

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE
XXII CICLO

SVILUPPO DI NUOVI SISTEMI NANOVETTORIALI PER IL RILASCIO CONTROLLATO E SELETTIVO DI FARMACI E MOLECOLE ATTIVE

DIRETTORE DELLA SCUOLA : CH.MO PROF. MAURIZIO CASARIN
COORDINATORE D'INDIRIZZO : CH.MO PROF. ADRIANA CHILIN
SUPERVISORE :CH.MO PROF. PAOLO CALICETI

DOTTORANDO : ANNA SCOMPARIN

INDICE

1. RIASSUNTO	3
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUZIONE	7
3.1 LA TERAPIA ANTITUMORALE	8
3.1.1 Limiti della chemioterapia	10
3.2 CARATTERISTICHE DEL TESSUTO TUMORALE	12
3.3 TARGETING DI FARMACI ANTITUMORALI	14
3.3.1 Direzionamento passivo nei tessuti tumorali: effetto EPR	14
3.3.2 Direzionamento attivo: recettori tumorali come ligandi	18
3.3.2.1 Acido folico	20
3.4 SISTEMI DI DRUG DELIVERY	24
3.4.1 Ciclodestrine	24
3.4.2 Micelle polimeriche	29
3.4.2.1 Polimeri strutturanti micelle	30
3.4.2.2 Formazione di micelle caricate con farmaci	32
3.4.3 Bioconiugati farmaco-polimero	36
3.5 MATERIALI IMPIEGATI NEL PROGETTO DI RICERCA	39
3.5.1 Pullulano	39
3.5.2 PEG	42
3.5.3 Paclitaxel	44
3.5.4 Gold (III) derivati ditiocarbammati: [(ESDT)AuBr ₂]	47
3.5.5 Doxorubicina	51
4. MATERIALI E METODI	57
4.1 REAGENTI	57
4.2 STRUMENTI	59
4.3 METODI	61
4.3.1 Metodi analitici	61
4.3.1.1 Determinazione dei residui aldeidici	61
4.3.1.2 Test del TNBS per la determinazione dei gruppi amminici primari	61
4.3.1.3 Test di Ellman per la determinazione dei gruppi tiolici liberi	63

4.3.2 Sintesi e caratterizzazione di graft copolymers autoassemblanti	64
4.3.2.1 Studio preliminare della cinetica di ossidazione del pullulano	64
4.3.2.2 Sintesi di pullulano ossidato	64
4.3.2.3 Clorurazione dell'acido 5 β -colanico	65
4.3.2.4 Sintesi del derivato Colanico-dodecilammina	65
4.3.2.5 Sintesi di (colanico)-(PULL ₁)-(PEG)	66
4.3.2.6 Sintesi di (colanico)-(PULL ₂)-(PEG)	67
4.3.2.7 Sintesi di (colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂)	68
4.3.2.8 Determinazione del peso molecolare del derivato ossidato del pullulano	69
4.3.2.9 Determinazione della Concentrazione Micellare Critica (CMC)	70
4.3.2.10 Determinazione delle dimensioni micellari	70
4.3.2.11 Studio di solubilizzazione di paclitaxel	71
4.3.3 Studio di veicolazione di [(ESDT)AuBr ₂]	72
4.3.3.1 Determinazione epsilon molare	72
4.3.3.2 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr ₂] in tampone acquoso a vari pH	73
4.3.3.3 Studi di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr ₂] in soluzione acquosa in presenza di micelle di (colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂)	74
4.3.3.4 Studio di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr ₂] in soluzione acquosa in presenza di Ciclodestrine	75
4.3.3.5 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr ₂] in soluzione acquosa in presenza di (colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂)	75
4.3.3.6 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr ₂] in soluzione acquosa in presenza di Ciclodestrine	76
4.3.3.7 Studio di citotossicità	76
4.3.3.8 Farmacocinetica	77
4.3.4 Sintesi e caratterizzazione dei profarmaci polimerici (PEG-AF)-PULL ₂ -(Cyst-DOXO) e (PEG-NH ₂)-PULL ₂ -(Cyst-DOXO)	77
4.3.4.1 Sintesi di (PEG-NH ₂)-PULL ₂ -(Cyst)	77
4.3.4.2 Sintesi di acido folico N-idrossisuccinimide estere (FA-NHS)	78
4.3.4.3 Derivatizzazione di (PEG-NH ₂)-PULL ₂ -(Cyst) con acido folico	78
4.3.4.4 Sintesi Doxorubicina-EMCH (DOXO-EMCH)	79
4.3.4.5 Derivatizzazione di (PEG-AF)-PULL ₂ -(Cyst) e (PEG-NH ₂)-PULL ₂ -(Cyst) con DOXO-EMCH	80

4.3.4.6 Determinazione del peso molecolare del pullulano, del suo derivato ossidato e del (PEG-AF)-PULL ₂ -(Cyst-DOXO)	80
4.3.4.7 Analisi dimensionale	81
4.3.4.8 Rilascio di doxorubicina	81
4.3.4.9 Studi di citotossicità su cellule tumorali	82
4.3.4.10 Studio di internalizzazione mediante citofluorimetro	83
4.3.4.11 Studi di citotossicità su linee cellulari endoteliali	83
4.3.4.12 Studio di formazione di capillari su Matrigel	83
4.3.4.13 Studi di farmacocinetica	84
5.RISULTATI	87
5.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI GRAFT COPOLYMERS AUTO ASSEMBLANTI	87
5.1.1 Ossidazione del Pullulano	87
5.1.2 Sintesi dell'acido 5β-colanico-dodecilammina	90
5.1.3 Sintesi di (colanico)-(PULL)-(PEG)	93
5.1.4 Sintesi di (colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂)	98
5.1.5 Determinazione della Concentrazione Micellare Critica (CMC)	102
5.1.6 Determinazione delle dimensioni micellari	106
5.1.7 Studio di solubilizzazione di Paclitaxel	107
5.2 CARATTERIZZAZIONE DI [(ESDT)AuBr ₂]	110
5.2.1 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr ₂] in diversi solventi	110
5.2.2 Solubilizzazione di [(ESDT)AuBr ₂] con (colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂)	111
5.2.3 Solubilizzazione di [(ESDT)AuBr ₂] in presenza di ciclodestrine	112
5.2.4 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr ₂] in presenza dei derivati di pullulano o ciclodestrine	115
5.2.5 Studio di citotossicità in vitro mediante MTT test	117
5.2.6 Studio di farmacocinetica	119
5.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEI PROFARMACI POLIMERICI POLIMERO (PEG-AF)-PULL ₂ -(Cyst-DOXO) e (PEG-NH ₂)-PULL ₂ -(Cyst-DOXO)	121
5.3.1 Sintesi di (PEG-NH ₂)-PULL-(Cyst)	121
5.3.2 Sintesi di (PEG-AF)- pullulano-(Cyst)	122

Indice

5.3.3 Sintesi di (PEG-AF)-PULL-(Cyst) e (PEG-NH ₂)-PULL-(Cyst)	124
5.3.4 Determinazione delle dimensioni del polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOXO) e (PEG-NH ₂)-PULL-(Cyst-DOXO)	127
5.3.5 Cinetica di rilascio di doxorubicina	128
5.3.6 Studi di attività su culture cellulari	129
5.3.7 Studio di internalizzazione mediante citofluorimetro	132
5.3.8 Studi di citotossicità in vitro su linee cellulari endoteliali	134
5.3.9 Studio di formazione di capillari su Matrigel	135
5.3.3.10 Studi farmacocinetici	137
6.DISCUSSIONE	141
7.CONCLUSIONI	157
BIBLIOGRAFIA	159

ABBREVIAZIONI

ACN	Acetonitrile
AF	Acido folico
β -CD	β -Ciclodestrina
CMC	Critical Micellar Concentration
Cyst	cisteamina
Da	Dalton
DCCI	Dicicloesilcarbidiimmide
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimetilsolfossido
DMF	N, N'- Dimetil Formammide
DOXO	Doxorubicina
DTNB	acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EMCH	acido N-[ϵ -maleimidocaproico]-idrazide trifluoroacetilato
[(ESDT)AuBr ₂]	Di Bromo (EtilSarcosinditiocarbammato) Oro (III)
FBS	siero bovino fetale
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
HP- β -CD	(2-idrossipropil)- β -ciclodestrina
NHS	N-idrossisuccinimmide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PEG	Polietilenglicole
PM	Peso Molecolare
TEA	Trietilenamina
TFA	Acido trifluoroacetico
TNBS	Acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico
UV-Vis	Spettrofotometria Ultravioletto-Visibile
MCF-7	Linea cellulare di adenocarcinoma mammario umano
Me- β -CD	Metil- β -ciclodestrina

Riassunto

MeOH	Metanolo
mPEG ₂₀₀₀ -NH ₂	Monometossiammino-PEG ₂₀₀₀
NHS	N-idrossisuccinimide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Polietilenglicole
PEG ₁₉₀₀ (NH ₂) ₂	Diammino-PEG ₁₉₀₀
PM	Peso Molecolare
RI	Refractive Index
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
SEC	Size Exclusion Chromatography (Gel-Permeation)
TEA	Trietilammina
TCEP	tris(2-carbossietil)fosfina
TFA	Acido trifluoroacetico
TNBS	Acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico
UV-Vis	Spettrofotometria Ultravioletto-Visibile

1. RIASSUNTO

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato lo studio di vari sistemi colloidali supramolecolari per la veicolazione di farmaci antitumorali in grado di migliorare le caratteristiche biofarmaceutiche, stabilità e solubilità, e terapeutiche permettendo ad un rilascio controllato e mirato del farmaco al sito di azione. Per raggiungere questo obiettivo, sono stati progettati alcuni sistemi supramolecolari ottenibili attraverso tecniche di bioconiugazione di funzioni molecolari con diverse proprietà chimico-fisiche e biofarmaceutiche con una struttura a base di pullulano.

