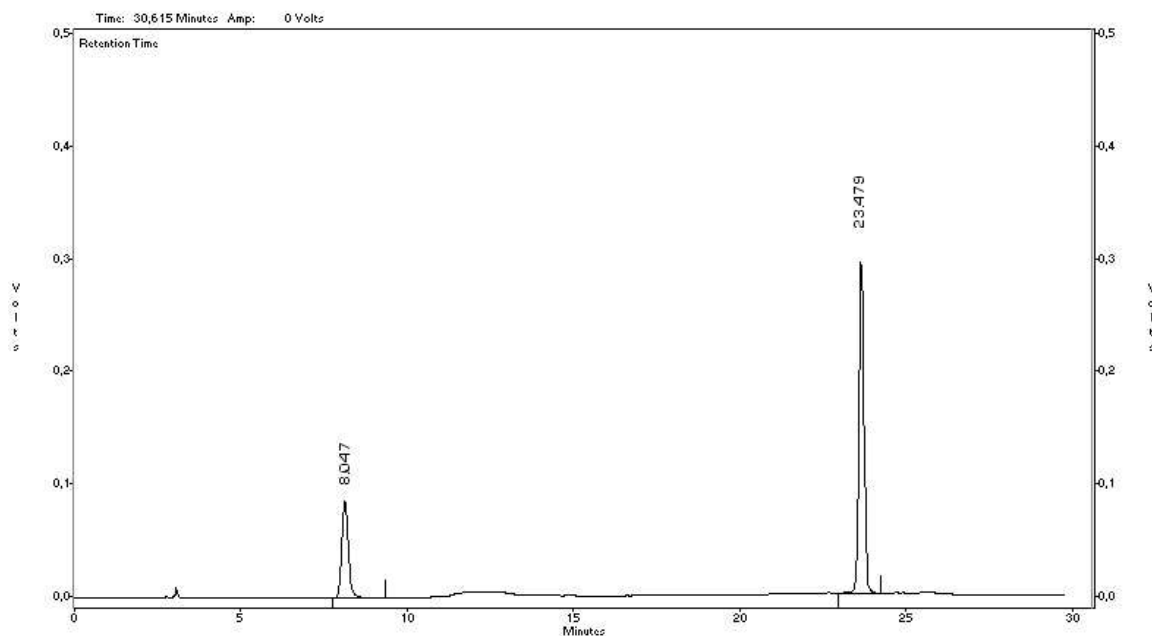


Figura 5.20: Cromatogramma di idrolisi di folato-PEG-dFdC

I valori di farmaco libero e coniugato sono riportati in tabella 5.12.

Coniugato	% PEG-dFdC/ PEG tot (mol/mol)	% dFdC/PEG tot (mol/mol)	% dFdC libera/ dFdC tot (mol/mol)
Folato-PEG-dFdC	45,58 %	2,11 %	0,01 %
Folato-PEG-AD-(dFdC) ₂	45,29 %	6,39 %	0,03 %
Folato-PEG-βGlu-(dFdC) ₂	39,94 %	4,90 %	0,48 %

Tabella 5.12: % di legame di dFdC e % di dFdC libera presente come impurezza

5.3 Studi eseguiti sui coniugati PEG-gemcitabina

5.3.1 Studi di rilascio di gemcitabina in soluzione tampone a diverso pH

Sui coniugati PEG-gemcitabina sono stati effettuati degli studi di rilascio di farmaco *in vitro*, incubando i coniugati in soluzioni tampone a diverso valore di pH.

Nelle figure 5.21, 5.22 e 5.23 sono riportate le curve di rilascio nel tempo di gemcitabina dai vari coniugati rispettivamente a pH 6.0, 7.4 e 8.0. (◆ mPEG₅₀₀₀-dFdC, ■ mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, × mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, ▲ folato-PEG-dFdC, * folato-PEG-AD-(dFdC)₂).

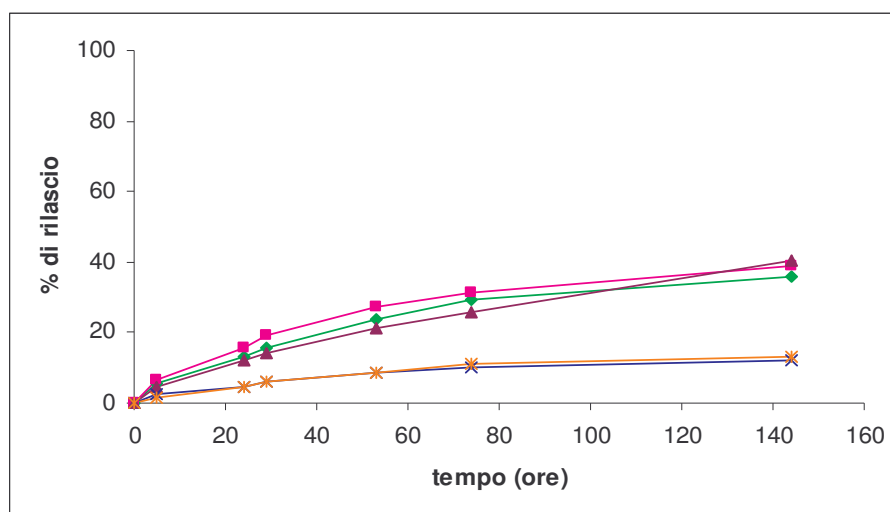


Figura 5.21: Cinetica di rilascio di gemcitabina dai coniugati a pH 6.0

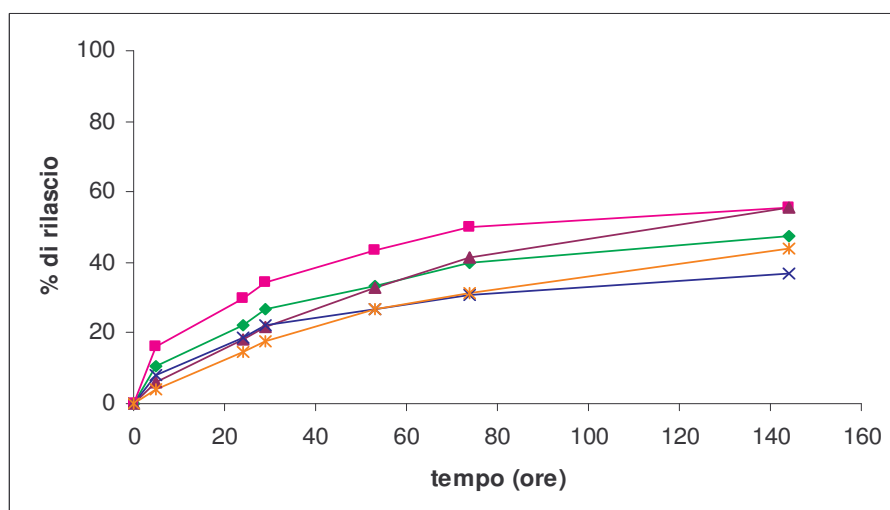


Figura 5.22: Cinetica di rilascio di gemcitabina dai coniugati a pH 7.4

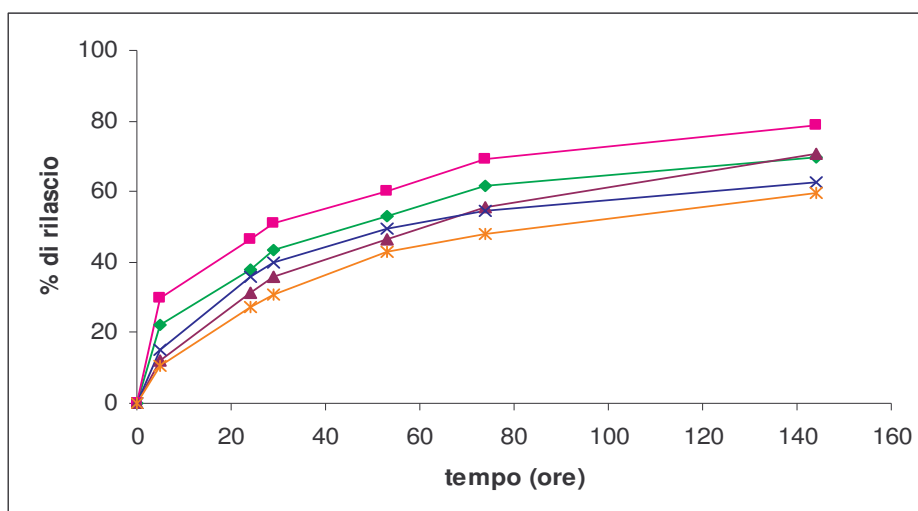


Figura 5.23: Cinetica di rilascio di gemcitabina dai coniugati a pH 8.0

Come si può vedere, tutti i coniugati considerati presentano una cinetica di rilascio del farmaco pH-dipendente: la percentuale di farmaco rilasciato dopo 7 giorni di incubazione (144 ore) a pH 6.0 è compresa fra il 12% e il 40%, sale a pH 7.4 a valori compresi fra 36% e 56% ed è ancora maggiore a pH 8.0, con valori compresi fra 59% e 79%. Il rilascio del farmaco è anche influenzato dalla presenza dello spaziatore amminoacidico interposto fra il farmaco e il polimero. Infatti nei coniugati folato-PEG-AD-(dFdC)₂ e mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, dove sono presenti rispettivamente l'acido amminoadipico e un residuo di lisina, la velocità di rilascio del farmaco è inferiore rispetto agli altri coniugati. A pH 6.0 ad esempio la percentuale di rilascio è 12-13% per i 2 coniugati citati, mentre gli altri coniugati presentano un rilascio del 35-40%. Il fenomeno è meno marcato a valori di pH più alti: a pH 7.4 i 2 coniugati presentano un rilascio rispettivamente del 43.7% e 36.8% contro 47-56% degli altri composti, e di 59.4% e 62.6% contro 70-78% a pH 8.0.

Il $T_{50\%}$, ossia il tempo in cui si ha il 50% del rilascio del farmaco, a pH fisiologico è di 74 ore per il coniugato lineare a PM 20 kDa e di 118 ore per il coniugato folato-PEG-dFdC, mentre tutti gli altri coniugati hanno un rilascio inferiore al 50% nel tempo di incubazione considerato. A valori di pH basico invece, il $T_{50\%}$ varia da un minimo di 29 ore per mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, a un massimo di 85 ore per il coniugato folato-PEG-AD-(dFdC)₂, mentre a pH acido nessuno dei coniugati rilascia più del 50% di farmaco.

In nessun caso è stata riscontrata la formazione del metabolita inattivo 2',2'-difluoro-2'-deossi-uridina (dFdU), prodotto di deaminazione ossidativa di gemcitabina.

5.3.2 Studi di stabilità dei coniugati in plasma

Gli studi di stabilità in plasma sono stati condotti incubando i coniugati in plasma di topo. In figura 5.24 è riportata la percentuale di gemcitabina totale rilasciata dai coniugati analizzati, data dalla somma di gemcitabina e del suo metabolita, mentre in figura 5.25 è rappresentata la formazione del metabolita inattivo dFdU. (◆ mPEG₅₀₀₀-dFdC, ■ mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, x mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, ▲ folato-PEG-dFdC, * folato-PEG-AD-(dFdC)₂).

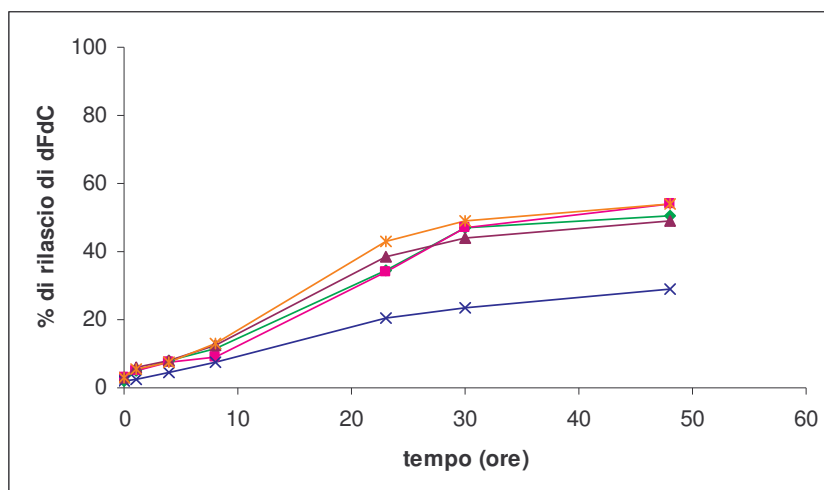


Figura 5.24: Rilascio di gemcitabina dai coniugati incubati in plasma di topo

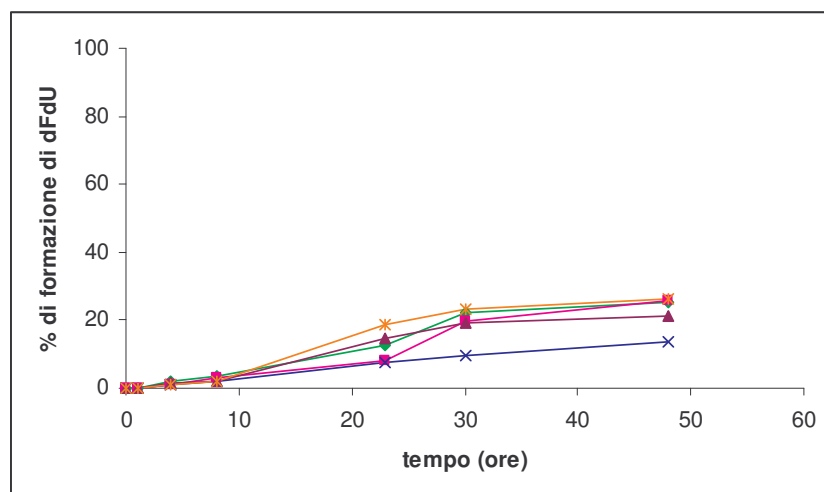


Figura 5.25: Formazione di dFdU dai coniugati incubati in plasma di topo

Nelle prime 8 ore di incubazione tutti i coniugati risultano piuttosto stabili, con percentuali di rilascio paragonabili a quelle ottenute incubando gli stessi coniugati in tampone a pH fisiologico: variano da un valore di 7.6% per il coniugato *branched* a PM 20 kDa a un massimo di 12.9% per il coniugato folato-PEG-AD-(dFdC)₂. Inoltre la formazione del metabolita

inattivo dFdU è minima. Per tempi di incubazione più lunghi la quantità di farmaco totale rilasciato aumenta, fino ad un massimo di 53.8% a 48 ore, con contemporanea formazione di dFdU, presente per il 25% circa a 48 ore. Da notare la maggiore stabilità del coniugato a struttura ramificata rispetto a tutti gli altri, con un massimo di farmaco totale rilasciato del 30%.

5.3.3 Studi di stabilità nei confronti dell'enzima citidin-deaminasi

Gli studi di stabilità in presenza di citidin-deaminasi (CDA), enzima responsabile della conversione di gemcitabina nel suo metabolita inattivo dFdU, sono stati condotti sia su gemcitabina tal quale che sui vari bioconiugati. La cinetica enzimatica seguita per via spettrofotometrica ha dimostrato che mentre con gemcitabina libera l'assorbanza diminuisce progressivamente fino quasi a zero nel tempo di 30 minuti (figura 5.26), con i coniugati PEG-gemcitabina il valore di assorbanza rimane pressoché invariato (figura 5.27), indice della stabilità del farmaco quando legato al polimero.