Sistemi colloidali sono stati quindi sviluppati sia per l'intrappolamento fisico che per la bioconiugazione al farmaco della struttura supramolecolare. Per l'intrappolamento fisico di farmaci sono stati sintetizzati polimeri anfifilici in grado di autostrutturarsi in ambiente acquoso per formare strutture di tipo micellare. Per ottenere bioconiugati farmaci-polimero sono invece state messe a punto alcune metodiche di bioconiugazione in grado di consentire il rilascio del farmaco in particolari condizioni microambientali.

Strutture autoassemblanti sono state ottenute mediante derivatizzazione del pullulano con acido 5 β -colanico (dominio idrofobico) e ammino PEG (dominio idrofilico). Sono stati studiati vari protocolli di sintesi in modo da ottenere polimeri con definite caratteristiche farmaceutiche. I bioconiugati ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e UV-Vis per valutare la composizione chimica. Si sono quindi condotti studi fluorimetrici per calcolare la concentrazione micellare critica, *Light Scattering* Dinamico per determinare le dimensioni micellari e infine studi biofarmaceutici impiegando il paclitaxel come farmaco modello e un farmaco a base di oro (III) [(ESDT)AuBr₂]. Studi di attività antitumorale sono stati condotti mediante test cellulari. Parallelamente sono state studiate le proprietà biofarmaceutiche e di attività cellulare di formulazioni del complesso dell'oro [(ESDT)AuBr₂] con β -ciclodestrine, 2-idrossipropil- β -ciclodestrine e metil- β -ciclodestrine. Studi *in vivo* sono stati infine condotti per valutare il profilo farmacocinetico delle formulazioni.

Per quanto riguarda invece la bioconiugazione di farmaci al pullulano sono stati sviluppati due prodotti per il direccionamento passivo e per il direccionamento attivo al tessuto tumorale. Infatti, grazie all'effetto EPR (*enhanced permeability and retention*), sistemi colloidali tendono ad accumularsi preferenzialmente nei tessuti tumorali. L'inserimento di funzioni direccionanti consente invece il riconoscimento di strutture espresse dalle cellule tumorali e quindi un accumulo attivo.

Lo studio è stato condotto impiegando doxorubicina come farmaco modello. Il pullulano è stato dapprima funzionalizzato per inserire nel *backbone* polimerico folico funzioni tioliche e amminiche. L'acido folico è stato coniugato alle funzioni amminiche per ottenere un sistema *targeting*. Ai gruppi tiolici dei residui di cisteamina è stata invece legata la doxorubicina tramite uno spaziatore idrazonico che si idrolizza a pH debolmente acido ed è quindi in grado di rilasciare il farmaco. Studi spettrometrici e cromatografici sono stati condotti per caratterizzare il bioconiugato dal punto di vista chimico-fisico. È stata quindi studiata la cinetica di idrolisi a pH 5.5 e a pH fisiologico (7.4) in tampone e in plasma, per verificare se il sistema fosse in grado di rilasciare il farmaco a livello plasmatico o invece selettivamente negli endosomi. Studi con colture cellulari sia tumorali che endoteliali hanno permesso di valutare il potenziale terapeutico del bioconiugato e la sua capacità di entrare selettivamente in cellule esprimenti il recettore per l'acido folico. Infine è stato valutato il profilo farmacocinetico in topi Balb/C.

2.ABSTRACT

The present work was aimed at developing novel nanovectorial systems for the controlled and selective anticancer drugs release. Colloidal carriers were designed to improve the biopharmaceutical and therapeutic properties of anticancer drugs, in which the drug is chemically or physically entrapped. Two different drug delivery systems with specific chemico-physical characteristics for physical or chemical drug conjugation were designed.

In the first part of the project an amphiphilic graft copolymer based on pullulan backbone was synthesized. Hydrophobic and hydrophilic domains were introduced along the polysaccharide backbone to yield self-assembling structure in aqueous buffer, suitable for the delivery of anticancer drugs. The conjugates were obtained by reductive amination of oxidized pullulan with 5 β -cholanic acid (hydrophobic domain) and PEG (hydrophilic domain). The reaction conditions were properly set up to obtain polymers with different characteristics. The polymers were characterized by chromatographic and spectrometric analysis to evaluate the chemico-physical properties of the new derivatives (composition, CMC, size). The drug carrier properties were investigated by using paclitaxel, and [(ESDT)AuBr₂], as drug models. A comparative study was carried out by formulating [(ESDT)AuBr₂] with β -cyclodextrin, 2-Hydroxylpropyl- β -cyclodextrin and methyl- β -cyclodextrin. The obtained colloidal carriers loaded with the metal drug were evaluated both *in vitro* and *in vivo* for the cytotoxicity and pharmacokinetic behavior.

The second part of the project was aimed at developing polymeric prodrugs for the active and passive cancer targeting which exploit EPR effect (*enhanced permeability and retention*). The recognition properties bestowed by the targeting moiety. Pullulan has been used as backbone for the bioconjugation of doxorubicin as model drug and folic acid for tumour cell targeting molecule. Doxorubicin was grafted via acid sensitive hydrazone bond, that can release the free drug in the peculiar physio-pathologic conditions of the tumor. The targeting agent was conjugated through a PEG spacer. PEG was grafted to guarantee either the carrier solubility or to allow for folic acid recognition of folic acid receptor overexpressing

tumour cells. The release of doxorubicin from the polymeric prodrug was evaluated in physiologic condition (PBS pH 7.4 and plasma) and in acetate buffer pH 5.5.

In vitro studies on cancer and endothelial cells demonstrate that the polymer is able to guarantee the intracellular drug release. The *in vivo* properties were evaluated with pharmacokinetic studies.

3. INTRODUZIONE

La scienza del *drug delivery* si occupa dello sviluppo di sistemi di veicolazione di farmaci secondo cinetiche predefinite in un sito specifico dell'organismo, sito target, per ottimizzare la performance e l'effetto terapeutico. A tale scopo negli ultimi anni sono stati sviluppati vari sistemi supramolecolari, definiti “*polymer therapeutics*” o “*nanomedicines*”, ottenuti per coniugazione chimica o assemblaggio fisico di molecole biologicamente attive con macromolecole polimeriche e altre molecole funzionali in grado di fornire alla struttura specifiche caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche. La componente polimerica rappresenta la struttura base a cui vengono ancorate tutte le funzioni molecolari che definiscono il *carrier* ed eventualmente il farmaco. Pertanto per la preparazione di bioconiugati polimerici il polimero deve possedere alcuni requisiti di base quali: essere biocompatibile, solubile, facilmente eliminabile dall'organismo, multifunzionale. L'impiego di bioconiugati polimerici nell'ambito del *drug delivery* ha aperto nuove prospettive terapeutiche per molte patologie. In particolare tali sistemi sono ampiamente studiati nella terapia antitumorale, in quanto consentono di superare molti problemi legati all'impiego della maggior parte dei farmaci chemioterapici i quali spesso mostrano un'azione poco selettiva agendo in modo aspecifico a livello di tutti i tessuti, causando effetti collaterali molto gravi, sono poco solubili, poco stabili, e presentano un inadatto profilo farmacocinetico (Miller, K., 2008).

Le peculiarità strutturali dell'endotelio vascolare, le caratteristiche condizioni microambientali (pH, temperatura, potenziale redox e corredo enzimatico) e la sovraespressione di specifici recettori sono caratteristiche definite dei tessuti tumorali e vengono successo per questo studiati per lo sviluppo di nuove per tecniche di *targeting* passivo ed attivo del farmaco. Per questi motivi sistemi di *drug delivery* polimerici, bioconiugati o assemblati fisici, stanno diventando sempre più importanti nella terapia antitumorale.