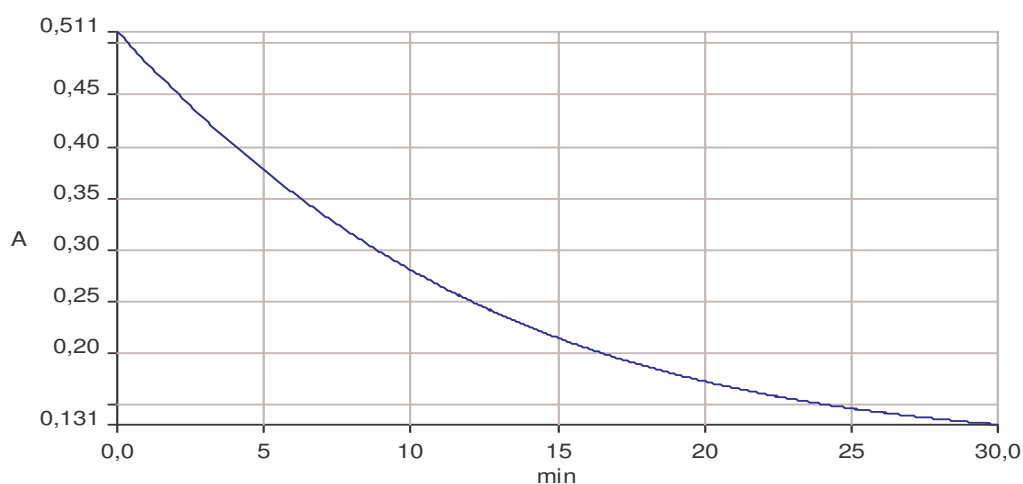


Figura 5.26: Cinetica enzimatica di gemcitabina in presenza di CDA

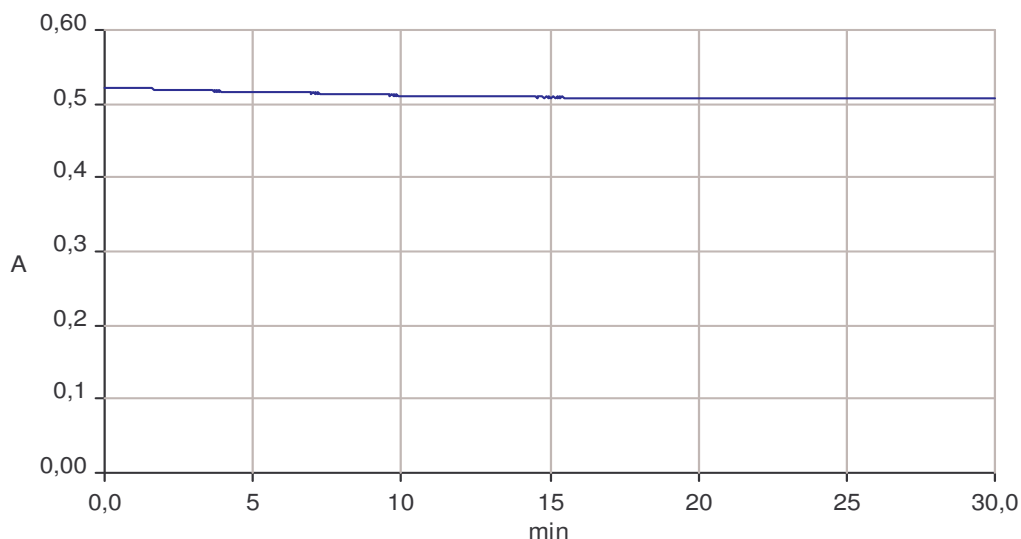


Figura 5.27: Cinetica enzimatica di PEG-dFdC in presenza di CDA

Il saggio è stato anche monitorato con analisi RP-HPLC: nel caso di gemcitabina si notava la progressiva scomparsa del picco del farmaco a 7.8 minuti e la contemporanea comparsa del picco di dFdU a 6.5 minuti, mentre nel caso dei coniugati il picco corrispondente a PEG-dFdC rimaneva pressoché invariato. Il grafico in figura 5.28 rappresenta la percentuale di farmaco presente, che nel tempo di 50 minuti va diminuendo fino a 0% nel caso di gemcitabina libera e solo di circa 10% nel caso dei coniugati. Anche in questo caso il coniugato a struttura ramificata risulta essere il più stabile. (◆ mPEG₅₀₀₀-dFdC, ■ mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, x mPEG₂₀₀₀₀-dFdC, ▲ folato-PEG-dFdC, * folato-PEG-AD-(dFdC)₂, - gemcitabina).

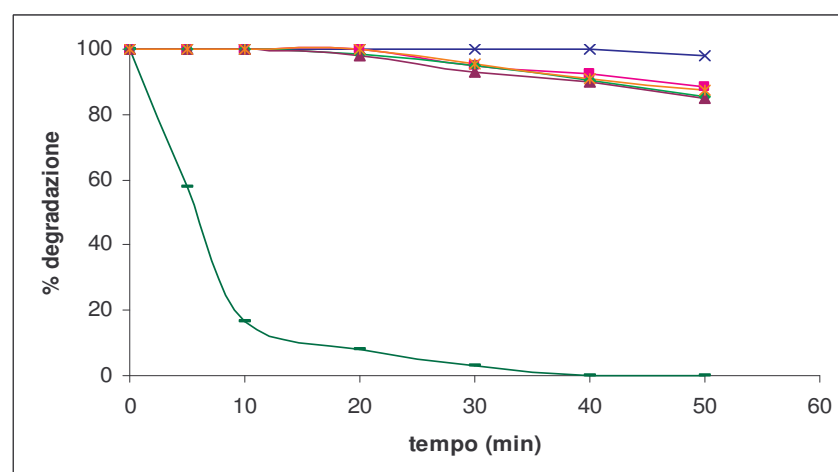


Figura 5.28: Percentuale di gemcitabina libera e coniugata in presenza di CDA

5.3.4 Studi farmacocinetici

Gli studi farmacocinetici sono stati condotti su gruppi di 5 topi femmine, iniettando nella vena caudale una soluzione di gemcitabina o di PEG-dFdc in tampone fisiologico, in modo da avere una dose di farmaco di 10 mg/kg di peso corporeo, ed eseguendo prelievi a livello oculare.

In figura 5.29 sono riportate le curve di concentrazione plasmatica nel tempo di gemcitabina (-) e dei coniugati mPEG₅₀₀₀-dFdc (◆), mPEG₂₀₀₀₀-dFdc (■), mPEG₂₀₀₀₀-dFdc (x) e folato-PEG-AD-(dFdc)₂ (*).

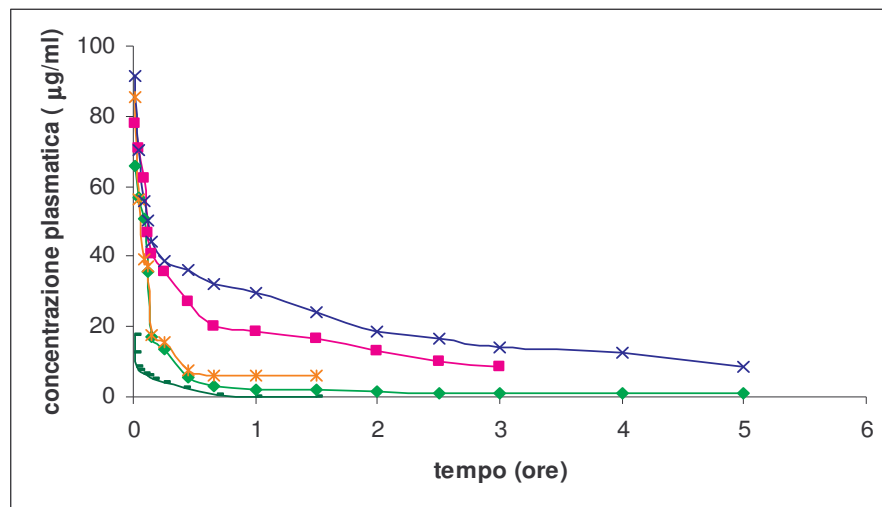


Figura 5.29: Profili farmacocinetici di gemcitabina e coniugati

Le curve farmacocinetiche sono descritte dall'equazione

$$y = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

dove:

A rappresenta la concentrazione plasmatica al t_0 , ottenibile in presenza di sola distribuzione;

B rappresenta la concentrazione plasmatica al t_0 , ottenibile in presenza di sola eliminazione;

(A+B) rappresenta la concentrazione plasmatica al tempo in cui sono presenti sia distribuzione che eliminazione;

t rappresenta il tempo espresso in minuti;

α e **β** rappresentano rispettivamente la pendenza della retta di distribuzione e di eliminazione, ricavate dai profili farmacocinetici espressi come ln della concentrazione nel tempo.

Con questi elementi è possibile calcolare i diversi parametri farmacocinetici.

$t_{1/2 \alpha}$ e $t_{1/2 \beta}$, che rappresentano rispettivamente l'emivita dei processi di distribuzione e di eliminazione, cioè il tempo necessario affinché la concentrazione si riduca della metà rispetto al valore iniziale, si calcolano sulla base della pendenza delle rette di distribuzione ed eliminazione, con le formule

$$t_{1/2 \alpha} = -0.693 / \alpha$$

$$t_{1/2 \beta} = -0.693 / \beta$$

L'area sottesa alla curva di concentrazione *versus* il tempo (AUC) misura la quantità di farmaco immutato che raggiunge la circolazione sistemica dopo somministrazione di una determinata dose e viene espressa come quantità/volume x tempo. Si calcola con la seguente equazione:

$$AUC_{(0 \rightarrow t)} = \int_0^t C(t) dt = \int_0^t C_{(0)E} \cdot e^{-k_E \cdot t} dt = \int_0^t B \cdot e^{\beta t} dt$$

$$AUC_{(t \rightarrow \infty)} = C(t) / k_E = C(t) / -\beta$$

$$AUC_{(0 \rightarrow \infty)} = AUC_{(0 \rightarrow t)} + AUC_{(t \rightarrow \infty)}$$

La *clearance* corporea totale (CI) per una singola dose di farmaco indica il volume di plasma che viene purificato dal farmaco nell'unità di tempo ed è un parametro che risulta utile per descrivere la capacità del paziente di eliminare il farmaco stesso. Si calcola come rapporto fra la dose somministrata e AUC con l'equazione:

$$CI = D / AUC \quad \text{oppure}$$

$$CI = 0.693 V_d / t_{1/2} = k_E \cdot V_d$$

Il volume di distribuzione apparente (V_d), infine, è una costante di proporzionalità che permette di descrivere quale sia la quantità di farmaco presente in tutto il corpo, rispetto alla concentrazione plasmatica. Non ha un significato fisiologico diretto e non rappresenta nemmeno un volume reale, ma è utile per descrivere la distribuzione. Il V_d è alto per un farmaco con una concentrazione tissutale elevata rispetto alla concentrazione plasmatica e viceversa. Si calcola con l'equazione:

$$V_d = D / C_{(0)E} \quad \text{oppure}$$

$$V_d = CI / -\beta = CI / k_E.$$

I principali parametri farmacocinetici per gemcitabina e per i coniugati studiati sono riportati in tabella 5.13.

Composto	$t_{1/2} \alpha$ (min)	$t_{1/2} \beta$ (min)	$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$)	Cl (ml/min)	V_D (ml)
Gemcitabina	0.99	11.23	118.55	2.110	34.20
mPEG ₅₀₀₀ -dFdC	7.13	32.23	382.87	0.654	30.42
mPEG ₂₀₀₀₀ -dFdC	8.94	103.43	1696.65	0.150	22.40
mPEG ₂₂₀₀₀₀ -dFdC	9.99	133.27	6905.41	0.015	5.77
folato-PEG-AD-(dFdC) ₂	5.93	76.15	958.77	0.260	28.60

Tabella 5.13: Principali parametri farmacocinetici

I risultati ottenuti dimostrano che tutti i bioconiugati presentano un tempo di permanenza in circolo maggiore rispetto al farmaco tal quale, con valori di AUC che passano da 118.55 $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ per gemcitabina a 382.87 $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ per il coniugato a PM 5 kDa fino a 6905.41 $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ per il coniugato a struttura ramificata. Anche i valori di $t_{1/2} \alpha$ e $t_{1/2} \beta$ aumentano: si passa da $t_{1/2} \alpha$ di 0.99 minuti e $t_{1/2} \beta$ di 11.23 minuti per gemcitabina, a 7.13 minuti e 32.23 minuti rispettivamente per mPEG₅₀₀₀-dFdC, fino a 9.99 minuti e 133.27 minuti per mPEG₂₂₀₀₀₀-dFdC.

5.3.5 Studi di attività citotossica

Gli studi di attività citotossica sono stati condotti su diverse linee cellulari umane. In particolare i derivati privi di acido folico sono stati testati su cellule HL-60, HeLa, HT-29 e MCF-7; i coniugati con acido folico sono invece stati testati su cellule KB-3-1, cellule caratterizzate dalla sovraespressione dei recettori per l'acido folico.

In tabella 5.14 sono riportati i valori di IC_{50} , ossia la concentrazione di composto in cui si verifica il 50% di morte cellulare rispetto a colture di controllo, di gemcitabina e dei coniugati privi di acido folico nelle 4 linee cellulari testate. I valori sono espressi come concentrazioni μM di farmaco.

Composto	HL-60 IC ₅₀ (µM)	HeLa IC ₅₀ (µM)	HT-29 IC ₅₀ (µM)	MCF-7 IC ₅₀ (µM)
Gemcitabina	0.028±0.001	0.024±0.009	0.084±0.017	0.46±0.21
mPEG ₅₀₀₀ -dFdC	0.085±0.005	0.033±0.004	0.40±0.13	0.66±0.10
mPEG ₂₀₀₀₀ -dFdC	0.067±0.003	0.026±0.007	0.20±0.06	0.58±0.12
mPEG ₂₀₀₀₀ -dFdC	0.092±0.003	0.066±0.017	0.62±0.24	0.73±0.15

n = 4

Tabella 5.14: Valori di IC₅₀ di dFdC e coniugati mPEG-dFdC

In tutte le linee cellulari considerate i coniugati sono risultati meno citotossici di gemcitabina libera, in misura più marcata sulle cellule HL-60 e HT-29, con una differenza di attività di circa 3 volte in cellule HL-60 e di circa 7.5-8 volte in cellule HT-29. La differenza è minima in cellule MCF-7 e HeLa. In tutti i casi il coniugato a struttura ramificata è il meno attivo.

In tabella 5.15 invece sono riportati i valori di IC₅₀, espressi come concentrazione µM sia di farmaco che di coniugato, su cellule KB-3-1 dei coniugati con acido folico, di gemcitabina libera e di un coniugato privo del direzionante usato come confronto.

Composto	KB-3-1 IC ₅₀ (µM dFdC)	KB-3-1 IC ₅₀ (µM PEG)
Gemcitabina	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.02
mPEG ₅₀₀₀ -dFdC	2.01 ± 0.27	2.01 ± 0.27
Folato-PEG-dFdC	1.46 ± 0.18	1.46 ± 0.18
Folato-PEG-AD-(dFdC) ₂	1.13 ± 0.15	0.56 ± 0.15
Folato-PEG-βGlu-(dFdC) ₂	0.99 ± 0.07	0.49 ± 0.07

Tabella 5.15: Valori di IC₅₀ di dFdC e coniugati folato-PEG-dFdC

Anche in questo caso il farmaco libero è più attivo, di circa 3-5 volte, rispetto ai vari coniugati considerati. Confrontando poi i diversi coniugati fra loro, si vede come quelli con acido folico sono più citotossici, con valori di IC₅₀ compresi fra 0.99 µM e 1.46 µM, rispetto al derivato usato come riferimento, avente un IC₅₀ di 2.01 µM. Da notare però il fatto che folato-PEG-AD-(dFdC)₂ e folato-PEG-βGlu-(dFdC)₂ hanno attività praticamente uguale fra loro, con valori di IC₅₀ rispettivamente di 1.13 µM e 0.99 µM, segno che il diverso spaziatore

amminoacidico utilizzato non influenza l'attività citotossica. Molto significativa risulta infine la differenza di attività di questi derivati rispetto al coniugato folato-PEG-dFdC, con una sola molecola di farmaco legata, soprattutto considerando i valori di IC_{50} espressi come concentrazione di coniugato. Questo suggerisce un ruolo molto promettente per le strutture dendrimeriche ad elevato *loading* di farmaco.

5.4 Sintesi e caratterizzazione dei coniugati PEG-epirubicina

5.4.1 Sintesi, purificazione e caratterizzazione di Epi-PEG-COOH (1COOH) e Epi-PEG-DAP-Folato (1FOL)

Per la sintesi dei coniugati PEG-epirubicina è stato impiegato un PEG eterobifunzionale, HO-PEG-COOH, del peso molecolare di 3.5 kDa. Il gruppo ossidrilico del polimero è stato attivato mediante reazione con p-nitrofenil-cloroformiato e il grado di modifica, determinato con idrolisi basica per NaOH 0.2 N, è risultato del 100%.

Successivamente epirubicina è stata coniugata al PEG attraverso la formazione di un legame carbammico fra il gruppo ossidrilico del polimero, derivatizzato con p-nitrofenil-cloroformiato, e il gruppo amminico presente nella porzione zuccherina del farmaco. È stato impiegato un rapporto molare polimero/farmaco di 1:1.2, e il prodotto è stato purificato da epirubicina in eccesso mediante processo di estrazione. La resa finale della reazione è stata dell'85%.

Il prodotto è stato poi caratterizzato mediante analisi RP-HPLC.

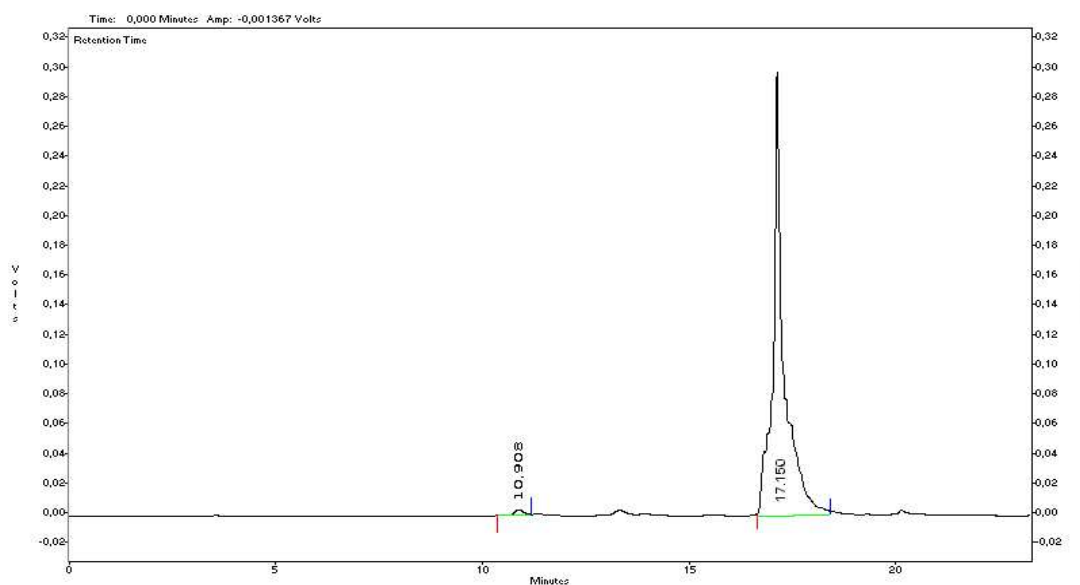


Figura 5.30: Caratterizzazione RP-HPLC di Epi-PEG-COOH

Come si vede dal cromatogramma (figura 5.30), il coniugato Epi-PEG-COOH ha un tempo di ritenzione di 17.1 minuti, nettamente diverso da quello di epirubicina libera, eluita con un t_R di 10.9 minuti. Dall'area del picco di quest'ultima si è potuto risalire alla quantità di farmaco libero presente come impurezza nel coniugato, espresso come percentuale rispetto alla quantità di farmaco totale: è risultato inferiore allo 0.2%.

La quantità di epirubicina coniugata al polimero invece è stata determinata attraverso una reazione di idrolisi acida per HCl 2N selettiva sul legame fra l'aglicone e la porzione zuccherina della molecola di farmaco e successiva quantificazione dell'aglicone liberato, mediante analisi RP-HPLC. In figura 5.31 viene riportato il cromatogramma relativo al prodotto di idrolisi: come si può vedere scompare completamente il picco del coniugato a 17 minuti e compaiono i picchi dell'aglicone, a t_R 13.2 minuti e 13.9 minuti. Dall'area di tali picchi si è risalito alla quantità di epirubicina legata, che è risultata essere del 100%.

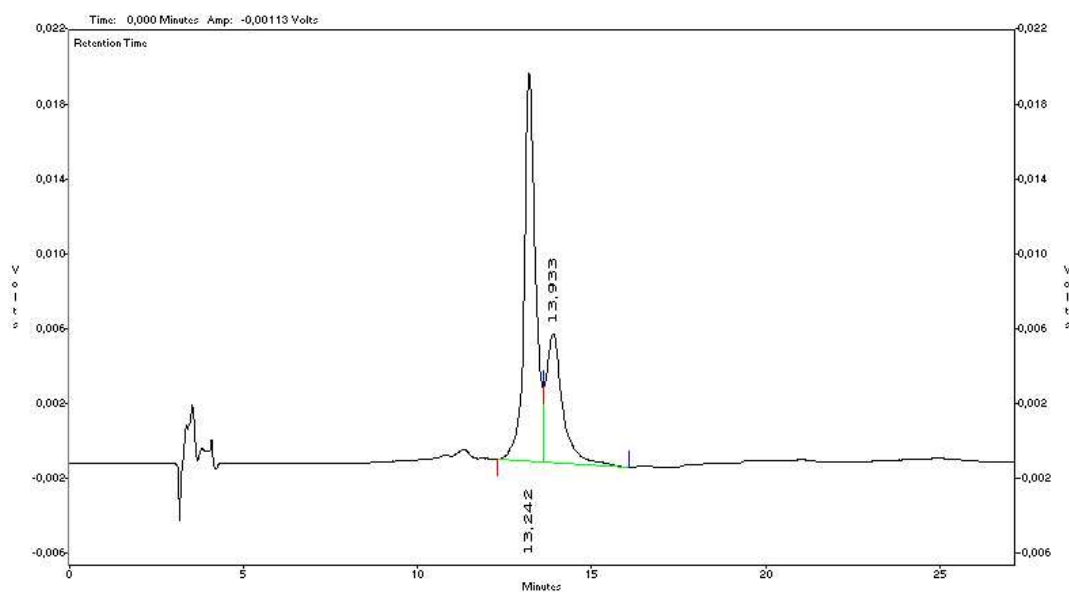


Figura 5.31: Caratterizzazione RP-HPLC del prodotto di idrolisi acida di Epi-PEG-COOH

Il gruppo carbossilico del derivato Epi-PEG-COOH è stato attivato ad estere succinimmidico mediante reazione con DCC e NHS, con una resa di attivazione dell' 83.5%.

Per permettere la coniugazione di acido folico al derivato attivato Epi-PEG-NHS è stato necessario derivatizzare acido folico con lo spaziatore diamminico 1,5-diamminopentano, per ottenere l'intermedio folato-DAP-NH₂, per formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossilico in γ dell'acido folico e il gruppo amminico di 1,5-diamminopentano, in presenza di DCC. La quantità di acido folico legato al DAP, determinata mediante saggio colorimetrico con TNBS, è del 98.5%. Il prodotto, caratterizzato mediante analisi RP-HPLC (figura 5.32), presenta un unico picco a t_R di 9.95 minuti.

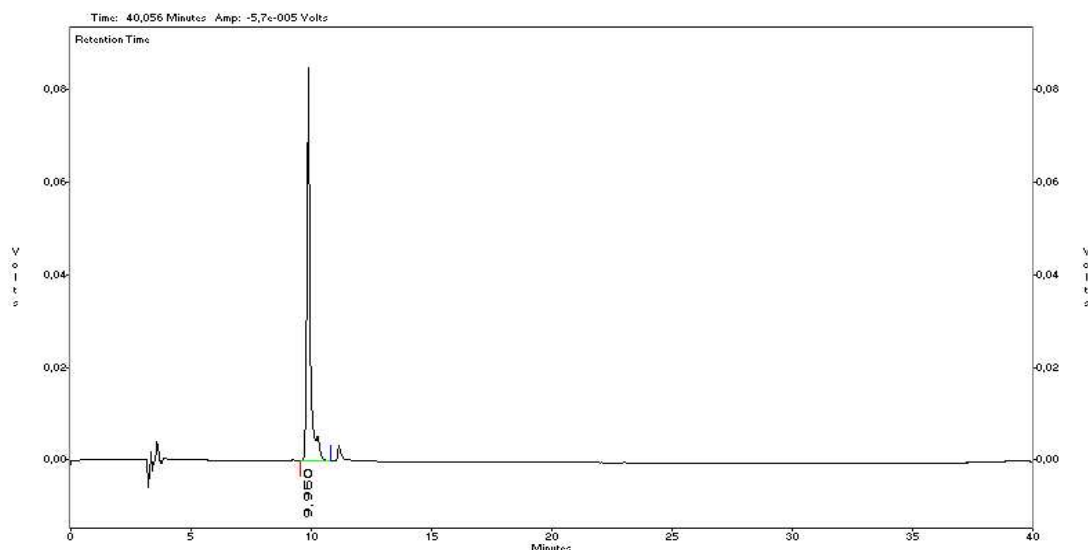


Figura 5.32: Caratterizzazione RP-HPLC del derivato folato-DAP-NH₂

Il derivato è stato anche caratterizzato mediante spettroscopia ¹H-NMR in d₆-DMSO: dallo spettro riportato in figura 5.33 si riconoscono i principali segnali relativi all'acido folico, quali il singoletto a δ 8.60 ppm relativo all'idrogeno in posizione 7 dell'anello pteridinico, il doppietto a δ 4.46 ppm relativo al gruppo CH₂ in posizione 9, i doppietti relativi agli idrogeni della porzione p-amminobenzoica a δ 6.62 ppm e δ 7.62 ppm, i multipletti relativi agli idrogeni in posizione 2'' e 3'' a δ 4.36 ppm e δ 2.20-1.80 ppm, rispettivamente. Sono inoltre riconoscibili i segnali relativi ai gruppi metilenici appartenenti alla molecola di 1,5-diamminopentano fra δ 1.60 ppm e δ 1.10 ppm.

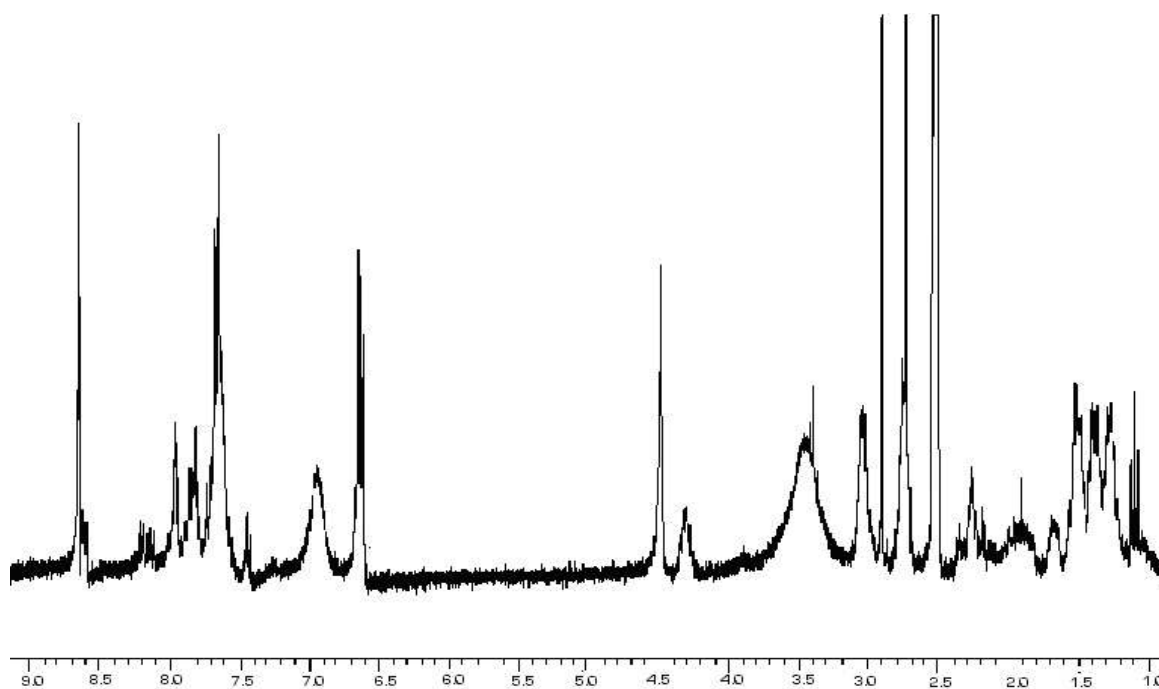


Figura 5.33: Spettro ¹H-NMR di folato-DAP-NH₂ in d₆-DMSO

Il coniugato Epi-PEG-DAP-folato è stato successivamente ottenuto per reazione di Epi-PEG-COOH, attivato ad estere succinimmidico, con il derivato folato-PEG-NH₂, utilizzando un rapporto molare fra i gruppi carbossilici attivati del PEG e i gruppi amminici liberi di folato-DAP-NH₂ di 1:1.5 ed è stato poi purificato dall'eccesso di acido folico mediante estrazione con cloroformio.

Il coniugato Epi-PEG-DAP-folato è stato caratterizzato mediante analisi RP-HPLC, utilizzando le condizioni riportate in tabella 4.3.

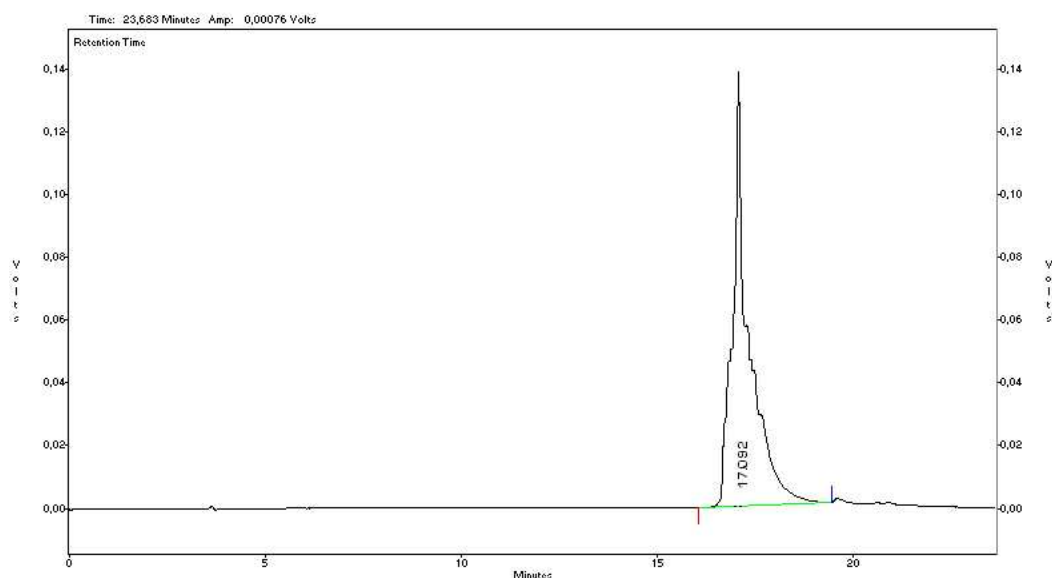


Figura 5.34: Caratterizzazione RP-HPLC del coniugato Epi-PEG-DAP-folato

In figura 5.34 è riportato il cromatogramma di eluizione del coniugato, che presenta un unico picco con tempo di ritenzione t_R di 17.1 minuti. L'assenza del picco di epirubicina (t_R 10.9 minuti) e del picco del derivato folato-DAP-NH₂ (t_R 10 minuti) stanno ad indicare la purezza del coniugato. In seguito ad idrolisi acida in HCl 2N e successiva analisi RP-HPLC è stata calcolata la quantità di epirubicina coniugata, che è stata del 90.4%, espressa come moli di PEG-epi / moli di PEG totale.

È stata eseguita anche una caratterizzazione spettroscopica ¹H-NMR in d₆-DMSO, il cui spettro è riportato in figura 5.36.

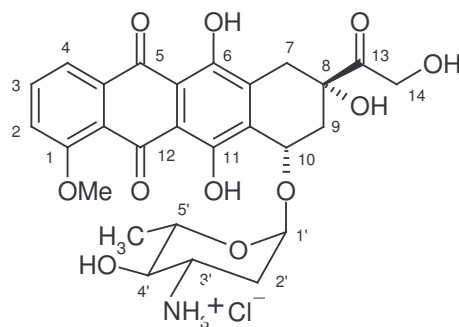


Figura 5.35: Struttura della molecola di epirubicina

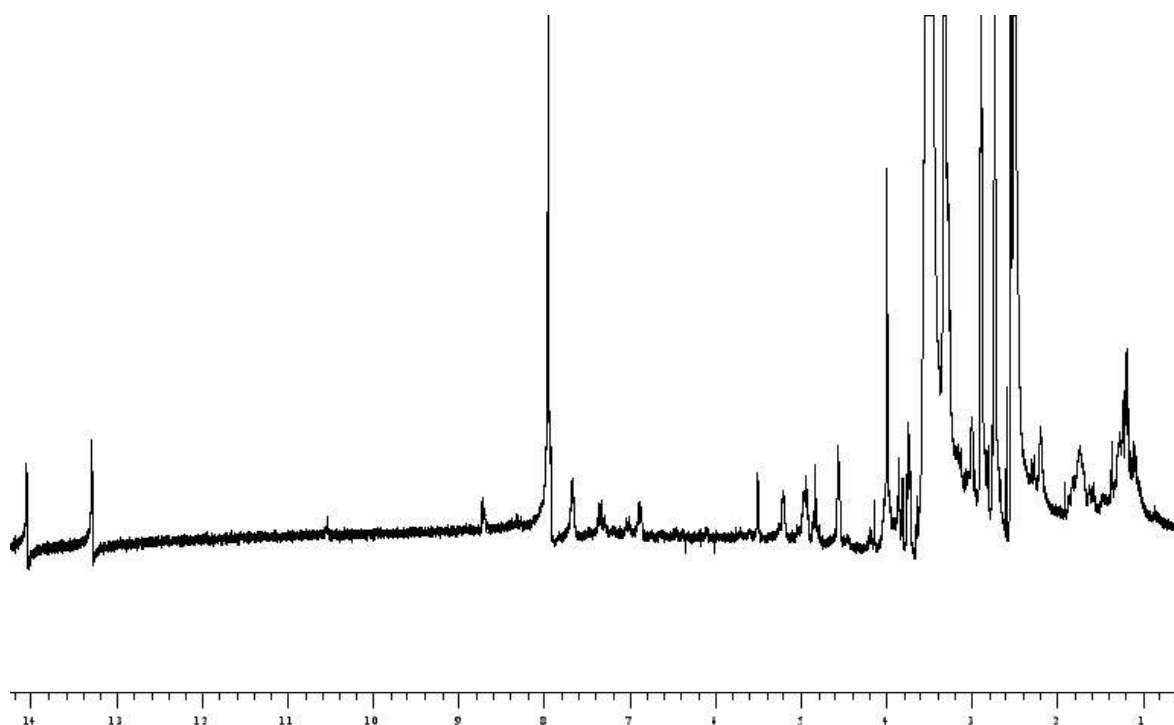


Figura 5.36: spettro $^1\text{H-NMR}$ di Epi-PEG-DAP-folato in $d_6\text{-DMSO}$

Si distinguono chiaramente i segnali relativi alla molecola di epirubicina (figura 5.35), fra cui i singoletti a δ 13.2 ppm e δ 14.1 ppm relativi ai gruppi ossidrilici in posizione 6 e 11 rispettivamente, il doppietto a δ 7.9 ppm relativo agli idrogeni in posizione 2 e 4, a δ 5.3 ppm il segnale relativo all'idrogeno in 1', a δ 4.96 ppm il segnale dell'idrogeno in posizione 10 e a δ 4.86 ppm il segnale degli ossidrili in 8 e in 4'. Sono inoltre presenti i segnali della molecola di acido folico, fra cui i doppietti accoppiati a δ 6.6 ppm e a δ 7.6 ppm appartenenti agli idrogeni della porzione p-amminobenzoica, il singoletto appartenente all'idrogeno in posizione 7 a δ 8.60 ppm e il tripletto a δ 4.6 ppm appartenente agli idrogeni in posizione 9 (vedi tabella 5.11), e i

segnali appartenenti ai gruppi metilenici della porzione diamminica compresi fra δ 1.0 e 1.5 ppm.