3.1 LA TERAPIA ANTITUMORALE

Per “tumore” o “neoplasia” si intende la proliferazione incontrollata di un tessuto a seguito di mutazioni a carico di geni, definiti oncogeni, che controllano la crescita cellulare (geni per fattori di crescita e relativi recettori, per trasduttori intracellulari, per fattori di trascrizione nucleare). Quando le mutazioni diventano più consistenti, le cellule possono assumere la capacità di degradare la lamina basale, di eludere la sorveglianza del sistema immunitario e di prendere contatto con cellule di diversi tessuti. Il tumore diventa quindi invasivo e può diffondere, attraverso il sistema linfatico e circolatorio, anche lontano dal sito di insorgenza. Questo processo, definito come metastasi tumorale, determina la “malignità” del tumore.

Dopo le malattie cardiovascolari, il cancro rappresenta la seconda causa di morte nei paesi industrializzati, e per questo motivo si stanno concentrando molti sforzi nella ricerca per lo sviluppo di efficaci terapie antitumorali.

La maggior parte degli agenti terapeutici scoperti durante i primi vent’anni della ricerca chemioterapica sono farmaci altamente citotossici, la cui azione mirata direttamente a danneggiare il DNA o a inibire la duplicazione cellulare provocando la morte non selettiva sia delle cellule tumorali sia delle cellule normali in fase di replicazione. La mancanza di specificità d’azione dei chemioterapici è alla base della loro considerevole tossicità che ne limita il loro impiego nella terapia antitumorale.

Solo recentemente si è iniziato ad applicare le conoscenze riguardanti le alterazioni a carico di oncogeni e geni oncosoppressori e quelle relative ai processi di trasduzione del segnale intracellulare, per la diagnosi, la prognosi e soprattutto per un trattamento mirato delle neoplasie. L’approccio terapeutico moderno prevede:

- La distruzione delle cellule mediante radiazioni
 - L’utilizzo di sostanze citotossiche, spesso in associazione tra loro
 - Potenziamento delle difese immunitarie del paziente (terapia adiuvante)
 - Rimozione chirurgica del tessuto canceroso
 - Terapia genica
 - Prevenzione farmacologica della metastatizzazione del tumore primario (antiangiogenetici)
 - Ormoni

In linea di massima si può dire che la radioterapia è utile nel caso di tumori localizzati e la sua efficacia può essere aumentata associandola a farmaci radio sensibilizzanti. La chemioterapia, grazie alla sua azione sistemica, è più indicata invece nel caso di tumori in fase metastatica. Le diverse metodiche possono comunque essere combinate tra loro, sviluppando così varie strategie terapeutiche quali:

- **TERAPIA ADIUVANTE** (trattamento postoperatorio): nel caso di tumori solidi localizzati. Generalmente si procede con l'asportazione chirurgica della massa tumorale, seguita da chemioterapia e radioterapia, per eliminare eventuali micrometastasi ed evitare quindi recidive.
- **TERAPIA NEOADIUVANTE** (trattamento preoperatorio): è utile diminuire il volume del tumore per favorire i successivi interventi di radioterapia o chirurgia, che sono in genere necessari per tumori solidi, in quanto gli agenti chemioterapici spesso non riescono a raggiungerne il cuore.

La chemioterapia può essere mirata alla completa guarigione del paziente o a prolungarne la vita o alleviare i sintomi. L'evoluzione della terapia antitumorale negli ultimi quarant'anni è progredita rapidamente, passando da agenti alchilanti ed antimetaboliti a prodotti naturali e più di recente a terapie genetiche, vaccini ed altri farmaci che agiscono sul sistema immunitario. Questo ha consentito di compiere notevoli progressi, soprattutto nella cura di neoplasie maligne e fatali come il carcinoma testicolare, il linfoma, in particolare il linfoma di Hodgkin, e le leucemie. Tuttavia la remissione del tumore rimane in molti casi difficile da ottenere, soprattutto nel caso di neoplasie solide come quelle a colon, prostata, mammella e polmone, che sono oggi le più diffuse. Lo sviluppo di nuovi sistemi terapeutici si articola in quattro direzioni:

1. la chimica combinatoriale e lo screening di sostanze, per sviluppare molecole, naturali o semisintetiche, ad attività antiproliferativa e a basso peso molecolare (Hill, B.T.,1996);

2. utilizzo di metodologie di biochimica e biologia molecolare per identificazione di nuovi bersagli per la chemioterapia, come recettori, antigeni, fattori angiogenetici e mediatori chimici (Lundberg, A.S, 1999);

3. sviluppo di terapie geniche e nucleotidi antisenso (Sandu, J.S., 1997);

4. sviluppo di sistemi di direzionamento e rilascio del farmaco per rendere la terapia più selettiva nei confronti del tumore.

Le categorie di chemioterapici attualmente in commercio o in via di sviluppo comprendono inibitori della replicazione cellulare e della sintesi del DNA (*cross-linkanti*, alchilanti, DNA-intercalanti, antimetaboliti e precursori), inibitori delle topoisomerasi e antibiotici-antitumorali, sostanze stabilizzanti o destabilizzanti per i microtubuli, inibitori enzimatici, antagonisti recettoriali. Alcuni nuovi farmaci non interferiscono direttamente con il DNA, tra questi agenti troviamo gli anticorpi monoclonali e gli inibitori delle tirosinchinasi (Gleevec) che mirano a colpire target specifici presenti su alcuni tipi di cellule tumorali. Altri farmaci modulano le caratteristiche delle cellule tumorali senza attaccarle direttamente, all'interno di questa categoria di adiuvanti ricadono gli ormoni.

3.1.1 Limiti della chemioterapia

Il problema principale della chemioterapia è che la maggior parte dei farmaci antitumorali entra in modo aspecifico in tutti i tipi di cellule, sia sane che malate, determinando gravi effetti collaterali che spesso causano un drastico peggioramento della vita del paziente e nei casi più gravi anche la morte. La tossicità specifica di farmaci antitumorali è legata alla mancanza di target specifici delle cellule tumorali. Se è infatti relativamente semplice sviluppare un antibiotico, in quanto è possibile sfruttare una tossicità selettivamente diretta contro cellule procariotiche, che si differenziano da quelle eucariotiche per numerosi meccanismi biochimici, trovare una molecola che sia selettivamente tossica per le cellule tumorali è molto più difficile, perché in esse hanno luogo essenzialmente gli stessi eventi biologici delle cellule sane e le differenze nei meccanismi biochimici e molecolari sono minime (Maeda, H., 2009). Di conseguenza la diffusione del farmaco in diversi organi può causare danni cellulari e tissutali.

Le cellule normali più colpite dai farmaci antitumorali sono quelle in rapida proliferazione, come quelle dei bulbi piliferi, i globuli rossi, i globuli bianchi e le cellule dell'epitelio intestinale. Gli effetti collaterali che si manifestano più frequentemente sono ricollegabili all'azione citostatica sulle cellule del midollo osseo e sono mielosoppressione, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, anemia e danni a carico del sistema immunitario, con esposizione del paziente a patologie indotte da microorganismi. Si possono poi presentare ulcerazioni delle mucose della bocca e dell'intestino con predisposizione a sepsi batterica del tratto intestinale (in caso di immunosoppressione); fibrosi polmonare; occlusione venosa del fegato; neurotossicità e ototossicità; alopecia; nausea, vomito, diarrea o costipazione; cardiotoxicità, epatotossicità e nefrotossicità. Possono verificarsi anche eritemi, perdita dell'appetito con conseguenti malnutrizione e diminuzione di peso. In alcuni casi si ha anche perdita di memoria e senso di vertigine, disidratazione o ritenzione idrica, xerostomia ed emorragie.

Per affrontare questi problemi si ricorre ad una terapia di sostegno che può prevedere: trasfusione di piastrine, di sangue intero, o anche trapianto di midollo osseo; somministrazione di allopurinolo per prevenire l'iperuricemia, fattori di accrescimento ematopoietici, per contrastare la perdita di globuli rossi e di neutrofili; antibiotici a largo spettro per evitare infezioni batteriche e antiemetici potenti come gli antagonisti 5-HT₃ o inibitori della sostanza P come aprepitant (Gralla, R., 2005) o anche derivati del THC (tetraidrocannabinolo), come il Marinol.

Un altro limite della terapia chemioterapica è il fatto che ogni trattamento consente di eliminare solo una frazione di cellule (*fractional kill*), per cui servono continue somministrazioni e più cicli chemioterapici per evitare la ricrescita del tumore e continuare a ridurre le dimensioni. La messa a punto di efficaci protocolli terapeutici è comunque complicata dalla diversa evoluzione ed andamento fisiopatologico dei tumori, dalla diversa gravità patologica e dalla variabilità individuale.

Pertanto l'implemento del profilo terapeutico del farmaco, ridurre la tossicità sistemica, aumentarne la selettività, migliorarne la *compliance*, ridurre la frequenza di somministrazione, diminuendo la dose e aumentando l'assorbimento rappresentano obiettivi primari nello sviluppo di sistemi antitumorali efficienti.

Un ulteriore limite dei trattamenti chemioterapici è lo sviluppo di resistenza, dovuto all'eterogeneità delle cellule neoplastiche e alla pressione selettiva, che spiega il fallimento delle cure antitumorali condotte usando un solo farmaco.

Può anche succedere che il paziente risponda inizialmente bene alla terapia, ma che, a seguito di recidiva del tumore, lo stesso farmaco o anche altri con struttura diversa possano risultare del tutto inefficienti.

In linea di massima la ridotta efficacia di un farmaco può essere attribuita alla sua ridotta concentrazione intracellulare, all'acquisizione da parte delle cellule tumorali della capacità di riparare il danno o a mutazioni che modificano il target. Questi eventi si verificano grazie a sovraespressione di pompe energia dipendenti che permettono l'estrusione del farmaco, come la proteina P, oppure grazie ad altri sistemi di controllo; attraverso processi biochimici che aumentano la conversione del farmaco attivo in metabolita inattivo; con sistemi più veloci di riparazione del danno al DNA; attraverso una riduzione della concentrazione intracellulare del bersaglio.

Tutti questi processi biologici portano allo sviluppo di cloni sempre più diversi dalla cellula originaria e resistenti non solo al farmaco con cui sono entrate in contatto, ma anche ad altri appartenenti a categorie diverse.

L'unico modo per cercare di arginare questo problema è utilizzare degli analoghi che vadano ad interagire con i sistemi molecolari di estrusione, come la proteina P, in modo da evitare un rapido sviluppo della resistenza (analoghi non citotossici delle antracicline e degli alcaloidi della Vinca, calcio antagonisti, inibitori della calmodulina e analoghi della ciclosporina). Tuttavia anche utilizzando queste molecole restano attivi gli altri meccanismi di sviluppo di resistenza crociata.

3.2 CARATTERISTICHE DEL TESSUTO TUMORALE

Pertanto, studi sulla cancerogenesi sono stati condotti per sviluppare una terapia antitumorale maggiormente selettiva attraverso l'individuazione delle differenze nella costituzione genetica, nell'attività enzimatica e nella cinetica di crescita fra le cellule sane e quelle tumorali. Sfortunatamente nessuna di queste

differenze è esclusiva oppure comune a tutti i tumori e i farmaci attualmente conosciuti non sono comunque in grado di sfruttarle.

I tessuti tumorali presentano numerose differenze con quelli sani, tra queste le più importanti sono l'amplificazione del corredo enzimatico, l'alterazione del potenziale ossido riduttivo, l'incremento della temperatura tissutale e l'abbassamento del pH. Vi sono poi alterazioni morfofunzionali a carico della vascolarizzazione e del sistema linfatico, in particolare i vasi ematici risultano più permeabili e il drenaggio della linfa insufficiente.

Abbassamento del pH: L'abbassamento del pH nel tessuto tumorale è principalmente dovuto alla produzione di acido lattico, l'idrolisi di ATP conseguente ad una situazione di ipossia e all'abnorme funzionamento della pompa Na^+/H^+ . Questo sistema di antiporto sembra rivestire una particolare importanza. È stato infatti asserito che cellule mutanti prive dell'attività di scambio Na^+/H^+ non sono in grado, o hanno comunque una ridotta capacità, di generare tumori solidi. Questo può essere spiegato dal fatto che le cellule prive della pompa Na^+/H^+ sono incapaci di creare le condizioni acide durante la crescita del tumore.

Il diverso di pH che si stabilisce tra i tessuti sani e quelli tumorali può essere sfruttato per realizzare una azione sito-specifica di farmaci antitumorali. Ad esempio, un farmaco acido debole è in dissociato e quindi relativamente lipofilo ad un pH acido come quello del sito tumorale potrà attraversare agevolmente la membrana cellulare. Una volta nelle cellule si deprotona accumulandosi al suo interno (Tannock, I.F., 1989).

Sistema vascolare: I tumori si sviluppano da un'unica cellula neoplastica raggiungendo una massa di circa 150-200 nm. Raggiunta tale dimensione, la parte centrale del tumore rimane in ipossia privo di sostanze nutritive. Per potersi sviluppare ulteriormente il tumore ha quindi bisogno di nuovi vasi, che si generano attraverso il meccanismo di angiogenesi da quelli già esistenti.

La rapida replicazione delle cellule tumorali richiede abbondanza di ossigeno e nutrienti, che vengono garantiti attraverso un ricco ed esteso sistema vasale. Per questo motivo l'angiogenesi a livello del tessuto tumorale è particolarmente attiva ed estesa (Folkman, J., 1992). Questo porta alla formazione di una fitta rete di

vascolarizzazione costituita da vasi con endotelio incompleto e con ampie fenestrazioni e quindi particolarmente permeabile.

I vasi neoformati presentano caratteristiche diverse da quelli presenti nei tessuti sani per composizione cellulare della parete endoteliale, forma della membrana basale e per le dimensioni delle fenestrazioni. I vasi sanguigni neoformati sono privi di periciti, che sono i regolatori della maturazione e differenziazione dei capillari. La permeabilità è estremamente elevata, non solo per l'aumentata larghezza delle giunzioni intercellulari e per l'incompletezza della membrana basale, ma anche per la presenza di numerosi fattori di permeabilizzazione.

Drenaggio linfatico: I vasi linfatici nei tessuti si formano come terminazioni capillari delimitati da un singolo strato di endotelio. Possiedono giunzioni endoteliali larghe e sono permeabili alle macromolecole provenienti dal fluido interstiziale. Il fluido linfatico viene drenato da una serie di vasi linfatici e linfonodi riversandosi nella circolazione venosa. Nei tessuti tumorali manca un sistema organizzato di drenaggio linfatico. Pertanto le macromolecole in grado di fuoriuscire dai vasi sanguigni ed entrare nel tumore, ma che non riescono ad entrare nella circolazione post capillare, non possono essere drenate in alcun modo. Inoltre non essendo in grado di diffondere all'interno del tumore per riemergere in superficie, restano confinate in profondità nella massa tumorale. Questo impedimento al movimento dei fluidi nel tessuto genera una contropressione che può portare al collasso dei capillari del tessuto canceroso con formazione di zone ipossiche ed anossiche e conseguente insorgenza di foci necrotiche all'interno del tessuto neoplastico stesso.

3.3 TARGETING DI FARMACI ANTITUMORALI

3.3.1 Direzioneamento passivo nei tessuti tumorali: effetto EPR.

L'effetto EPR (*enhanced permeability and retention*), è caratteristico di tutti i tumori solidi, ad eccezione di quelli ipovascolarizzati localizzati a livello di prostata e pancreas. Tale effetto è un processo di accumulo di strutture colloidali nelle masse tumorali attraverso meccanismi passivi legati alla elevata vascolarizzazione ed al

ridotto drenaggio linfatico del tessuto tumorale, Questo fenomeno ha come conseguenze una maggior extravasazione del farmaco nel tessuto tumorale e una permanenza nel sito di azione anche di molte settimane (Maeda, H., 2000).

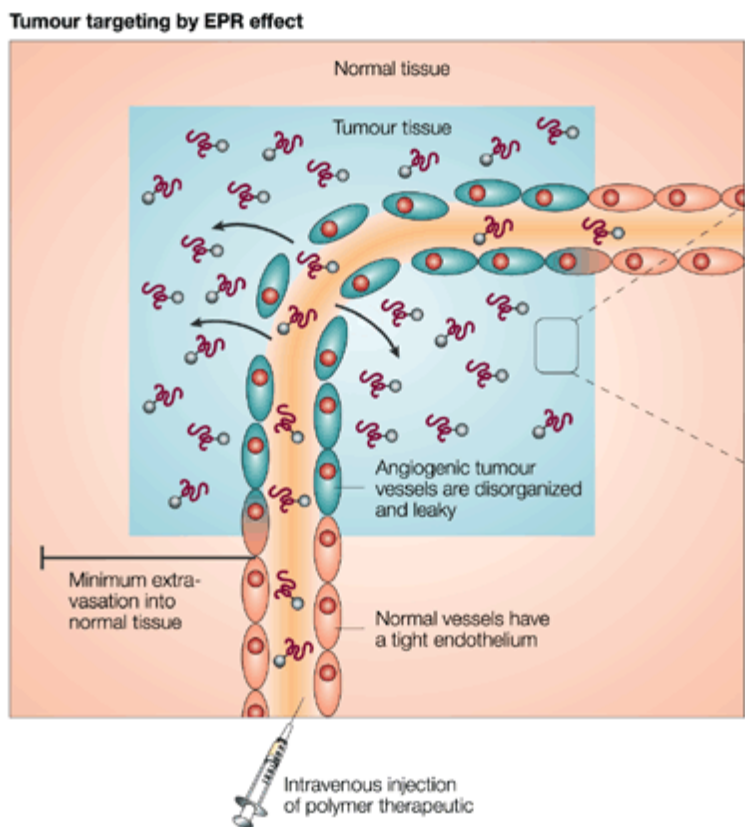


Figura 3.1: Effetto EPR (adattata da Duncan R., 2003)

Tale fenomeno è stato osservato anche per polimeri come l'idrossipropilmetacrilamide (HPMA), il polietilenglicole, il polivinilalcol, e alcuni sistemi complessi quali il Lipiodol, oli vegetali e liposomi (Duncan, R., 1996, Seymour, L.W., 1995). Non si osserva effetto EPR per molecole di massa inferiore ai 30 kDa, anche se si è osservato accumulo nel tumore di un coniugato formato da un copolimero di anidride maleica e stirene (SMA) legato ad un agente anticancro, la neocarzinostatina (NCS), con peso molecolare di 16 kDa (Maeda, H., 1985). Tale coniugato subisce effetto EPR poiché *in vivo* lega l'albumina plasmatica, raggiungendo un PM finale di 80 kDa.