5.4.2 Sintesi, purificazione e caratterizzazione di Epi-PEG-AD-(COOH)₂ (2COOH) e Epi-PEG-AD-(DAP-Folato)₂ (2FOL)

La sintesi del coniugato 2COOH Epi-PEG-AD-(COOH)₂ è stato ottenuto per reazione fra il gruppo carbossilico attivato di Epi-PEG-COOH e il gruppo amminico libero dell'acido L-2-amminoadipico (AD), usato come agente ramificante in rapporto molare 3 volte superiore rispetto al PEG.

Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato mediante analisi RP-HPLC: in figura 5.37 è riportato il relativo cromatogramma di eluizione, dove si distingue il picco del coniugato a t_R 17.1 minuti, mentre sono assenti picchi relativi a impurezze di epirubicina o acido folico liberi, a t_R 10.9 minuti e 10 minuti rispettivamente. In seguito ad idrolisi acida per HCl 2N del coniugato e successiva analisi RP-HPLC è stata calcolata la quantità di epirubicina coniugata, che è del 83.5%, espressa come moli di PEG-epi / moli di PEG totale.

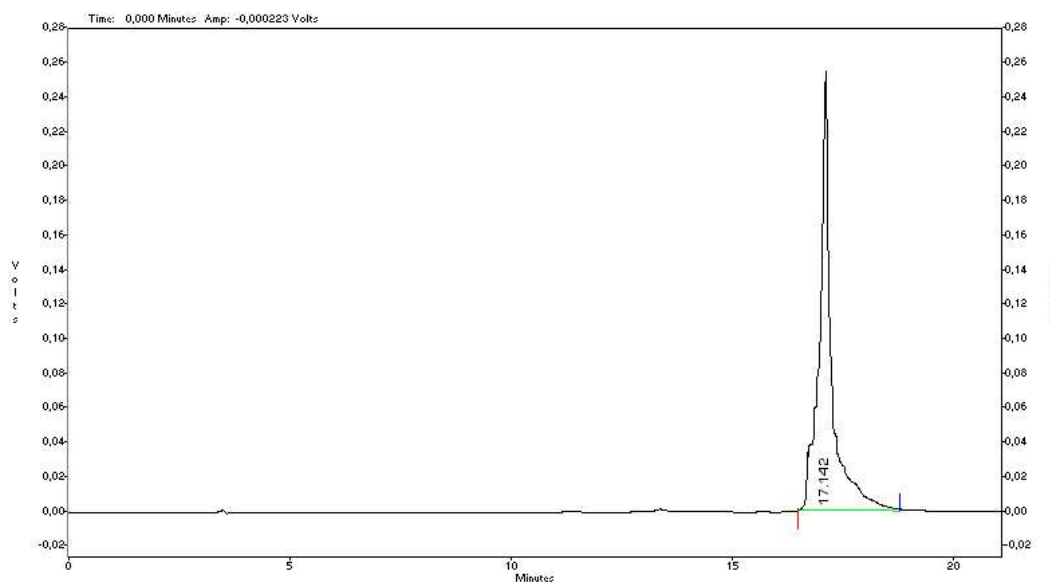


Figura 5.37: Caratterizzazione RP-HPLC di Epi-PEG-AD-(COOH)₂

Il coniugato è stato anche caratterizzato con spettroscopia ¹H-NMR: la presenza dei segnali relativi all'acido amminoadipico conferma l'avvenuta reazione.

I gruppi carbossilici del derivato Epi-PEG-AD-(COOH)₂ sono stati attivati ad estere succinimmidico attraverso reazione con DCC e NHS, con un grado di attivazione del 82.6%.

La formazione di legami ammidici fra i gruppi carbossilici attivati del derivato Epi-PEG-AD-(COOH)₂ e il gruppo amminico libero di folato-DAP-NH₂ ha portato alla sintesi del coniugato 2FOL, Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂. Il prodotto è stato purificato dall'eccesso di acido folico con estrazioni con cloroformio, con una resa complessiva della reazione del 78%.

Il coniugato 2FOL, Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂ è stato caratterizzato mediante analisi RP-HPLC. Dal cromatogramma riportato in figura 5.38 si nota la presenza del picco del coniugato a t_R 17.1 minuti, e l'assenza dei picchi relativi ad epirubicina o acido folico liberi, indice della purezza del coniugato.

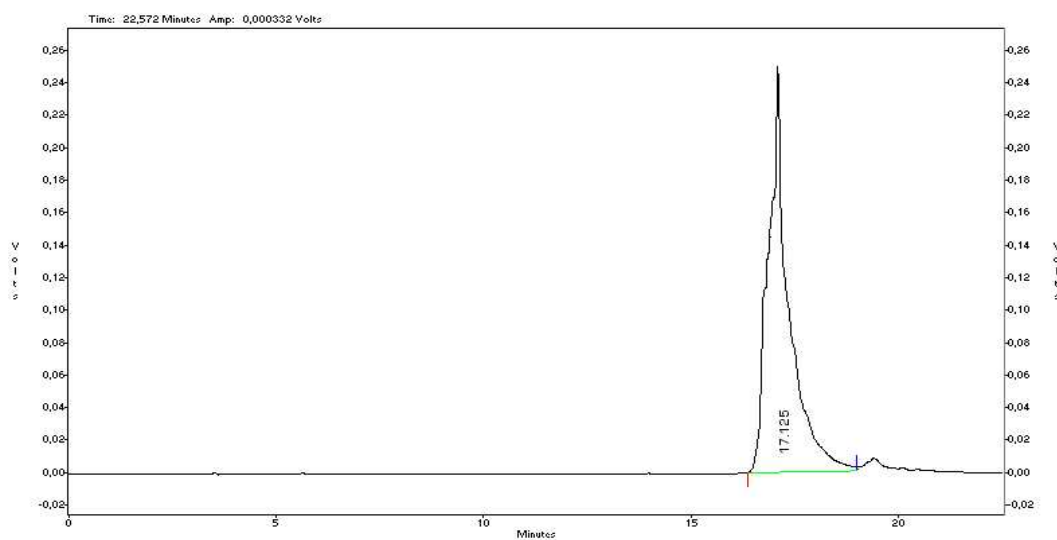


Figura 5.38: Caratterizzazione RP-HPLC del coniugato Epi-PEG-AD-(DAP-folato)₂

In seguito ad idrolisi acida per HCL 2N e successiva analisi RP-HPLC è stata calcolata la quantità di farmaco coniugato, che è del 78.3%, espressa come moli di PEG-epi/ moli di PEG totale.

Il coniugato 2FOL è stato anche caratterizzato con spettroscopia ¹H-NMR in d₆-DMSO: oltre ai principali segnali di epirubicina e di acido folico, già citati nella caratterizzazione del coniugato 1FOL, sono presenti anche i segnali relativi alla molecola di acido aminoadipico.

5.4.3 Sintesi, purificazione e caratterizzazione di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄ (4COOH) e Epi-PEG-AD-AD₂-(DAP-folato)₄ (4FOL)

Dalla reazione del coniugato Epi-PEG-AD-(COOH)₂, attivato ad estere succinimmidico sui gruppi carbossilici, con acido L-2-amminoadipico, si è ottenuto il coniugato 4COOH, Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄, che è stato poi purificato dall'eccesso di amminoacido per estrazione con cloroformio. L'intero processo di reazione ha una resa del 81%.

Il prodotto è stato poi caratterizzato mediante analisi RP-HPLC e spettroscopia ¹H-NMR in d₆-DMSO, confermando l'avvenuta reazione e la purezza del prodotto. In figura 5.39 è riportato il cromatogramma di eluizione del coniugato, che presenta un t_R di 17.1 minuti.

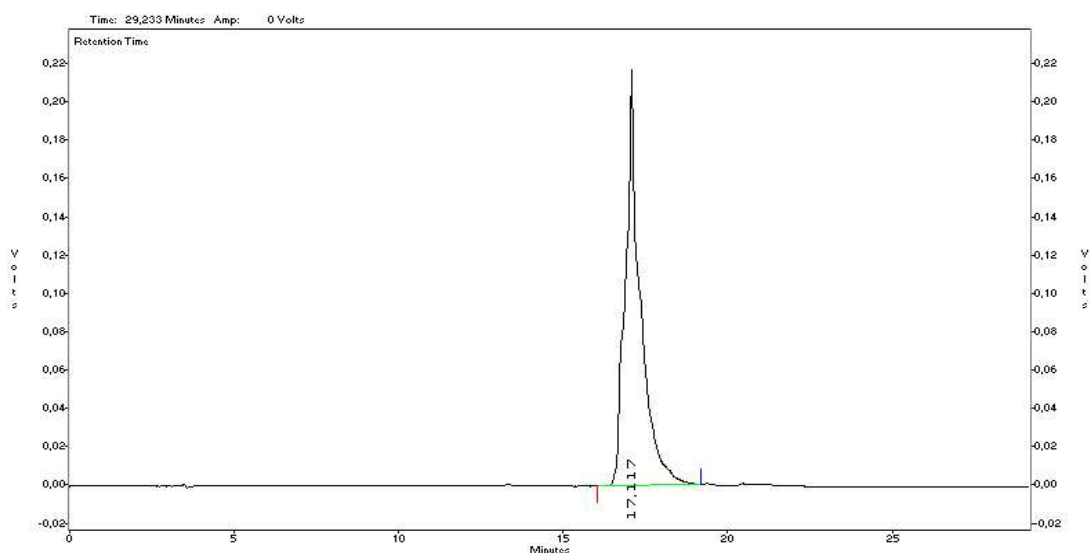


Figura 5.39: Caratterizzazione RP-HPLC di Epi-PEG-AD-AD₂-(COOH)₄

La quantità di epirubicina coniugata, calcolata in seguito ad idrolisi acida per HCl 2N e successiva analisi RP-HPLC è risultata essere del 76.1%, espresso come moli di PEG-epi / moli di PEG totale.

I gruppi carbossilici del coniugato 4COOH sono stati attivati ad estere succinimmidico mediante reazione con DCC e NHS con un grado di attivazione del 85.3%. Per successiva reazione con il gruppo amminico libero di folato-DAP-NH₂, impiegato in eccesso, si è ottenuto il coniugato 4FOL, Epi-PEG-AD-AD₂-(DAP-folato)₄. Il prodotto è stato purificato per estrazione con cloroformio, con una resa complessiva della reazione del 75%.

Il coniugato 4FOL è stato caratterizzato mediante analisi RP-HPLC e mediante spettroscopia ¹H-NMR, confermando l'avvenuta reazione e la purezza del coniugato.

In figura 5.40 è riportato il cromatogramma di eluizione del prodotto, che viene eluito con un tempo di ritenzione di 17.1 minuti. Come si può notare, sono assenti i picchi di epirubicina libera a t_R 10.8 minuti e di acido folico libero a t_R 10 minuti, indice della purezza del coniugato. Dall'analisi cromatografica del prodotto di idrolisi, si è risalito anche alla quantità di epirubicina legata, che è risultata di 70.8%, espressa come moli di PEG-epi / moli di PEG totale.

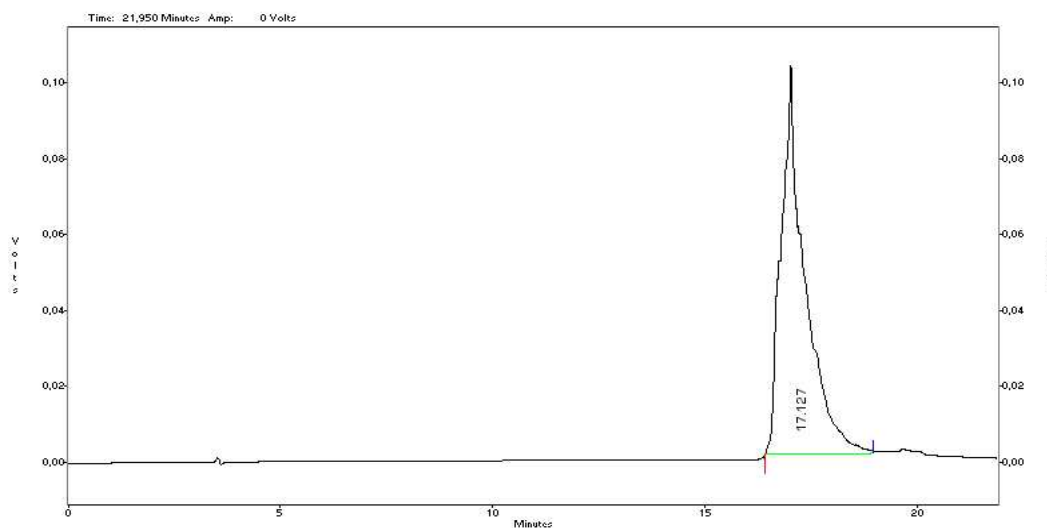


Figura 5.40: Caratterizzazione RP-HPLC di Epi-PEG-AD-AD₂-(DAP-folato)₄

5.5 Studi eseguiti sui coniugati PEG-epirubicina

Tutti gli studi biologici effettuati sui coniugati PEG-epirubicina sono stati condotti su tre linee cellulari tumorali umane: cellule A549, cellule HeLa e cellule KB-3-1. Sono state scelte queste tre linee cellulari per la loro diversa espressione dei recettori per l'acido folico (FR). Infatti secondo quanto riportato da dati di letteratura [157], le cellule A549 sono negative per quanto riguarda l'espressione di tali recettori (FR-), le HeLa sono FR positive mentre le cellule KB-3-1 sono caratterizzate dalla sovraespressione degli stessi (FR++). Per confermare tali dati è stato condotto uno studio di immunofluorescenza sulle 3 diverse linee.

5.5.1 Curve di accrescimento cellulare

Sono state studiate le curve di accrescimento delle tre linee cellulari considerate per determinare la giusta concentrazione alla quale seminare le cellule per gli esperimenti successivi e i tempi di incubazione più adeguati, soprattutto per quanto riguarda gli studi di citotossicità.

Nelle figure 5.41, 5.42 e 5.43 sono riportate le curve di accrescimento rispettivamente di A549, HeLa e KB-3-1. (x 1.0×10^4 cellule/ml; \blacklozenge 1.5×10^4 cellule/ml; \blacksquare 2.0×10^4 cellule/ml; \blacktriangle 2.5×10^4 cellule/ml).

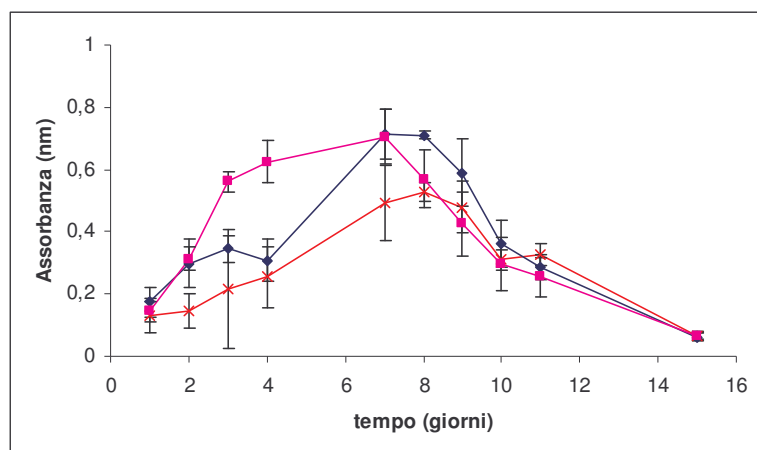


Figura 5.41: Curve di accrescimento di cellule A549

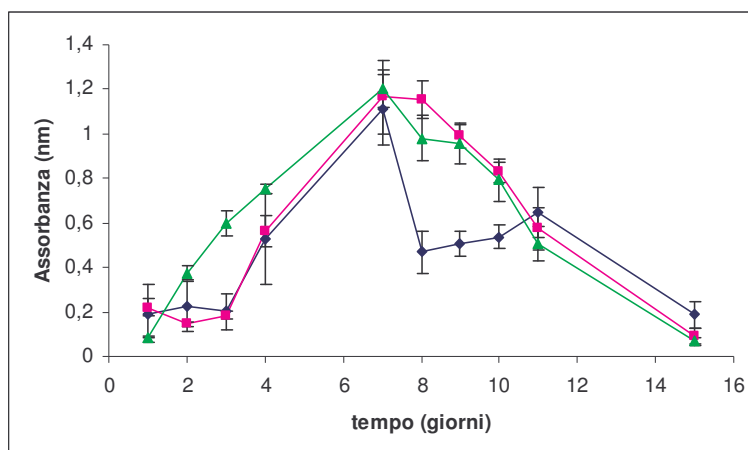


Figura 5.42: Curve di accrescimento di cellule HeLa

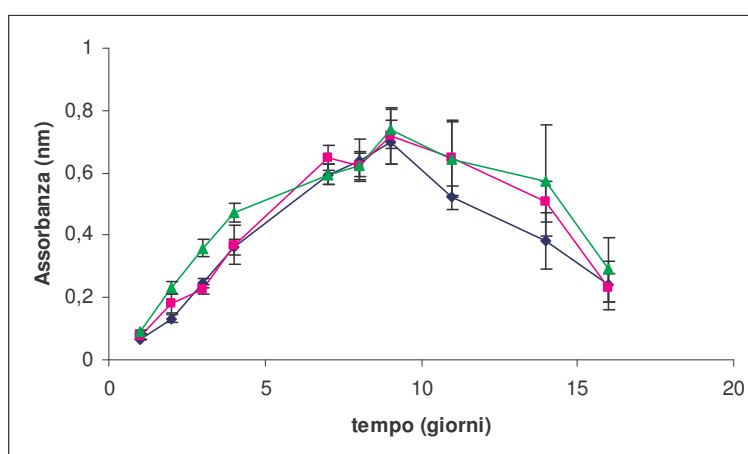


Figura 5.43: Curve di accrescimento di cellule KB-3-1

Studiando le curve di accrescimento ottenute per le varie linee cellulari, si è deciso di utilizzare le concentrazioni di 2.0×10^4 cellule/ml per le A549 e di 2.5×10^4 cellule/ml per le altre 2 linee cellulari per le successive prove di citotossicità.

5.5.2 Valutazione dei recettori per l'acido folico (FR) mediante saggio di immunofluorescenza.

Mediante l'utilizzo di un anticorpo primario monoclonale specifico anti-FR (Mov18) e di un anticorpo secondario coniugato con FITC, sfruttando la tecnica dell'immunofluorescenza è stato possibile determinare l'espressione dei recettori nelle tre diverse linee cellulari considerate.

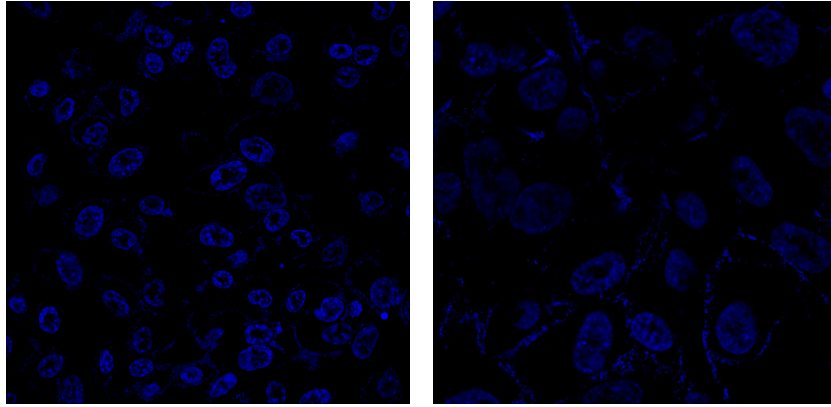


Figura 5.44: Saggio di immunofluorescenza su cellule A549

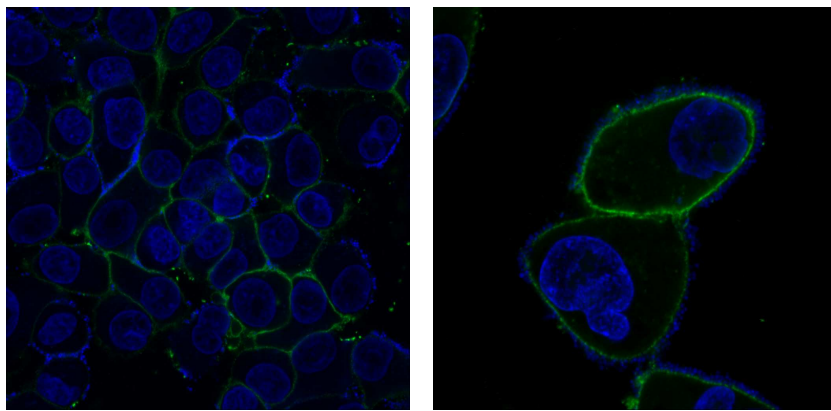


Figura 5.45: Saggio di immunofluorescenza su cellule HeLa

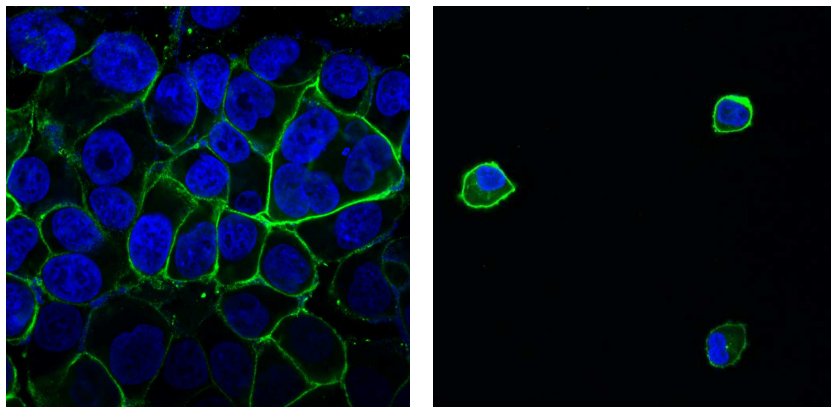


Figura 5.46: Saggio di immunofluorescenza su cellule KB-3-1

Nelle figure 5.44, 5.45 e 5.46 sono riportate rispettivamente le immagini al microscopio confocale di cellule A549, HeLa e KB-3-1, dopo saggio di immunofluorescenza. Come si può vedere, nelle cellule A549 non è presente alcun segnale di fluorescenza dato dalla FITC

coniugata all'anticorpo, indice questo della completa assenza dei recettori FR, ma solo il segnale dato dal DAPI, il colorante utilizzato per marcare i nuclei delle cellule. Nelle cellule HeLa invece si registra un debole segnale di fluorescenza anche nel verde, indicando quindi la presenza in numero limitato dei recettori, fluorescenza che invece diventa ben visibile e marcata nelle cellule KB-3-1, in corrispondenza della membrana plasmatica, confermando la sovraespressione di FR in questa linea cellulare.

5.5.3 Studi di attività citotossica

L'attività citotossica dei coniugati e di epirubicina è stata testata sulle 3 linee cellulari, A549, HeLa e KB-3-1. I dati, espressi con IC_{50} , ossia la concentrazione di farmaco (μM) che inibisce la crescita cellulare del 50% rispetto a colture di controllo, sono riportati in tabella 5.16.

Composto	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
	A549	HeLa	KB-3-1
Epirubicina	0,53±0,03	0,48±0,06	0,49±0,06
Coniugato 1FOL	370±3,6	325±4,1	78±2,2
Coniugato 2FOL	355±0,04	345±3,9	92±2,7
Coniugato 4FOL	400±6,2	398±2,7	185±3,1
Coniugato 1COOH	8±1,6	12±1,1	12±1,2
Coniugato 2COOH	43±2,2	43±1,9	35±1,7
Coniugato 4COOH	182±7,6	170±2,5	175±2,3

Tabella 5.16: Valori di IC_{50} di epirubicina e coniugati su cellule A549, HeLa e KB-3-1

Come si può vedere dai valori di IC_{50} riportati, in tutte 3 le linee cellulari il farmaco libero è notevolmente più attivo di tutti i coniugati considerati, con valori di IC_{50} di circa 0.5 μM , senza notevoli differenze fra le diverse linee. I coniugati 1COOH, 2COOH e 4COOH, privi di acido folico, sono più attivi rispetto ai coniugati con il direzionante, ma l'attività di ciascuno nelle tre diverse linee cellulari è comparabile. Invece l'attività citotossica dei coniugati 1FOL, 2FOL e 4FOL, aventi rispettivamente 1, 2 e 4 molecole di acido folico per catena di PEG, pur

essendo inferiore rispetto a quella degli altri coniugati, aumenta passando da cellule FR- a cellule FR+ fino ad un massimo su cellule FR++, indicando perciò un reale effetto di *targeting* della molecola di acido folico. Confrontando poi i coniugati 1FOL, 2FOL e 4FOL tra di loro, non si riscontra invece una corrispondenza diretta fra il numero di molecole di acido folico presenti per catena di PEG e l'attività citotossica. Questi risultati possono essere interpretati ipotizzando un effetto di ingombro sterico o conformazionale dei vari coniugati.

5.5.4 Studi di *uptake* cellulare mediante citofluorimetria di flusso

Il grado di internalizzazione cellulare dei diversi coniugati è stato valutato mediante analisi di citofluorimetria di flusso, sfruttando le caratteristiche di fluorescenza della molecola di epirubicina. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C, per studiare l'*uptake* cellulare, e a 4°C, per valutare la presenza di processi non ATP-dipendenti o eventuali interazioni fra i coniugati e la membrana plasmatica.

Nelle figure 5.47, 5.48 e 5.49 sono riportati rispettivamente i grafici relativi all'*uptake* cellulare a 37°C su cellule A549, HeLa e KB-3-1. (▲ coniugato 1FOL, ◆ coniugato 2FOL, ■ coniugato 4FOL, ● coniugato 1COOH, x coniugato 2COOH, * coniugato 4COOH)

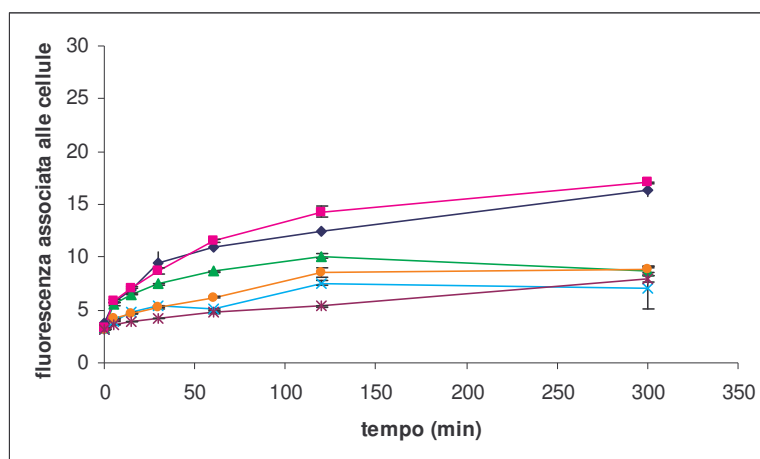


Figura 5.47: Citofluorimetria di flusso a 37°C su cellule A549

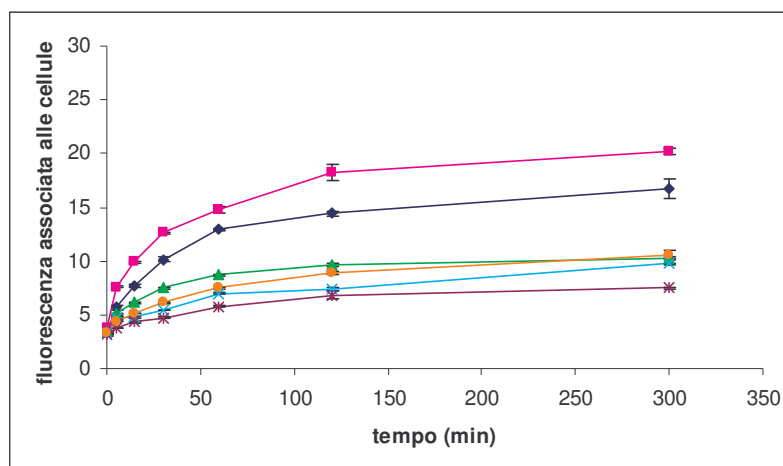


Figura 5.48: Citofluorimetria di flusso a 37°C su cellule HeLa

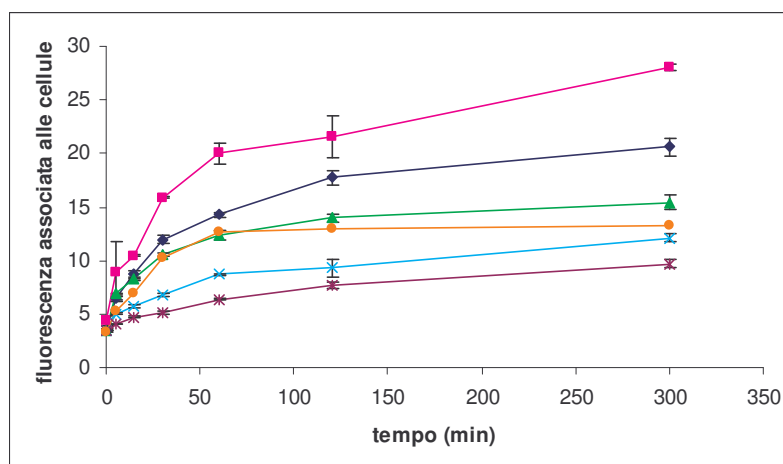


Figura 5.49: Citofluorimetria di flusso a 37°C su cellule KB-3-1

Gli esperimenti di citofluorimetria condotti a 37°C dimostrano che esiste una relazione fra il grado di internalizzazione dei coniugati e la presenza e il numero di molecole di acido folico presenti per catena di polimero. Infatti dai grafici si vede chiaramente come coniugati aventi la molecola direzionante vengano internalizzati in misura maggiore dalle cellule rispetto ai coniugati privi di acido folico. Inoltre il coniugato 4FOL, con 4 molecole di acido folico per catena di PEG, ha un *uptake* maggiore rispetto al coniugato 2FOL, che a sua volta viene internalizzato in misura maggiore rispetto al coniugato 1FOL, avente una sola molecola di acido folico. Si nota inoltre una sostanziale differenza anche fra le 3 diverse linee cellulari: nelle A549, prive del recettore per l'acido folico, i coniugati entrano in misura minore rispetto alle cellule HeLa, positive per l'espressione del recettore, e ancor più rispetto alle KB-3-1, con sovraespressione di FR. Considerando invece i coniugati privi di acido folico, si vede che il

coniugato 1COOH, con 1 gruppo carbossilico libero, entra nelle cellule in misura maggiore rispetto al coniugato 2COOH, che a sua volta ha un *uptake* maggiore rispetto al 4COOH. Questo può trovare una spiegazione nell'ipotesi che il maggior numero di gruppi carbossilici liberi generi interazioni di carica con la membrana plasmatica della cellula, con effetto repulsivo, limitando quindi l'internalizzazione del coniugato.