Oltre all'ipervascolarizzazione, all'irregolarità dell'architettura endoteliale e all'aumentata permeabilità vascolare il tessuto tumorale è caratterizzato anche da

flusso sanguigno incostante per direzione e volume e un lento ritorno venoso che determina, assieme alla ridotta *clearance* linfatica, accumulo di farmaci macromolecolari e particelle lipidiche negli interstizi tumorali.

Un'altra alterazione nella struttura vasale coinvolta nell'effetto EPR è l'alterazione della muscolatura liscia vasale, che normalmente riveste un ruolo importante nella regolazione del flusso e della pressione sanguigni. È stato dimostrato che quando si induce ipertensione per infusione di angiotensina II (AT-II) il controllo omeostatico del flusso sanguigno non viene mantenuto, come invece accade nei tessuti normali, e si ha un aumento del volume di sangue. Questo sembra essere dovuto alla perdita, nei vasi sanguigni tumorali, delle cellule muscolari a ridosso dell'endotelio e dei recettori per l'AT-II. Conseguentemente in caso di ipertensione il letto vascolare risulta dilatato e le giunzioni endoteliali aperte. Pertanto l'induzione di uno stato ipertensivo sembra aumentare l'effetto EPR e quindi favorire il passaggio di macromolecole nel tessuto tumorale dove si ha un aumento del volume ematico. Al contrario nei tessuti sani si ha vasocostrizione e restringimento delle fessurazioni endoteliali con conseguente diminuzione dell'extravasazione di macromolecole. Questi dati giustificherebbero l'idea di una chemioterapia in fase di ipertensione indotta da AT-II, che, come si è visto in modelli animali, permetterebbe di raggiungere alte concentrazioni di farmaco a livello del tumore in soli 20 minuti. Anche gli ACE-inibitori, impedendo la degradazione di bradichinina, che attiva la NOS, sembrano aumentare l'effetto EPR. E' possibile invece inibire tale effetto con l'uso, ad esempio, di inibitori della bradichinina. (Maeda, H., 1999).

Un ruolo importante nell'angiogenesi è svolto dal fattore di crescita endoteliale, VEGF, che è responsabile della differenziazione della struttura vascolare. Nei tumori il VEGF promuove una rapida e casuale crescita dei vasi, che però risultano incompleti e di conseguenza altamente permeabili. Inoltre nei tessuti tumorali la permeabilità vascolare indotta anche da vari mediatori attivamente rilasciati in questi tessuti come ad esempio bradichinina, NO (Wu, J., 1998), VPF (*vascular permeability factor*), VEGF (*vascular endothelial grow factor*) ed altre citochine (Senger, D.R., 1983, Leung, D.W., 1989), prostaglandine che coinvolgono la ciclossigenasi (Wu, J., 1998) e metalloproteasi (Wu, J., 2002). La presenza di

questi mediatori è spesso dovuta, come nei tessuti infiammati, all'infiltrazione di leucociti, macrofagi e neutrofili. La produzione di NO è determinata anche da bradichinina e VEGF tramite attivazione dell'NOS. Inoltre derivati del monossido d'azoto, come il prodotto di ossidazione (perossinitrito), possono attivare le metalloproteasi della matrice (MMP) o le collagenasi (Okamoto, T., 1997) che sono in grado di aumentare l'angiogenesi e la permeabilità vasale, facilitando la rapida crescita tumorale e la metastasi. L'importanza dell'NO per l'effetto EPR è stata approfondita da Maeda et collaboratori i quali ne hanno dimostrato l'incremento per somministrazione di L-Arginina, che è il substrato della NOS per la produzione di NO.

L'effetto EPR è anche correlato a numerosi meccanismi coinvolti nella proteolisi vascolare quali ad esempio la mancata inibizione dell'elastasi derivata dai neutrofili dovute all'azione dell' α 1-inibitore delle proteasi causando stress ossidativo e da parte del perossinitrito che si forma per una rapida reazione tra NO e anione superossido e l'attivazione della collagenasi ed delle altre metallo proteine (Moreno, J.J., 1992). È stata inoltre descritta l'attivazione della cascata generata dalla bradichinina attraverso le MMP che coinvolge l'attivazione della kallikreina. Maeda riporta che la plasmina può scatenare la cascata kallikreina-kinina nel tessuto tumorale e che quasi tutti i tipi di tumori solidi esprimono recettori per il plasminogeno con conseguente iperproduzione di plasmina (Matsmura, 1991). È stato dimostrato che le MMP possono attivare il plasminogeno per produrre miniplasmina che può a sua volta attivare la precallicreina.

Fra i fattori nel tessuto tumorale che inducono il rilascio di mediatori dell'infiammazione, responsabili della proteolisi, vi sono le prostaglandine, l'NO e la bradichinina, che si influenzano reciprocamente.

La sola differenza tra i normali processi infiammatori e l'effetto EPR è la durata del periodo di ritenzione: breve nel primo caso (pochi giorni), lungo nel secondo (settimane). Questo perché alla struttura vasale anormale, incompleta e permeabile (Skinner, S.A., 1991) si accompagna un ridotto drenaggio linfatico dagli spazi interstiziali delle masse tumorali.

Pertanto l'abbondante ma anomala vascolarizzazione favorisce l'accumulo nei tessuti tumorali di macromolecole come proteine plasmatiche, farmaci

macromolecolari e nanoparticelle lipidiche e il ridotto drenaggio linfatico fa in modo che vengano trattenute nel sito tumorale per un più lungo periodo rispetto ai tessuti normali. (Maeda, H., 2009).

Pertanto l'effetto EPR correlato alla specifica architettura dei vasi nei siti tumorali risulta essere un punto chiave per il *delivery* selettivo di farmaci macromolecolari anticancro.

3.3.2 Direzioneamento attivo: recettori tumorali come ligandi

Il direzioneamento attivo di farmaci rappresenta uno degli approcci più interessanti per l'ottenimento di efficaci sistemi terapeutici soprattutto con applicazioni antitumorali. Sistemi direzioneanti sono ottenuti mediante inserimento nella struttura macromolecolare del *carrier* di molecole in grado di riconoscere specifici recettori cellulari

L'acido folico, il galattosio e piccoli peptidi sono stati ampiamente studiati per la realizzazione del *targeting* attivo. L'elevata affinità di questi ligandi per recettori biologici, principalmente di membrana, permette una biodistribuzione selettiva del sistema macromolecolare e in alcuni casi promuove l'internalizzazione cellulare. Interessanti risultati sono stati ottenuti impiegando ligandi che vengono endocitati dopo riconoscimento con il proprio recettore di membrana, come l'acido folico (Lee, E.S., 2003). In questo modo tutto il sistema sovramolecolare penetra nella cellula con il carico di farmaco. Tali sistemi, oltre a favorire l'accumulo sito-specifico nel tessuto target e ridurre la distribuzione e tossicità sistemica, consente spesso di eludere la resistenza intrinseca acquisita o *multidrug-resistance*.

Lo sviluppo di nuovi *carrier* per il *targeting* attivo è strettamente correlato alla distribuzione e sovraespressione di specifici recettori ed ai meccanismi cellulari di *uptake* dei sistemi di drug delivery che spesso sono coinvolti recettori cellulari di superficie (proteine transmembrana) o epitopi di superficie che modulano l'endocitosi mediata da recettori (RME). Le cellule in metastasi hanno un'attività metabolica molto elevata, che richiede abbondanza di substrati fisiologici e di molecole ad azione regolatoria. Per questo sono necessari numerosi fattori vitali, che sono in genere trasportati all'interno della cellula secondo un meccanismo di RME.