Gli esperimenti sono stati anche condotti a 4°C e i grafici, relativi a A549, HeLa e KB-3-1 rispettivamente, sono riportati nelle figure 5.50, 5.51 e 5.52. (▲ coniugato 1FOL, ◆ coniugato 2FOL, ■ coniugato 4FOL, ● coniugato 1COOH, x coniugato 2COOH, * coniugato 4COOH)

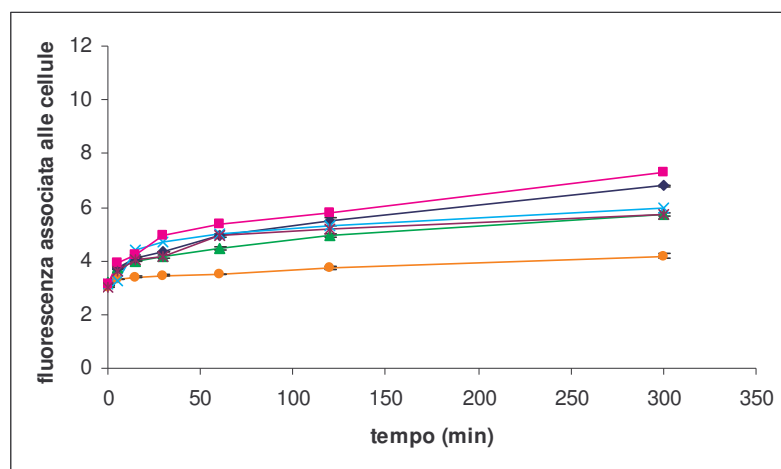


Figura 5.50: Citofluorimetria di flusso a 4°C su cellule A549

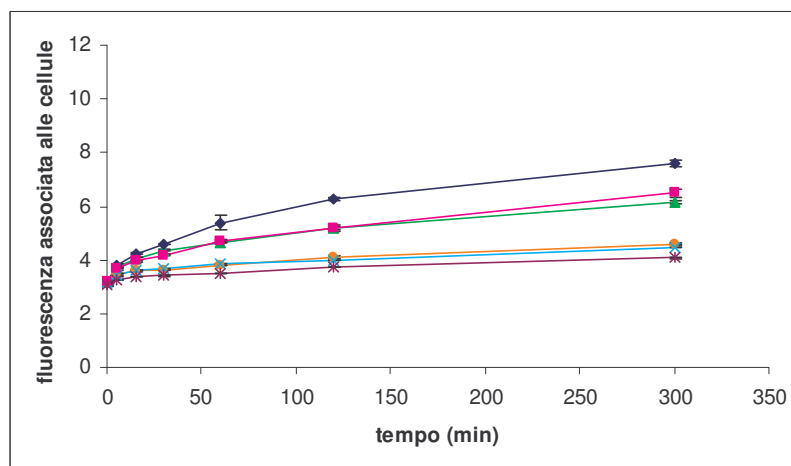


Figura 5.51: Citofluorimetria di flusso a 4°C su cellule HeLa

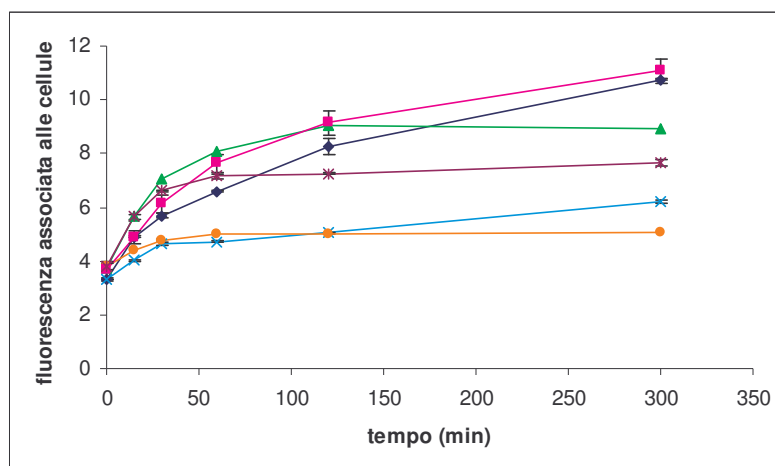


Figura 5.52: Citofluorimetria di flusso a 4°C su cellule KB-3-1

Negli esperimenti di citofluorimetria condotti a 4°C l'internalizzazione di tutti i coniugati è ridotta al minimo, in tutte le 3 linee cellulari, con solo lievi differenze fra l'una e l'altra. Anche fra i diversi coniugati le differenze di fluorescenza associata alle cellule registrate sono minime. Si può affermare dunque che l'*uptake* dei coniugati avviene con un meccanismo ATP-dipendente, poiché quando tutti i processi ATP-dipendenti sono bloccati, come nel caso delle prove a basse temperature, i coniugati non entrano nelle cellule. Il lieve aumento di fluorescenza registrato è dovuto solo a interazioni dei coniugati con la membrana plasmatica delle cellule.

5.5.5 Studi di localizzazione cellulare mediante microscopia confocale

Attraverso studi di microscopia confocale è stato possibile studiare la localizzazione dei coniugati all'interno della cellula.

Nelle figure seguenti vengono comparate le immagini relative agli esperimenti con il coniugato 2FOL e il coniugato 2COOH, dopo 1 ora di contatto e 1 ora di *chase* nelle diverse linee cellulari.

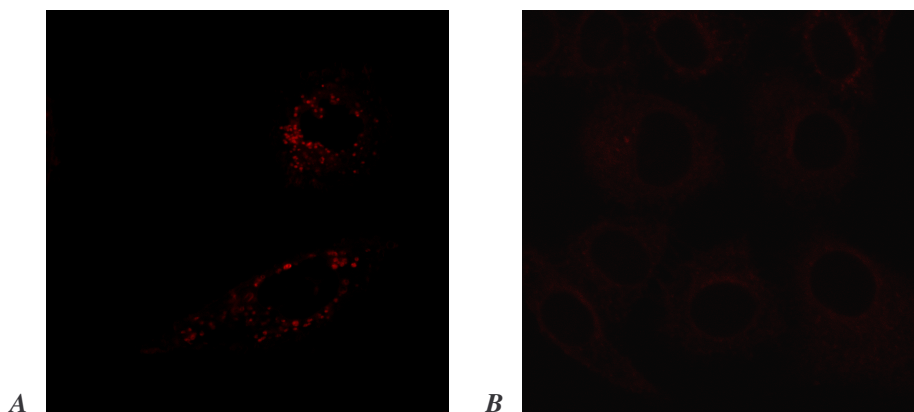


Figura 5.53: Cellule A549 trattate per 1 ora con il coniugato 2FOL (A) e con il coniugato 2COOH (B)

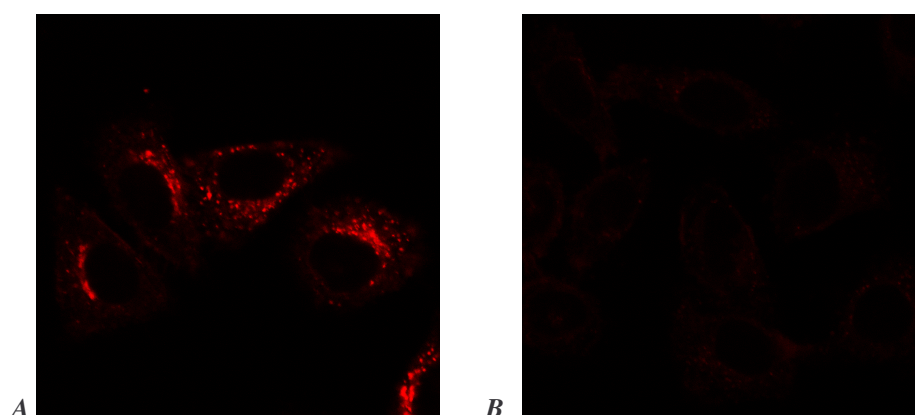


Figura 5.54: Cellule HeLa trattate per 1 ora con il coniugato 2FOL (A) e con il coniugato 2COOH (B)

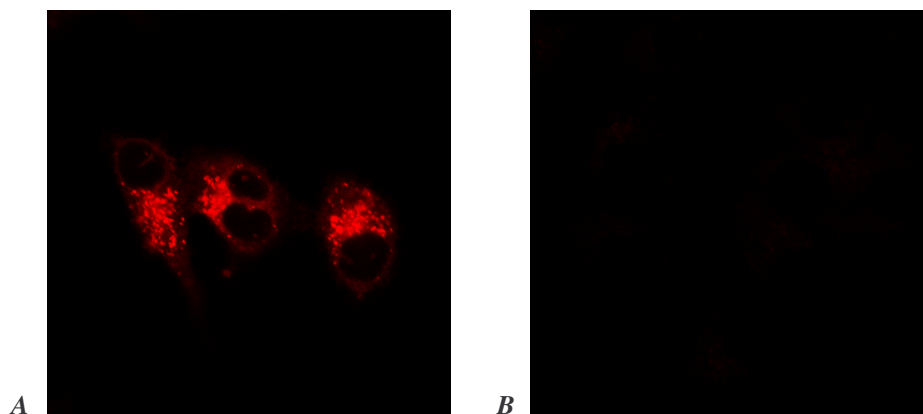


Figura 5.55: Cellule KB-3-1 trattate per 1 ora con il coniugato 2FOL (A) e il coniugato 2COOH (B)

Il coniugato privo di acido folico è praticamente assente all'interno delle cellule; anche dopo 5 ore di trattamento il segnale di fluorescenza registrato è molto debole, indicando un'internalizzazione minima del coniugato. Lo stesso comportamento si verifica anche per gli altri coniugati privi della molecola direzionante. Con il coniugato 2FOL invece, la fluorescenza all'interno delle cellule va aumentando passando da cellule FR- a cellule FR+ a cellule FR++.

Considerando poi i coniugati aventi l'acido folico, mentre nelle cellule A549 la fluorescenza all'interno delle cellule è comparabile passando dal coniugato 1FOL al coniugato 4FOL, nelle cellule HeLa e ancor più nelle KB-3-1, si verifica un aumento della fluorescenza passando dal coniugato con 1 molecola di acido folico a quello con 4, confermando quindi quanto visto con gli esperimenti di citofluorimetria. Da notare che la fluorescenza all'interno delle cellule presenta un aspetto puntiforme ed è localizzata in una zona ben precisa della cellula, al lato del nucleo, presumibilmente coincidente con il reticolo endoplasmatico. Questo è indice del fatto che il coniugato è presente in vescicole e non diffuso nell'intero compartimento citoplasmatico e indirettamente che la fluorescenza è data da epirubicina coniugata e non da farmaco libero, che sarebbe presente in tutto il citoplasma.

È curioso notare come generalmente si registri un'intensità di fluorescenza maggiore dopo 1 o 2 ore di trattamento che non dopo 5 ore. Questo potrebbe essere dovuto o ad un fenomeno di *quencing*, dovuto ad un eccessivo accumulo di farmaco all'interno della cellula, o ad un fenomeno di contemporanea esocitosi. Per verificare quest'ultimo aspetto, sono state condotte delle prove di misura di fluorescenza del mezzo di coltura a precisi intervalli di tempo dopo 1 ora di trattamento. In figura 5.56 è riportato il grafico relativo all'analisi con il coniugato 2FOL su cellule HeLa: come si può vedere, la concentrazione di coniugato rimane pressoché invariata, indicando che il fenomeno di esocitosi è praticamente assente.

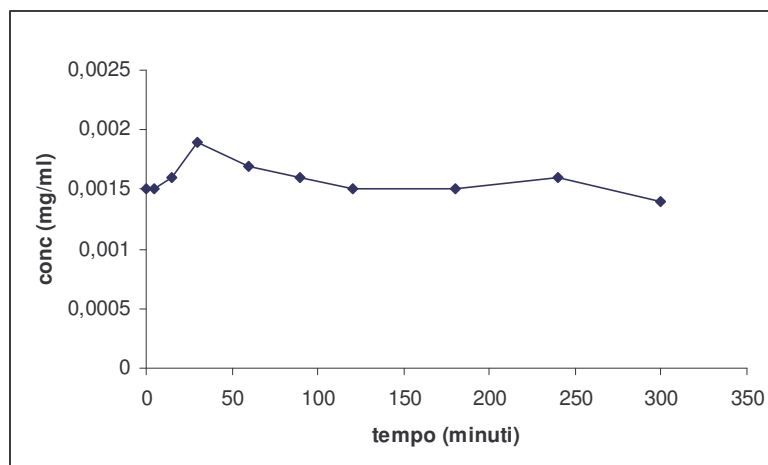


Figura 5.56: Esocitosi del coniugato 2FOL da cellule HeLa dopo 1 ora di trattamento

6. Discussione

Il *targeting* di farmaci verso i tumori solidi mediante effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) sta avendo notevole successo per veicolare sia molecole biologicamente attive ad elevato peso molecolare, quale ad esempio l'enzima D-amminoacido ossidasi per la produzione intratumorale di acqua ossigenata [155], che di farmaci a basso peso molecolare ma macromolecolarizzati attraverso coniugazione con polimeri. Grazie ai notevoli progressi in campo biologico sono stati identificati diversi specifici marker o recettori sovraespressi sulla superficie cellulare di certe linee tumorali, permettendo così lo sviluppo di approcci di *targeting* attivo per una terapia ancor più mirata.

Un passo ulteriore nel campo del *drug delivery* è pertanto quello di combinare le due strategie, effetto EPR e direzionamento attivo, come proposto in questo lavoro di tesi. Per la bioconiugazione polimerica sono stati studiati vari polimeri e fra questi uno dei più versatili è il poli-(etilenglicole) che è da tempo oggetto di approfonditi studi nel laboratorio dove ho condotto il lavoro di ricerca. Questo polimero infatti è disponibile in un vasto range di pesi molecolari, permettendo quindi la scelta della specie migliore per sfruttare l'effetto EPR; presenta ridotta polidispersività e, cosa più importante, una struttura chimica tale da poter legare specificatamente e con precisa stechiometria sia un farmaco che un agente direzionante verso specifici marker tumorali.

L'impiego del PEG presenta però un limite: a differenza di altri polimeri polifunzionali, quali poli-idrossietil-acrilati o poli-idrossietil-aspartammide o polisaccaridi, il PEG presenta uno solo o due gruppi funzionali idrossilici cui legare il farmaco, il che limita notevolmente il rapporto farmaco:polimero e quindi rende necessaria la somministrazione di molto composto per raggiungere l'effetto terapeutico. Questo rapporto poi si riduce ulteriormente quando uno dei due gruppi idrossilici venga impiegato per legare l'agente direzionante. Un miglioramento sostanziale nel *loading* è stato però ottenuto coniugando, attraverso opportune strutture dendrimeriche, più molecole di farmaco alla stessa catena. Strutture dendrimeriche possono inoltre rivelarsi vantaggiose per migliorare la direzionabilità, in quanto è noto che l'endocitosi via recettore è in molti casi indotta e favorita dalla contemporanea interazione del costrutto polimerico con più unità del marker tumorale.

Per la formazione dei sopraccitati addotti è stato necessario sviluppare una opportuna strategia di sintesi chimica. Il nostro gruppo di lavoro aveva sintetizzato in precedenza derivati simili sia monofunzionali che polifunzionali di PEG con legato il solo il farmaco, ad esempio araC (avente struttura molto simile a gemcitabina) [156], o doxorubicina. Non erano invece stati riportati esempi con due diverse molecole, direzionante e farmaco, legate contemporaneamente ai due estremi del polimero. A questo scopo sono stati impiegati come strutture di base da cui partire nella sintesi, PEG eterobifunzionali reperiti in commercio, ma il loro utilizzo ha richiesto strategie originali. Un passaggio che ha lasciato dei problemi aperti è stato ad esempio la coniugazione di acido folico, per la presenza dei due gruppi carbossilici (α e γ) con reattività non molto differente.

Per la caratterizzazione dei coniugati è stata molto utile la spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, che ha permesso in molti casi di risalire alla stechiometria precisa, grazie agli shift chimici differenti per i diversi componenti il complesso. L'analisi via RP-HPLC dei coniugati ha permesso di determinare il contenuto di farmaco libero, eventualmente presente come impurezza, e, previa reazione di idrolisi, la quantità di farmaco coniugato. È stata inoltre effettuata la determinazione della velocità di rilascio del farmaco in seguito a incubazione in tampone fisiologico ed in plasma.

La determinazione della cinetica di rilascio a diverso pH, condotta nei coniugati PEG-gemcitabina, ha mostrato che la velocità di idrolisi in soluzione tampone non è molto diversa tra i composti con diverso peso molecolare di polimero, ad esclusione del prodotto con PEG ramificato e di folato-PEG-AD-(dFdC)₂, ma è invece pH-dipendente. Nel plasma la velocità di rilascio, anche se è aumentata, rimane comunque sufficientemente bassa, con un $t_{1/2}$ di circa 48 ore, per garantire l'accumulo del coniugato nel tumore per effetto EPR. Tale effetto è probabilmente da ascrivere alla presenza di componenti plasmatiche che rendono meno stabili i coniugati. È interessante notare la maggiore stabilità di mPEG₂₀₀₀₀-dFdC e di folato-PEG-AD-(dFdC)₂, probabilmente dovuto alla presenza del residuo amminoacidico fra farmaco e polimero che modifica la stabilità del legame. Positivo poi è il fatto che la stabilità all'idrolisi non cambia in presenza di folato e pertanto tutti i composti mantengono i requisiti richiesti per il direzionamento.

Si è anche voluto verificare la stabilità dei coniugati in presenza dell'enzima citidin-deaminasi, che come noto trasforma gemcitabina nel derivato inattivo difluoro-deossi-uridina. La coniugazione di PEG al gruppo amminico in posizione 4 dell'anello pirimidinico di gemcitabina stabilizza completamente i prodotti, in analogia a quanto già trovato nei coniugati PEG-AraC [156].

Da notare infine che, come atteso, la permanenza in circolo valutata in topi cambia con la massa del polimero ed è quindi possibile scegliere il peso molecolare di PEG più opportuno per sfruttare l'effetto EPR.

L'influenza del peso molecolare e dell'ingombro del polimero sulla citotossicità è stata studiata in più linee cellulari. Innanzitutto si è osservato una riduzione di attività rispetto al farmaco libero, in quanto i composti seguono una differente via di penetrazione: endocitosi, più lenta e dipendente da energia, anziché semplice diffusione. Tra i derivati non targettati ha un ruolo importante la struttura del coniugato: i coniugati lineari mostrano infatti un'attività maggiore, in grado diverso a seconda delle linee cellulari considerate, rispetto al coniugato ramificato, facendo ipotizzare un contributo di ingombro sterico nella riduzione dell'attività citotossica.

Si è potuto studiare l'influenza del direzionante solo nel caso di bassi pesi molecolari di PEG (5000 Da) perché soltanto per questi era reperibile la forma eterobifunzionale da cui partire per la sintesi. Nelle cellule con sovraespressi i recettori per l'acido folico il farmaco libero presenta comunque una attività maggiore di quella dei derivati portanti il folato. Se si considera invece l'attività tra i coniugati, quelli con il direzionante sono più attivi di quelli senza. Tra questi vantaggioso appare il derivato portante due molecole di farmaco in quanto, per unità di peso di coniugato e quindi potenzialmente di polimero somministrato, l'attività citotossica è significativamente maggiore, tanto da avvicinarsi a quella del farmaco libero. La forma ramificata appare pertanto molto promettente per una applicazione terapeutica dove si voglia sfruttare anche l'effetto EPR.

Per una maggiore comprensione del ruolo dei direzionanti nella terapia antitumorale, si è preso in esame anche un secondo farmaco ad attività citotossica, epirubicina. Analogamente a quanto fatto con gemcitabina, sono stati preparati derivati con e senza direzionante. In questo caso sono state preparate strutture dendrimeriche per permettere un maggiore *loading* di molecola target e studiare in questo modo il contributo del diverso numero di molecole per catena polimerica. Il notevole interesse terapeutico di epirubicina e le ampie conoscenze per quanto concerne il comportamento verso le cellule del suo analogo doxorubicina, ha stimolato in questo caso ad intraprendere uno studio più approfondito del *targeting* e *trafficking* intracellulare, prendendo in esame linee cellulari con diversa espressione dei recettori (FR-, FR+ e FR++).

Lo studio dell'internalizzazione dei composti a 37°C ed a 4°C ha permesso innanzitutto di dimostrare che i coniugati entrano nella cellula grazie ad un meccanismo di endocitosi dipendente da energia e non per semplice diffusione.

Misure fluorimetriche mediante microscopia confocale hanno dimostrato poi che una volta penetrati nella cellula questi non diffondono nel citoplasma omogeneamente ma rimangono localizzati nella regione perinucleare. La quantità di farmaco presente, determinata sempre per via fluorimetrica, cresce nel tempo per poi diminuire. Due potrebbero essere le spiegazioni di questo comportamento: un effetto *quencing* o la contemporanea esocitosi del coniugato. Questo secondo fatto è stato escluso poiché non è stata riscontrata la presenza di farmaco nel liquido di coltura dopo trattamento.

Il direzionante fa aumentare l'internalizzazione rispetto agli stessi coniugati privi della molecola target, dimostrando anche in questo studio il ruolo positivo dell'acido folico. Un'ulteriore conferma deriva dal fatto che l'aumento delle molecole di folato per unità di polimero porta ad un maggiore *uptake*. In accordo con ciò è il fatto che linee cellulari con diversa espressione di recettori presentano diverso grado di internalizzazione.

Il ruolo specifico dell'acido folico nell'internalizzazione via recettoriale è ancora confermato nei coniugati privi di questa molecola in cui quindi rimangono liberi i gruppi leganti carbossilici. In questo caso infatti l'*uptake* è stato minore. Interessante inoltre notare che i composti dendrimerici con più carbossili liberi sono quelli con minor internalizzazione. Questo fatto può essere ascritto alla maggiore repulsione esercitata dalla superficie carica negativamente delle cellule.

È stato invece inaspettato osservare che la citotossicità non è in accordo con i dati di *uptake* cellulare dei coniugati. I composti più attivi sono infatti quelli con minor numero di molecole di acido folico, i quali a loro volta sono meno attivi di quelli privi del direzionante. Questo comportamento vale per le diverse linee cellulari. Quanto osservato però non fa escludere il ruolo del folato per il *targeting*, in quanto i derivati senza acido folico, pur essendo più attivi degli altri, hanno attività comparabile nelle diverse linee cellulari considerate, mentre invece la citotossicità dei coniugati con direzionante va aumentando passando da cellule prive dei recettori a cellule con sovraespressione degli stessi.

Queste osservazioni, prese nel loro insieme, fanno pensare che siano operanti od abbiano qualche ruolo altri aspetti, quali ad esempio aggregazioni delle molecole o fattori sterici o idrofobici che possono condizionare il rilascio del farmaco dal coniugato penetrato nella cellula.

7. Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato possibile preparare diversi coniugati a base PEG dei farmaci gemcitabina ed epirubicina, attraverso vie di sintesi dimostrate efficaci e vantaggiose.

Utilizzando un *carrier* opportuno è stato possibile preparare coniugati potenzialmente direzionabili al tessuto tumorale sia per effetto EPR, grazie all'elevato peso molecolare dei coniugati risultanti, sia per meccanismo di *targeting* attivo, grazie all'impiego di una molecola direzionante quale l'acido folico.

Mediante studi di microscopia confocale e misure di citofluorimetria di flusso si è potuto far luce sul *trafficking* intracellulare.

Rimane tuttavia ancora da chiarire l'influenza che tale molecola esercita nella struttura finale del coniugato e nel rilascio del farmaco, soprattutto quando sono presenti più molecole di acido folico per catena polimerica.

8. Bibliografia

1. Mason, P., *Pharm. J.* **260** (1998) 382-385
2. Duncan, R., Polymer conjugates for tumor targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? *Research focus / Reviews* **2** (1999) 441-449
3. Thomas, F., *Scrip. Magazine* **May** (1998) 42-43
4. Folkman, J., Tumour angiogenesis, *Adv. Cancer Res.* **43** (1985) 175-203
5. Lundberg, A.S., Weinberg, R.A., Control of the cell cycle and apoptosis, *Eur. J. Cancer* **35(4)** (1999) 531-539
6. Sandhu, J.S., Keating, A., Hozumi, N., Human gene therapy, *Crit. Rev. Biotechnol.* **17(4)** (1997) 307-326
7. Robert, K.J., Cheng, Z., Cheng, C.C., *Meth. and Find Exp. Clin. Pharmacol.* **11** (1989) 439-529
8. Allen, T.M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* **2** (2002) 750-763
9. Torchilin, V.P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 145-160
10. Damle, N.K., Frost, P., Antibody-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin, *Curr. Opin. Pharmacol.* **3** (2003) 386-390
11. Harris, J.M., Chess, R.B., Effect of PEGylation on pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2** (2003) 214-221
12. Veronese, F.M., Pasut, G., Guiotto, A., Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application, *Expert Opin. Therap. Patents* **14** (2004) 859-894
13. Duncan, R., The dawning era of polymer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2** (2003) 347-360
14. Duncan, R., Polymer-Drug Conjugates, In: D. Budman *et al.*, Editors, *Handbook of Anticancer Drug Development*, Lippincott Williams & Wilkins (2003) 239-260
15. Duncan, R., *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates, In: G.S. Kwon, Editor, *Polymeric Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker (2005) 1-92

16. Willis, R.C., Good things in small packages. Nanotech advances are producing mega-results in drug delivery, *Modern Drug Discov* **7** (2004) 30–36
17. Vincent, M.J., Duncan, R., Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer, *Trends Biotechnol.* **24(1)** (2006) 39-47
18. Anderson, J.M., Biological responses to materials, *Annual Rev. Mat. Res.* **31** (2001) 81–110
19. Baldrick, P., Pharmaceutical excipient development: The need for preclinical guidance, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **32** (2000) 210–218
20. Luo, Y., Prestwich, G.D., Cancer-targeted polymeric drugs, *Curr. Cancer Drug Targets* **2(3)** (2002) 209-26
21. Arnold, I., Freeman, M.D., Mayhew, E., Targeted drug delivery. *Cancer* **58** (1986) 573-583
22. Ranade, V.V., Drug delivery systems:3A. Role of polymers in drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **30 (1)** (1990) 10-23
23. Bolla, M., Collette, L., Blank, L., Warde, P., Dubois, J.B., Mirimanoff, R.O., Storme, G., Bernier, J., Kuten, A., Sternberg, C., Mattelaer, J., Lopez Torecilla, J., Pfeffer, J.R., Lino Cutajar, C., Zurlo, A., Pierart, M., Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomized trial, *Lancet* **360** (2002) 103–108
24. Guerin, C., Olivi, A., Weingart, J.D., Lawson, H.C., Brem, H., Recent advances in brain tumor therapy: local intracerebral drug delivery by polymers, *Invest. New Drugs* **22(1)** (2004) 27–37
25. Hoes, C.J.T., Feijen, J., The application of drug-polymer conjugates in chemotherapy, *Drug Carrier Systems* (1989) 57-109
26. Cavallaro, G., Pitarresi, G., Licciardi, M., Giammona, G., Polymeric prodrug for release of an antitumoral agent by specific enzymes, *Bioconjugate Chem.* **12(2)** (2001) 143-151
27. Ringsdorf, H., Structure and properties of pharmacologically active polymers, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **51** (1975) 135-153
28. Puttnam, D., Kopeček, J., Polymer conjugates with anticancer activity, *Adv. Polym. Sci.* **122** (1995) 55-123
29. Veronese, F.M., Morpurgo, M., Bioconjugation in pharmaceutical chemistry, *Il farmaco* **54** (1999) 497-516
30. Iver, L., Ratain, M.J., Pharmacogenetics and cancer chemotherapy, *Eur. J. Cancer* **34(10)** (1998) 1493-1499

31. Maeda, H., Matsumura, Y., Tumorigenic and lymphotropic principles of macromolecular drugs, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* **6(3)** (1989) 193-210
32. Maeda, H., Sawa, T., Konno, T., Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymer drug SMANCS, *J. Controlled Release* **74** (2001) 47-61
33. Maeda, H., Fang, J., Inutsuka, T., Kitamoto, Y., Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications, *International Immunopharmacology* **3** (2003) 319-328
34. Kopeček, J., Kopečková, P., Minko, T., Lu, Z.-R., Peterson, C.M., Water soluble polymers in tumor targeted delivery, *J. Controlled Release* **74** (2001) 147-158
35. Garanger, E., Boturyn, D., Dumy, P., Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers, *Anticancer Agents Med. Chem.* **7(5)** (2007) 552-558
36. Shen, W.C., Ryser, H.J.P., Cys-aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102** (1981) 1048-1054
37. Soyez, H., Schacht, E., Vanderkerken, S., The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design, *Adv. Drug Del. Rev.* **21** (1996) 81-106
38. Duncan, R., Hume, I.C., Yardley, H.J., Flanagan, A., Ulbrich, K., Subr, U., Strohm, J., Macromolecular prodrugs for use in target cancer chemotherapy: melphalan covalently coupled to N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymers, *J. Controlled Release* **16** (1991) 121-136
39. Vercauren, R., Bruneeld, D., Schacht, E., Effect of the medical modification of dextran on the degradation by dextranases. *J. Bioactive Comp. Polym.* **5** (1990) 4-15
40. Rihova, B., Riha, I., Immunological problems of polymer bound drugs, *CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* **1** (1985) 311-374
41. Renglesen, W., Anionic dyes, heparin and heparinoids-the rediscovery of polyanionic antitumor agents, *J. Natl. Cancer Inst.* **81** (1989) 1920-1930
42. Trouet, A., Deprez-Decampeneere, D., De Duve, C., Chemotherapy through lysosomes with a DNA-daunorubicin complex, *Nature New Biology* **239** (1972) 110-112
43. Trouet, A., Jollés, A., Targeting of daunorubicin by association with DNA or proteins: a review, *Seminars in Oncology* **11** (1984) 64-72
44. De Duve, C., De Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., Van Hoof, Lysosomotropic agents, *Biochem. Pharmacol.* **23** (1974) 2495-2531

45. Larsen, C., Dextran prodrugs-structure and stability in relation to therapeutic activity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **3** (1989) 103-154
46. Sezaky, H., Hashida, M., Macromolecular-drug conjugates in targeted cancer chemotherapy, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1** (1983) 1-38
47. Maeda, H., SMANCS and polymer conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy, *Adv. Drug Delivery Rev.* **6** (1991) 181-202
48. Duncan, R., Spreafico, F., Polymer conjugates: pharmacokinetic considerations for design and development, *Clin. Pharmacokinet.* **27(4)** (1994) 290-306
49. Seymour, L.W., Duncan, R., Strohal, J., Kopecek, J., Effect of molecular weight of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distributions and rate of excretion after subcutaneous intraperitoneal and intravenous administration to rats, *J. Biomed. Mater. Res.* **21(11)** (1987) 1341-1358
50. Vasey, P.A., Duncan, R., Kaye, S.B., Cassidy, J., Clinical Phase I trial (HPMA copolymer doxorubicin), *Eur. J. Cancer* **31A** (1995) S193
51. Bailey, J.F.E., Koleske, J.V., Poly(ethylene-oxide), *Academic Press New York*, (1976)
52. Dreborg, S., Akerblom, E.B., Immunotherapy with monomethoxypolyethylene glycol modified allergens, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **6(4)** (1990) 315-365
53. Powell, G.M., Polyethylene glycol, *Handbook of water soluble gums and resins* (R.L. Davidson, Ed.), pp 18-1-18-31, McGraw-Hill, New York, 1980.
54. Mutter, M., Bayer, E., *The peptides* Academic Press, New York (1979) 285-332
55. Yamaoka, T., Tabata, Y., Ikada, Y., Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice, *J. Pharm. Sci.* **83(4)** (1994) 601-606
56. Delgado, C., Francis, G.E., Fisher, D., The uses and properties of PEG-linked proteins, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **9** (1992) 249-304
57. Roberts, M.J., Bentley, M.D., Harris, J.M., Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (2002) 459-476
58. Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, P., Jain, N.K., Pegnology: a review of PEG-ylated systems, *Pharmazie* **57** (2002) 5-29
59. Davis, F.F., The origin of PEGnology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (1992), 457-458
60. Veronese, F.M., Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions, *Biomaterials* **22** (2001) 405-417
61. Greewald, R.B., PEG drugs: an overview, *J. Controlled Release* **74** (2001) 159-171

62. Greewald, R.B., Choe, Y.H., McGuire, J., Conover, C.D., Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55** (2003) 217-250
63. Herman, S., Hooftman, G., Schacht, E., Poly(ethylene glycol) with reactive endgroups: I. Modification of proteins, *Journal of bioactive and biocompatible polymers* **10** (1995) 145-187
64. Woghiren, C., Sharma, B., Stein, S. Protected thiol-polyethylene glycol: a new activated polymer for reversible protein modification, *Bioconjug. Chem.* **4** (1993) 314-318
65. Morpurgo, M., Veronese F.M., Kanchesky, D., Harris, J.M., Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) vinyl sulfone, *Bioconjug. Chem.* **7** (1996) 363-368
66. Catalogo Shearwater Polymers, Inc. 2005
67. Molineux, G., Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy, *Cancer Treat. Rev.* **28** (Suppl.A) (2002) 13-16
68. Caliceti, P., Veronese, F.M., Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55** (2003) 1261-1277
69. Zalipsky, S., Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates, *Bioconjugate Chem.* **6** (1995) 150-165
70. Gotesman, M.M., The role of proteases in cancer, *Semin. Cancer Biol.* **1** (1990) 97-160
71. Abuchowski, A., Devis, F.F., Devis, F., Immunosuppressive properties and circulatory life of acromobacter glutaminase-asparaginase covalently attached to poly(ethylene glycol) in man, *Cancer Treat. Rep.* **65** (1981) 1077-1081
72. Abuchowski, A., Kazo, G.M., Verhoest, C.R., Van Es, T., Kafkewitz, D., Nucci, M.L., Viau, A.T., Davis, F.F., Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates, *Cancer Biochem. Biophys.* **7** (1984) 175-186
73. Carl, P.L., Chakravarty, P.K., Katzenellenbogen, J.A. A novel connector linkage applicable in prodrug design, *J. Med. Chem.* **24** (1981) 479-480
74. Zalipsky S., Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules, *Adv. Drug Del. Rev.* **16** (1995) 157-182
75. Poiani, G.J., Riley, D.J., Fox, J.D., Kemnizer, J.E., Gean, K.F., Kohn, J., Conjugates of *cis*-4-hydroxy-L-proline and poly(PEG-Lys), a water soluble poly(ether urethane): Synthesis and evaluation of antifibrotic effects in vitro and in vivo, *Bioconj. Chem.* **5** (1994) 621-630
76. Tomlinson R., *et al.* Pendent chain functionalized polyacetals that display pH-dependent

- degradation: a platform for the development of novel polymer therapeutics, *Macromolecules* **35** (2002) 473–480
77. Hreczuk-Hirst D., Chicco, D., German, L., Duncan, R., Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups, *Int. J. Pharm.* **230** (2001) 57–66
78. Mero, A., Coniugati polimerici di interesse farmaceutico, *Tesi di dottorato di ricerca* (2006)
79. Malik N., Evangorou, E.G., Duncan, R., Dendrimer–platinate: a novel approach to cancer chemotherapy, *Anticancer Drugs* **10** (1999) 767–776
80. Kobayashi, H., Kawamoto, S., Sakai, Y., Choyke, P.L., Star, R.A., Brechbiel, M.W., Sato, N., Tagaya, Y., Morris, J.C., Waldmann, T.A., Lymphatic drainage imaging of breast cancer in mice by micro-magnetic resonance lymphangiography using a nano-size paramagnetic contrast agent, *J. Natl. Cancer Inst.* **96** (2004) 703–708
81. Baker J.R., *et al.* The synthesis and testing of anticancer therapeutic nanodevices, *Biomedical Microdevices* **3** (2001) 61–69
82. Shukla, S., Wu, G., Chatterjee, M., Yang, W., Sekido, M., Diop, L.A., Müller, R., Sudimack, J.J., Lee, R.J., Barth, R.F., Tjarks, W., Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy, *Bioconjug. Chem.* **14** (2003) 158–167
83. Gao C., Xu, Y., Yan, D., Chen, W., Water-soluble degradable hyperbranched polyesters: novel candidates for drug delivery?, *Biomacromolecules* **4** (2003), pp. 704–712.
84. Schlaad, H., Antonietti, M., Block copolymers with amino acid sequences: molecular chimeras of polypeptides and synthetic polymers, *Eur. Phys. J. E* **10** (2003) 17–23
85. Jelinkova, M., Strohalm, J., Etrych, T., Ulbrich, K., Rihova, B., Star-like vs. classic macromolecular prodrugs: two different antibody-targeted HPMA copolymers of doxorubicin studied *in vitro* and *in vivo* as potential anticancer drugs, *Pharm. Res.* **20** (2003) 1558–1564
86. Shaunak, S., Thomas, S., Gianasi, E., Godwin, A., Jones, E., Teo, I., Mireskandari, K., Luthert, P., Duncan, R., Patterson, S., Khaw, P., Brocchini, S., Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation, *Nat. Biotechnol.* **22** (2004) 977–984
87. Kwon, G., Suwa, S., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai Y., Kataoka, K., Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly(ethylene

- oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates, *J. Controlled Rel.* **29** (1994) 17–23
88. Noble, S., Goa, K.L., Gemcitabine. A review of its pharmacology and clinical potential in N-small cell lung cancer and pancreatic cancer, *Drugs* **54(3)** (1997) 447-472
89. Hertel, L.W., Kroin, J.S., Misner, J.W., Tustin, J.M., Synthesis of 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-Deoxy-2,2-difluoro-D-ribofuranosyl nucleosides, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 2406-2409
90. Storniolo, A.M., Allerheiligen, S.R.B., Pearce, H.L., Preclinical, pharmacologic and phase I studies of gemcitabine, *Seminars in Oncology* **24 (2, Suppl.7)** (1997) S7-2-S7-7
91. Abbruzzese, J.L., Grunewald, R., Weeks, E.A., Gravel, D., Adams, T., Nowak, B., Mineishi, S., Tarassoff, P., Satterlee, W., Raber, M.N., Plunkett, W., A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine, *J. Clin. Oncol.* **9(3)** (1991) 491-498
92. Hertel, L.W., Boder, G.B., Kroin, J.S., Rinzel, S.M., Poore, G.A., Todd, G.C., Grindey, G.B., Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), *Cancer Research* **50** (1990) 417-4422
93. Heinemann, V., Hertel, L.W., Grindey, G.B., Plunkett, W., Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluodeoxycytidine and 1-β-D-arabinofuranosylcytosine, *Cancer Research* **48** (1988) 4024-4031
94. Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y.-Z., Heinemann, V., Grunewald, R., Gandhi, V., Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential, *Seminars in Oncology* **22(4 Suppl.11)** (1995) 3-10
95. Kedzierski, P., Solaski, W.A., Cheng, H., Mitchell, J., Leszczynski, J., DFT study of the reaction proceeding in the cytidine deaminase, *Chemical Physics Letter* **381** (2003) 660-665
96. Heinemann, V., Xu, Y.-Z., Chubb, S., Sen, A., Hertel, L.W., Grindey, G.B., Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential, *Cancer Research* **52** (1992) 533-539
97. FDA Revised Label-Version 082598, Gemzar[®] for injection.
98. Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W., Grindey, G.B., Plunkett, W., Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis, *Cancer Res.* **51** (1991) 6110-6117
99. Heinemann, V., Xu, Y.-Z., Chubb, S., Sen, A., Hertel, L.W., Grindey, G.B., Plunkett, W., Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine, *Molec. Pharmacol.* **38(4)** (1990) 567-572

100. Gandhi, V., Plunkett, W., Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides, *Cancer Res.* **50(12)** (1990) 3675-3680
101. Ruiz van Haperen V.M.T., Veerman, G., van Moorsel, C.T.A., Peters, G.J., Induction of in vivo resistance against gemcitabine, *Adv. Exp. Med. Biol.* **431** (1998) 637-640
102. Goan, Y.-G., Zhou, B., Hu, E., Mi, S., Y, Y., Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line, *Cancer Research* **59** (1999) 4204-4207
103. Hui, Y.F., Reitz, J., Gemcitabine. A cytidine analogue active against solid tumors, *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **54** (1997) 162-170
104. Eli Lilly and Company, Summary of product characteristics: Gemcitabine. UK prescribing information. Eli Lilly (1997)
105. Grunewald, R., Kantarjian, H., Du, M., Faucher, K., Tarassoff, P., Plunkett, W., Gemcitabine in leukemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study, *J. Clin. Oncol.* **10(3)** (1992) 406-413
106. Barton-Burke, M., Gemcitabine: A pharmacologic and clinical overview, *Cancer Nursing* **22(2)** (1999) 176-183
107. Guchelaar, H.-J., Richel, D.J., van Knapen, A., Clinical, toxicological and pharmacological aspects of gemcitabine, *Cancer Treat. Rev.* **22** (1996) 15-31
108. Levitt, M.L., Kassem, B., Gooding, W.E., Miketic, L.M., Landreneau, R.J., Ferson, P.F., Keenan, R., Yousem, S.A., Lindberg, C.A., Trenn, M.R., Ponas, R.S., Tarasoff, P., Sabatine, J.M., Friberg, D., Whiteside, T.L., Phase I study of gemcitabine given weekly as a short infusion for non-small cell lung cancer: results and possible immune system-related mechanisms, *Lung Cancer* (2003) 1-10
109. Abratt, R.P., Bezwoda, W.R., Falkson, G., Goedhals, L., Hacking, D., Rugg, T.A., Efficacy and safety profile of gemcitabine in non-small cell lung cancer: a phase II study, *J. Clin. Oncol.* **12(8)** (1994) 1535-1540
110. Crinò, L., Calandri, C., Gemzar platinum combinations: phase III trials in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer* **38** (2002) S9-S12
111. Hoang, T., Kim, K.M., Jalowski, A., Koch, P., Beatty, P., McGovern, J., Quisumbing, M., Shapiro, G., Witte, R., Schiller, J.H., Phase II study of second-line gemcitabine in sensitive or refractory small cell lung cancer, *Lung Cancer* **42** (2003) 97-102

112. Cormier, Y., Eisenhauer, E., Muldal, A., Gregg, R., Ayoub, J., Goss, G., Stewart, D., Tarsoff, P., Wong, D., Gemcitabine is an active new agent in previously untreated extensive small cell lung cancer (SCLC), *Annals of Oncology* **5** (1994) 283-285
113. Heinemann, V., Gemcitabine-based combination treatment of pancreatic cancer, *Seminars in Oncology* **28(1 Suppl.3)** (2002) 25-35
114. Rothenberg, M.L., Moore, M.J., Cripps, M.C., Andersen, J.S., Portenoy, R.K., Burris III, H.A., Green, M.R., Tarsoff, P.G., Brown, T.D., Casper, E.S., Storniolo, A.M., Von Hoff, D.D., A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer, *Annals of Oncology* **7** (1996) 347-353
115. Carmichael, J., Fink, U., Russell, R.C.G., Spittle, M.F., Harris, A.L., Spiessi, G., Blatter, J., Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer, *Br. J. Cancer* **73** (1996) 101-105
116. Fruscella, E., Gallo, D., Ferrandina, G., D'Agostino, G., Scambia, G., Gemcitabine: current role and future options in the treatment of ovarian cancer, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **48** (2003) 81-88
117. Fowler Jr., W.C., Van Le, L., Gemcitabine as a single-agent treatment for ovarian cancer, *Gynecologic Oncology* **90** (2003) S21-S23
118. Mutch, D.G., Gemcitabine combination chemotherapy of ovarian cancer, *Gynecologic Oncology* **90** (2003) S16-S20
119. Carmichael, J., Possinger, K., Phillip, P., Beykirch, M., Kerr, H., Walling, J., Harris, A.L., Advanced breast cancer: a phase II trial with gemcitabine, *J. Clin. Oncol.* **13(11)** (1995) 2731-2736
120. Morabito, A., Filippelli, G., Palmeri, S., Cascinu, S., Ferraù, F., Zagonel, V., Gattuso, D., Catalano, V., Capaccetti, B., Franciosi, V., Accurso, V., Scinto, F., Gasparini, G., The combination of gemcitabine and vinorelbine is an active regimen as second-line therapy in patients with metastatic breast cancer pretreated with taxanes and/or anthracyclines: a phase I-II study, *Breast cancer Research and Treatment*, **78** (2003) 29-36
121. Smorenburg, C.H., Bontenbal, M., Seynaeve, C., van Zuylen, C., de Heus, G., Verweij, J., de Wit, R., Phase II study of weekly gemcitabine in patients with metastatic breast cancer relapsing or failing both an anthracycline and a taxane, *Breast Cancer research and Treatment* **66** (2001) 83-87
122. Sternberg, C.N., Gemcitabine in bladder cancer, *Seminars in Oncology* **27(1 Suppl. 2)** (2000) 31-39

123. Laufer, M., Ramalingam, S., Schoenberg, M.P., Haisfield-Wolf, M.E., Zuhowski, E.G., Trueheart, I.N., Eisenberg, M.A., Nativ, O., Egorin, M.J., Intravesical gemcitabine therapy for superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a phase I and pharmacokinetic study, *J Clin. Oncol.* **21(4)** (2003) 697-703
124. Vogelzang, N.J., Future directions for gemcitabine in the treatment of genitourinary cancer, *Semin. Oncol.* **29(3)** (2002) 40-45
125. Kindler, H.L., van Meerbeeck, J.P., The role of gemcitabine in the treatment of malignant mesothelioma, *Semin. Oncol.* **29** (2002) 70-76
126. Fung, M.C., Storniolo, A.M., Nguyen, B., Arning, M., Brookfield, W., Vigil, J., A review of Hemolytic Uremic Syndrome in patients treated with gemcitabine therapy, *Cancer* **85(9)** (1999) 2023-2032
127. Epirubicin official FDA information, side effects and uses
128. Plosker, G.L., Faulds, D., Epirubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cancer chemotherapy, *Drugs* **45** (1993) 788-856
129. Robert, J., Clinical Pharmacokinetics of epirubicin, *Clin. Pharmacokinet.* **26** (1994) 428-438
130. Zagotto, G., Gatto, B., Moro, S., Sissi, C., Palumbo, M., Anthracyclines: recent development in their separation and quantitation, *J. Chromatogr. B* **764** (2001) 161-171
131. Lopez, M., Anthracyclines in the adjuvant treatment of breast carcinoma: thirty years later, *Clin. Ter.* **157(2)** (2006) 165-177
132. Glück, S., Adjuvant chemotherapy for early breast cancer: optimal use of epirubicin, *Oncologist* **10(10)** (2005) 780-791
133. Pronzato, P., Vigani, A., Tognoni, A., Vaira, F., Canessa, P., Anthracyclines in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer* **34** (2001) S57-59
134. Gabizon, A., Horowitz, A.T., Goren, D., Tzemach, D., Mandelbaum-Shavit, F., Qazen, M.M., Zalipsky, S., Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies, *Bioconjug. Chem.* **10(2)** (1999) 289-298
135. Lu, Y., Low, P.S., Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents, *Adv. Drug Del. Rev.* **54** (2002) 675-693
136. Sudimack, J., Lee, R.J., Targeted drug delivery via the folate receptor, *Advanced Drug Del. Rev.* **41 (2)** (2000) 147-162

137. Weitman, S.D., Lark, R.H., Coney, L.R., Fort, D.W., Frasca, V., Zurawski, V.R.Jr., Kamen, B.A., Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues, *Cancer Res.* **52** (1992) 3396-3401
138. Campbell, I.G., Jones, T.A., Foulkes, W.D., Trowsdale, J., Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer, *Cancer Res.* **51** (1991) 5329-5338
139. Garin-Chese, P., Campbell, I., Saigo, P.E., Lewis, J.L.Jr., Old, L.J., Retting, W.J., Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein, *Am. J. Pat.* **142** (1993) 557-567
140. Jhaveri, M.S., Rait, A.S., Chung, K.N., Trepel, J.B., Chang, E.H., Antisense oligonucleotides targeted to the human folate receptor inhibit breast cancer growth and sensitize the cell to doxorubicin treatment, *Mol. Cancer Ther.* **3(12)** (2004) 1505-12
141. Rijnboutt, S., Jansen, G., Postuma, G., Hynes, J.B., Schornagel, J.H., Strous, G.J., Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor- α , *J. Cell Biol.* **132 (1-2)** (1999) 35-47
142. Rothberg, B.A., Ying, Y., Kolhouse, J.F., Kamen, B.A., Anderson, R.G.W., The Glycophospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway, *J. Cell Biol.* **110** (1990) 637-649
143. Anderson, R.G.W., Kamen, B.A., Rothberg, K.G., Lacey, S.W., Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae, *Science* **255** (1992) 410-411
144. Stella, B., Arpicco, S., Peracchia, M.T., Desmaele, D., Hoebeke, J., Renoir, M., D'Angelo, J., Cattel, L., Couvreur, P., Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting, *J. Pharm. Sciences* **89** (2000) 1452-1464
145. Wang, S., Lee, J.R., Mathias, J.C., Green, A.M., Low, S.P., Synthesis, purification and tumor cell uptake of Ga-Deferoxamine-folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging, *Bioconj. Chem.* **7** (1996) 56-62
146. Snyder, S.L., Sobocinski, P.Z., An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines, *Anal. Biochem.* **64(1)** (1975) 284-288
147. Sims, G.E.C., Snape, T.J., A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions, *Anal. Biochem.* **107(1)** (1980) 60-63
148. Lee, R.J., Low, P.S., Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis, *J. Biological Chem.* **5(4)** (1994) 3198-3204
149. Vicentini, M., Coniugati polimerici di gemcitabina: studi preliminari per un *targeting* antitumorale, *Tesi di laurea* (2005)

150. Alexander, R.L., Morris-Natschke, S.L., Ishaq, K.S., Fleming, R.A., Kucera, G.L., Synthesis and cytotoxic activity of two novel 1-dodecylthio-2-decyloxypropyl-3-phosphatidic acid conjugates with gemcitabine and cytosine arabinoside, *J. Med. Chem.* **46** (2003) 4205-4208
151. Schneider, R., Schmitt, F., Frochot, C., Fort, Y., Lourette, N., Guillemin, F., Müller, J-F., Barberi-Heyob, M., Design, synthesis and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.* **13** (2005) 2799-2808
152. Zhang, Q., Xiang, G., Zhang, Y., Yang, K., Fan, W., Lin, J., Zeng, F., Wu, J., Increase of doxorubicin sensitività for folate receptor positive cells when given as the prodrug N-(phenylacetyl)doxorubicin in combination with folate-conjugated PGA, *J. Pharm. Sci.* **10** (2006) 2266-2075
153. Yoo, H.S., Park, T.G., Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate, *J. Controlled Rel.* **100** (2004) 247-256
154. Chattopadhyay, S., Wang, Y., Zhao, R., Goldman, I.D., Lack of impact of the loss of constitutive folate receptor α expression, achieved by RNA interference, on the activity of the new generation antifolate pemetrexed in HeLa cells, *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 7986-7993
155. Fang, J., Deng, D., Nakamura, H., Akuta, T., Qin, H., Iyer, A.K., Greish, K., Maeda, H., Oxystress inducing antitumor therapeutics via tumor-targeted delivery of PEG-conjugated D-amino acid oxidase, *Int. J. Cancer* **122(5)** (2008) 1135-1144
156. Schiavon, O., Pasut, G., Moro, S., Orsolini, P., Guiotto, A., Veronese, F.M., PEG-Ara-C conjugates for controlled release, *Eur. J. Med. Chem.* **39(2)** (2004) 123-133

Ringraziamenti

Vorrei innanzitutto ringraziare il prof. Oddone Schiavon per avermi dato la possibilità di condurre questo progetto di ricerca sotto la sua supervisione. Ringrazio inoltre il prof. Francesco Veronese che fin dall'inizio di questo mio lavoro mi ha consigliata e sostenuta. Grazie anche a tutto il gruppo del laboratorio di "drug delivery".

Un ringraziamento particolare va poi al dott. Gianfranco Pasut, disponibile in ogni momento a risolvere piccoli e grandi problemi e dubbi quotidiani.

Vorrei poi ringraziare i prof. Daniela Vedaldi, Antonella Bertazzo e Fernando Formaggio, membri della mia commissione triennale, per aver seguito con disponibilità e interesse lo sviluppo di questo progetto, valutando con attenzione il lavoro in itinere, e i prof. Maurizio Casarin e Adriana Chilin, responsabili della scuola di dottorato. Grazie anche a tutto il personale del dipartimento di Scienze Farmaceutiche.

Non posso non ringraziare la dott.ssa Maria Jesus Vicent, del Centro de Investigacion Principe Felipe CIPF, che mi ha accolto nel suo gruppo di ricerca durante il periodo di istanza a Valencia, seguendomi con grande professionalità ed interesse. Grazie poi a tutto il gruppo del laboratorio di "Polymer Therapeutics" che mi ha accolto con disponibilità, simpatia e pazienza. Grazie anche a quanti lavorano al CIPF e hanno contribuito alla buona riuscita del lavoro svolto nei nove mesi di permanenza a Valencia .

Infine grazie a tutti coloro che in un modo o nell'altro mi sono stati vicini e mi hanno sostenuto in questa esperienza.