Di conseguenza vi è una sovraespressione dei recettori nel tessuto tumorale e questa rappresenta l'unica differenza che possiamo sfruttare per un *targeting* attivo anticancro. Possono essere così preparati *carrier* specifici che tengano conto sia della sovraespressione di recettori specifici per ligandi endogeni come transferrina, folato, fucosio, mannosio e lipoproteine, che di recettori di regolazione dei ligandi endogeni esposti sulla superficie esterna della membrana citosolica (ASGRr, mannosio), sia dei sistemi d'ingresso a loro associati.

L'endocitosi è un processo cellulare che permette l'internalizzazione di porzioni di membrana plasmatica, con conseguente assorbimento di fluido extracellulare e serve per assimilare varie molecole dal liquido extracellulare. Si riconoscono diversi meccanismi attraverso cui le sostanze extracellulari possono essere internalizzate: il materiale particolato viene assorbito per fagocitosi, mentre i piccoli soluti e le vescicole di fluido extracellulare subiscono pinocitosi (Schwartz, A.L. 1995).

Farmaci liberi e direzionati da *carriers* entrano in modo diverso nella cellula: il farmaco libero infatti usualmente penetra per trasporto trans-membrana (diffusione) o assorbimento non specifico per pinocitosi, mentre il sistema farmaco-*carrier*-direzionante è strettamente legato al meccanismo recettoriale. Quando trasportati per diffusione, i farmaci raggiungono il citoplasma della cellula, mentre tutti i processi di pinocitosi sono lisosomotropici. In ogni caso la velocità e la specificità di *uptake* mediato da recettore risultano superiori.

Nel corso degli anni sono stati scoperti numerosi ligandi endogeni ed esogeni in grado di mediare il processo di endocitosi quali LDL, fattori di crescita (EGF, insulina), virus (influenza), tossine (difterite) e ligandi macromolecolari a carica negativa (Rihova, B. 1998).

Le strutture recettoriali di membrana coinvolte nei processi di endocitosi sono varie, ma tutte possiedono un dominio idrofilico extracellulare (dominio di legame con il ligando), che contiene un sito per la glicosilazione. Alcuni processi di internalizzazione sono clatrina indipendenti e, come i processi di macropinocitosi, sembrano coinvolgere componenti del citoscheletro. In altri casi avvengono in aree specifiche della superficie cellulare denominate "*coated pits*" grazie ad un processo di vescicolazione che non comporta coinvolgimenti del citoscheletro e che viene

mediato da clatrina (Robinson, M.S., 1994). Una volta che si è formato il complesso ligando-recettore possono essere seguiti diversi percorsi, a seconda del sistema recettoriale e dei tipi di cellule coinvolte nell'interazione.

In alcuni casi i recettori possono trasportare il ligando all'interno della cellula e migrare successivamente al proprio dominio di membrana, oppure essere indirizzati ad un diverso dominio (transitosi). In altri casi invece il recettore viene spostato assieme al ligando verso i lisosomi in cui ligando e recettore seguono un destino comune. In seguito all'internalizzazione cellulare, il sistema ligando-recettore viene indirizzato verso un compartimento acido attraverso un meccanismo di maturazione e fusione. Questo compartimento prelisosomiale (compartimento di scissione ligando-recettore, CURL) è detto endosoma o recettosoma (Stoorvogel, W., 1991). Nel compartimento endosomiale avvengono numerosi processi che determinano la migrazione del *carrier* verso la destinazione finale. Alcuni processi che avvengono a livello degli endosomi, come la dissociazione del complesso ligando/recettore e la parziale idrolisi del sistema macromolecolare, possono essere indotte dal pH lievemente acido che caratterizza tali vescicole: infatti il pH delle vescicole di endocitosi è compreso tra valori di 6 e 6.5, mentre negli endosomi scende tra 5 e 6 e nel sistema lisosomiale infine il pH è compreso tra 4 e 5.

La liberazione del farmaco attivo dalle strutture carrier è fondamentale affinché il sistema di *delivery* risulti farmacologicamente efficace. La membrana lisosomiale, come ogni membrana plasmatica, è una barriera naturale per le molecole ad alto peso molecolare. Quindi solo molecole piccole sono in grado di lasciare i lisosomi e di svolgere la propria azione nel comparto citosolico.

3.3.2.1 Acido folico

Il recettore per il folato è un interessante target per il *delivery* selettivo di farmaci antitumorali (Campbell, I.G. 1991, Weitman, S.D. 1992). Questo recettore viene sovraesposto in numerosi tipi di tumori, ed è stato identificato come *marker* per il carcinoma ovarico.

L'acido folico (Figura 3.2) è una vitamina a basso peso molecolare che è necessaria alle cellule eucariote per la sintesi dei nucleotidi purinici; non avendo nel

loro corredo enzimatico l'enzima necessario per la biosintesi del folato la loro sopravvivenza e proliferazione dipende dalla capacità di acquisirlo da fonti esogene.

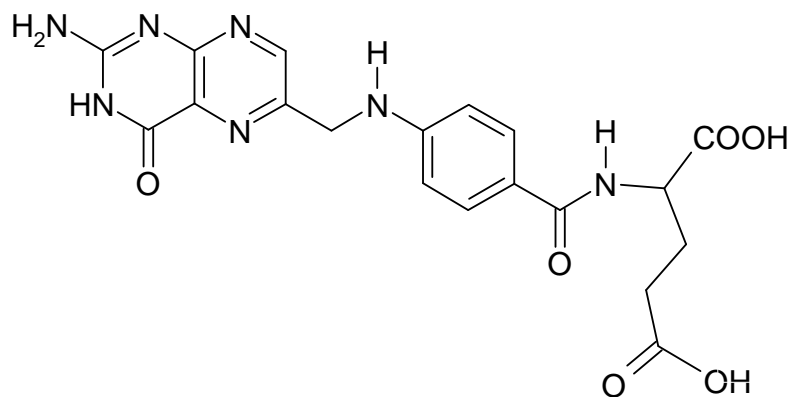


Figura 3.2: Struttura dell'Acido folico

Il trasporto passivo di acido folico attraverso le membrane cellulari in condizioni fisiologiche è minimo: l'acido folico presenta, infatti, due gruppi carbossilici che si deprotonano: la molecola allo stato ionico è scarsamente permeabile alla membrana. Per questo motivo esistono due diversi meccanismi cellulari per l'uptake della vitamina. Il primo meccanismo è regolato da una proteina di trasporto transmembrana a bassa affinità che trasporta il folato ridotto direttamente nel citosol (Antony, A.C. 1992). Il secondo meccanismo coinvolge invece una glicoproteina ad alta affinità, nota come recettore per il folato (FR), che è responsabile dell'endocitosi del folato in forma ossidata (Kamen, B.A. 1986).

Il recettore per il folato è una glicosilfosfatidilinositolo glicoproteina di membrana, con un peso molecolare di 38-40 kDa (Antony, A.C. 1996). Nell'uomo sono state isolate due isoforme recettoriali, α e β : la forma α ha una costante di dissociazione K_d per l'acido folico di 0,1 nM, almeno 10 volte inferiore di quella per il folato ridotto (Wang, X. 1992).

Il meccanismo di internalizzazione del recettore per il folato non è ancora stato chiarito: gli FR si trovano in regioni della membrana non rivestite, dette

caveole. La localizzazione e l'internalizzazione del recettore può essere indotta dal crosslinking del recettore ed è regolata dal colesterolo. Una volta avvenuta la formazione del complesso ligando-recettore si attiva un meccanismo di trasporto clatrina-indipendente che porta alla formazione di vescicole che vengono internalizzate per endocitosi. Una volta formato l'endosoma il pH lievemente acido favorisce la dissociazione del sistema ligando-recettore, permettendo il rilascio della molecola di folato. Questo meccanismo, detto "potocitosi" (Anderson, R.G. 1992) permette l'ingresso e quindi l'aumento di concentrazione del folato nella cellula.

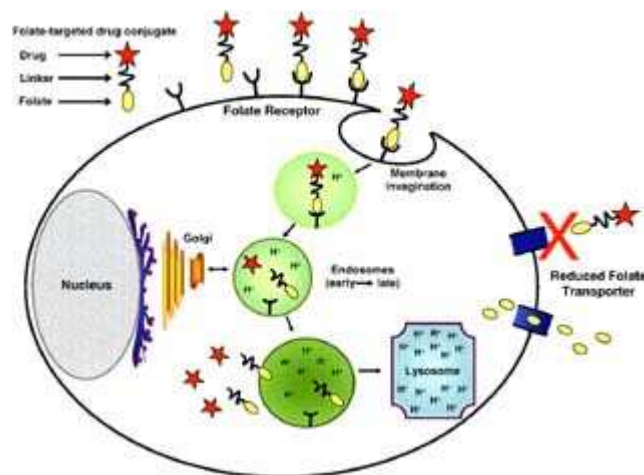


Figura 3.3: Endocitosi mediata da recettori dei coniugati del folato. I coniugati esogeni del folato si legano in modo specifico al recettore per il folato (FR) sulla superficie della cellula bersaglio con affinità dell'ordine delle nanomoli. La membrana plasmatica si invagina attorno al complesso folato-FR per formare endosomi. Quando all'interno dell'endosoma si instaura un pH acido, il coniugato e il farmaco vengono rilasciati dal recettore nel citosol.

L'espressione di FR nei tessuti normali è molto bassa: è presente nel plesso corioideo e nella placenta, a bassi livelli nella tiroide e nei reni, ed è praticamente assente altrove (Weitman, S.D. 1992). FR viene spesso ritrovato invece in molti tessuti tumorali. Più del 90% dei carcinomi ovarici manifestano sovraespressione di FR (Garin Chesá, P. 1993). Servendosi di un anticorpo monoclonale, LK26 per il recettore di tipo α , si è determinata la frequenza di sovraespressione di FR nei tumori umani. La marcatura immunocitochimica ha evidenziato che su 56 casi di carcinoma ovarico 52 presentano sovraespressione per FR, mentre nel caso di carcinoma

endometriale, è stata riscontrata in 10 casi su 11. Risultati analoghi si sono ottenuti per altri tipi di carcinomi: colonrettale (6 su 27), del seno (11 su 53), polmone (6 su 18), renale (9 su 18), metastasi cerebrali (4 su 5) e carcinomi neuroendocrini (3 su 21).

Sebbene la sovraespressione di FR nei tumori è legata all'elevata attività metastatica di queste cellule, si osservato la sopravvivenza e la crescita cellulare sia in vivo che in vitro in cellule NIH/3T3 che sovraesprimono anche in terreni poveri di folato FR (Bottero, F. 1993). Elevati livelli di FR sono associati ad una aumentata aggressività del carcinoma ovarico, che si manifesta in aumentata resistenza ai chemioterapici (Toffoli, G. 1997).

Poiché il recettore per il folato è ampiamente espresso in diversi tipi di tumore, è considerato un buon bersaglio per il direccionamento selettivo di farmaci antitumorali. La preparazione di nuovi carrier selettivi per FR è facilitata dal fatto che il folato mantiene la sua affinità per il recettore anche quando il gruppo γ -carbossilico è coinvolto in legami con altre molecole ad esso coniugate. La formazione di un coniugato tra l'acido folico e altre molecole non modifica la capacità di internalizzazione da parte dei recettori per il folato, purchè il legame avvenga col carbossile in γ e non a quello in α (Leamon, C.P. 1991). In questo modo si ha una valida alternativa agli anticorpi monoclonali, che mantiene le capacità di direzionare i farmaci al sito specifico di azione.

3.4 SISTEMI DI DRUG DELIVERY

3.4.1 Ciclodestrine

Le ciclodestrine sono prodotti naturali costituite da unità glucopiranosiche legate in forma ciclica a formare strutture a tronco di cono. Oltre ad alcuni oligosaccaridi ciclici minori, le ciclodestrine comprendono 3 prodotti naturali principali, definiti α -ciclodestrine, formate da sei residui glucosidici, β -ciclodestrine, formate da sette residui, e γ -ciclodestrine, che presentano otto residui.

I gruppi ossidrilici secondari dei glucopiranosio (C_2 e C_3), sono situati a livello del margine che delinea l'estremità più larga del toroide mentre gli ossidrili primari (C_6) si trovano attorno al margine inferiore, ossia quello più stretto. La struttura ciclica è a forma di tronco di cono, la cui cavità (idrofobica) è costituita dagli atomi di idrogeno e dai legami idrogeno tra gli H e gli O glicosidici. Il lato che ospita i gruppi ossidrilici secondari ha un diametro maggiore rispetto a quello con gli ossidrili primari, poiché a questi è consentita una libera rotazione che causa la riduzione del diametro (Figura 3.4)

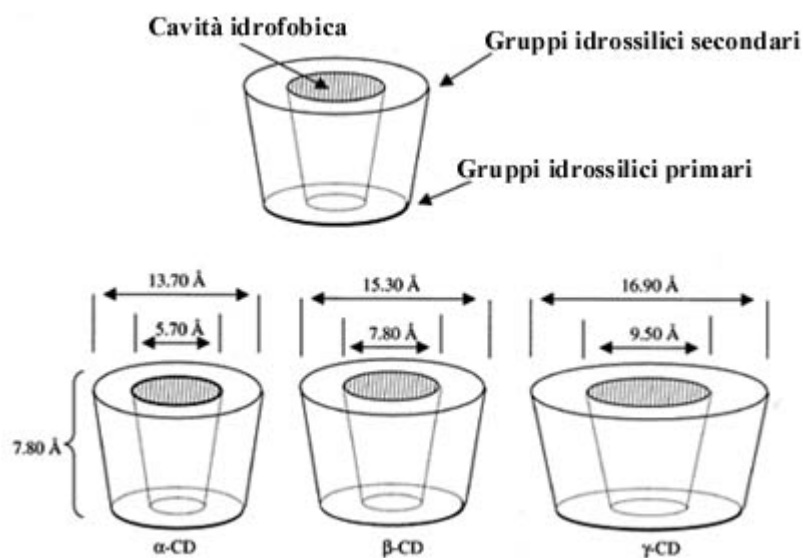


Figura 3.4: Struttura delle ciclodestrine

Gli elettroni di non legame dell'ossigeno glicosidico sono localizzati a livello della cavità, originando un'elevata densità elettronica che conferisce un carattere di base di Lewis. L'ossidrile in posizione 2 del glucopiranosio può formare un legame idrogeno con l'ossidrile in posizione 3 dell'unità adiacente. La formazione di questi legami a idrogeno è alla base della struttura rigida delle ciclodestrine ed è causa della bassa solubilità delle β -ciclodestrine in acqua. Tale ciclo di legami idrogeno è incompleto nelle α -ciclodestrine perché un'unità glucopiranosica è in posizione distorta per cui si possono formare solo quattro legami idrogeno. Le γ -ciclodestrine invece presentano una struttura non planare più flessibile e per questo risultano essere le ciclodestrine più solubili in acqua.

In soluzione acquosa la cavità delle ciclodestrine viene occupata da molecole d'acqua: trattandosi però di una interazione tra una molecola polare ed una apolare l'acqua può essere facilmente sostituita da altre molecole. Quello che determina la formazione del complesso è la sostituzione delle molecole d'acqua con altre molecole a polarità più bassa. La cavità delle ciclodestrine può ospitare varie molecole a seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche. La forza trainante della formazione del complesso è determinata da fattori entropici (spostamento di molecole d'acqua) ed entalpici (interazioni idrofobiche tra il core delle ciclodestrine e la molecola inclusa). Il complesso viene quindi stabilizzato dalle forze di Van der Waals e da legami idrogeno.

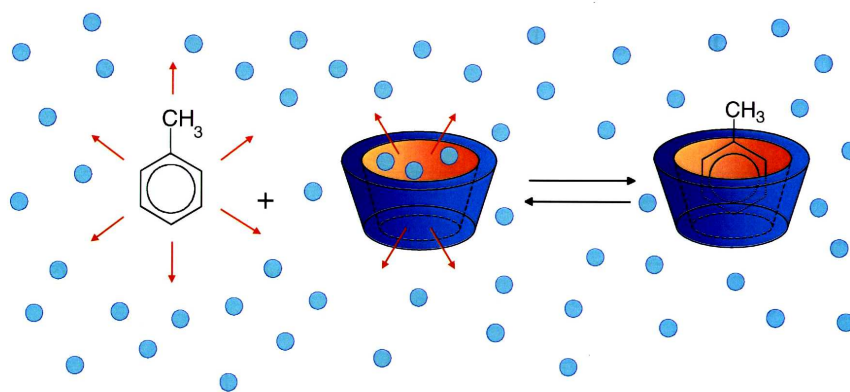
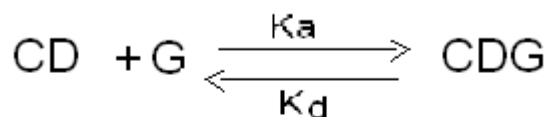


Figura 3.5: inclusione di molecole *host* in ciclodestrine

L'affinità di una molecola per la cavità delle ciclodestrine dipende dalle sue dimensioni, dal suo rapporto idrofobicità/idrofilicità ed anche dalle dimensioni della

ciclodestrina usata. Si è constatato che sono i fattori geometrici più che quelli chimici a determinare quale tipo di molecola avrà l'affinità maggiore per la ciclodestrina scelta. I diversi tipi di ciclodestrine presentano diametri interni diversi e quindi saranno in grado di accogliere molecole diverse, che si orienteranno nella cavità in modo da offrire la massima superficie di contatto della porzione idrofobica con la frazione apolare della cavità interna. La parte idrofila invece rimane all'esterno, assicurando il massimo contatto con il solvente e i gruppi ossidrilici della ciclodestrina (Fromming, K.H., 1993). Il caso più frequente di inclusione è quello in cui le ciclodestrine e la molecola ospite sono in rapporto 1:1. Si parla allora di incapsulamento molecolare. Esistono comunque rapporti 2:1 e 1:2 oppure 2:2 o di grado maggiore.

I complessi d'inclusione possono essere isolati allo stato cristallino: l'associazione tra ciclodestrina e la molecola ospite (G) e la dissociazione del complesso ciclodestrina-guest sono governate da un equilibrio termodinamico espresso da una costante K_a (costante d'associazione), esprimibile anche come $K_d = 1/K_a$ (costante di dissociazione).



$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{[\text{CDG}]}{[\text{CD}] [\text{G}]}$$

La costante di associazione del complesso ciclodestrina-farmaco (K_a) varia entro un ampio range, tra 1 e 10^{-8} M, e l'associazione è in funzione della temperatura, della forza ionica e del pH (Szejtli, J. 1998).

La formazione di un complesso tra le ciclodestrine e molecole scarsamente solubili, in soluzione acquosa, porta a diverse variazioni chimico-fisiche della molecola ospite (Szejtli, J. 1998). Inizialmente si verifica un aumento della solubilità della molecola ospite all'aumentare della concentrazione delle ciclodestrine. Inoltre la reattività della molecola inclusa risulta modificata: le ciclodestrine possono ridurre

alcune reazioni di degradazione della molecola inclusa, ma in alcuni casi possono svolgere un ruolo catalitico accelerando la degradazione e modificando le cinetiche di reazione. La formazione del complesso può essere inoltre sfruttata per diminuire la diffusione, la volatilità e la sublimazione del *guest*.

L'interazione con le ciclodestrine porta anche ad una variazione del comportamento cromatografico e delle proprietà spettroscopiche della molecola ospite (UV-Vis, fluorescenza, $^1\text{H-NMR}$, dicroismo circolare).

La ciclodestrina naturale più comune è la β -ciclodestrina, che ha 7 gruppi ossidrilici primari e 14 secondari. Tali ossidrili sono stati modificati per introdurre gruppi funzionali in grado di modificarne le proprietà chimico-fisiche e la capacità di formare complessi di inclusione.

L'utilizzo delle ciclodestrine come carrier per farmaci è limitato dalla loro bassa solubilità in acqua. Sono stati sviluppati derivati idrossialchilati, sulfoalchilati e glicosilati delle β -ciclodestrine per cercare di risolvere questo problema. Il grado di sostituzione degli ossidrili deve essere controllato, per garantire un equilibrio tra la solubilità in acqua e il potere complessante: l'aumento del grado di sostituzione causa ingombro sterico, che può rappresentare un limite per l'ingresso della molecola ospite nella cavità della ciclodestrina.

In tecnologia farmaceutica le ciclodestrine vengono soprattutto impiegate per aumentare la solubilità in acqua di farmaci attraverso la formazione di complessi di inclusione. La capacità di solubilizzazione delle ciclodestrine può essere valutata quantitativamente con il metodo di solubilità di fase sviluppato da Higuchi e Connors (Higuchi, T. 1965). Possono essere sfruttate altre tecniche che valutano cambiamenti macroscopici della molecola inclusa o delle ciclodestrine prima e dopo la formazione del complesso.

Il grado di sostituzione può influenzare la capacità di solubilizzazione delle ciclodestrine: la 2-idrossipropil- β -ciclodestrina è un derivato idrossialchilato molto comune, ma le sostituzioni possono causare ingombri sterici che rendono difficile la sistemazione delle molecole all'interno della sua cavità (Pitha, J. 1986).

Le ciclodestrine sono ampiamente usate per la loro capacità protettiva di molecole instabili in prevalenza in ambiente acquoso. Le ciclodestrine sostanzialmente sottraggono le molecole incluse agli equilibri di degradazione. Un

esempio è la riduzione di 220 volte l'idrolisi a pH 4,8 della O⁶-benzilguanina, un farmaco antitumorale che subisce idrolisi acido catalizzata mediante complessazione con la sulfo-butil- β -ciclodestrina. Tuttavia, le ciclodestrine sono in grado di influenzare la cinetica di diverse reazioni, mostrando talvolta attività catalitica simile a quella enzimatica, come la formazione di complessi substrato-enzima, inibizione competitiva, saturazione e catalisi stereospecifica (Bender, M.L. 1978).

In previsione di un ampio utilizzo in campo farmaceutico la tossicità delle ciclodestrine è stata estesamente valutata. Dopo somministrazione per via orale le ciclodestrine naturali non sono risultate tossiche mentre dei fenomeni tossici si sono osservati per somministrazione parenterale: a livello renale le β -ciclodestrine hanno dimostrato un elevato effetto nefrotossico, probabilmente dovuto alla loro bassa solubilità.

Dopo somministrazione ripetuta di β -ciclodestrine native sono stati confrontati i parametri ematici registrati nei ratti e nei conigli. L'iniezione di β -ciclodestrine o di Heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciclodestrine (900 mg/Kg nei ratti e 1200 mg/Kg nei conigli) aumenta l'urea, la creatina, la glutammato ossalacetato transaminasi (GOT) e la glutammato piruvato transaminasi (GPT) nel sangue, che sono indice di danno epatico e renale. Somministrando invece 2-idrossipropil- β -ciclodestrine e 6-O-maltosil- β -ciclodestrine alle stesse dosi non si sono registrate variazioni dei parametri ematici.

Le ciclodestrine inducono una modificazione morfologica negli eritrociti, e ad alte dosi causano emolisi. L'attività emolitica delle ciclodestrine naturali è maggiore per le β -ciclodestrine mentre è minima per le γ -ciclodestrine (Ohtani, Y. 1989); ciò può essere causato dalla diversa capacità di ciascuna ciclodestrina di solubilizzare i componenti di membrana. La lisi della membrana eritrocitaria avviene senza che vi sia penetrazione della ciclodestrina nella membrana stessa come invece accade per i detergenti. La derivatizzazione delle ciclodestrine modifica ampiamente gli effetti sulle membrane cellulari.

In genere, le ciclodestrine non possono essere somministrate per via parenterale a causa della loro tossicità. Tra le ciclodestrine meno tossiche ed utilizzate per via parenterale vi sono l'irrossipropil- β -ciclodestrina e la sulfobutil- β -ciclodestrina. Tali ciclodestrine sono state studiate per aumentare la solubilità di

farmaci insolubili evitandone la precipitazione nel circolo ematico anche se la precipitazione può essere causata dalla diluizione nel torrente circolatorio, oltre che da piazzamento di molecole con maggiore affinità per la cavità ciclodestrinica.

Le 2-idrossipropil- β -ciclodestrine somministrate per via endovenosa nei ratti e nelle scimmie in dosi subacute o subcroniche non hanno dimostrato significative alterazioni dei parametri clinici (Brewster, M.E. 1990)

La somministrazione endovenosa di ciclodestrine ai ratti ha evidenziato una rapida clearance plasmatica. Più del 95% delle 2-idrossipropil- β -ciclodestrine e delle β -ciclodestrine sono eliminate non metabolizzate per via renale.

3.4.2 *Micelle polimeriche*

I sistemi micellari sono *carriers* interessanti per il trasporto di farmaci con scadenti caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche in quanto possono essere vantaggiosamente impiegati per migliorarne la solubilità, aumentarne la stabilità, facilitarne l'assorbimento, prolungarne la permanenza nell'organismo e in alcuni casi favorirne la localizzazione prevalente in tessuti target in cui il farmaco può svolgere la sua azione farmacologica.

Le micelle sono sistemi colloidali sovramolecolari con dimensioni variabili tra 5 e 200 nm, o più frequentemente fra 20 e 100 nm, generalmente sferiche, in grado di organizzarsi spontaneamente in acqua per spontanea associazione fisica di molecole anfifiliche costituite da due distinte frazioni idrofobiche e idrofiliche. A basse concentrazioni le molecole anfifiliche sono liberamente solubili e tendono ad interporsi all'interfaccia acqua-aria. All'aumentare della concentrazione nel sistema si raggiunge un punto in cui sia l'interfaccia che il *bulk* risultano saturati; da questo punto, definito come Concentrazione Micellare Critica (CMC), ogni altro aumento della concentrazione porta alla formazione di micelle all'interno della fase acquosa con conseguente riduzione dell'energia del sistema. In Figura 3.6 viene riportata la struttura di una micella al disopra della CMC. Le interazioni idrofobiche tra le frazioni lipofile della molecola che rappresentano la *driving force* termodinamica nella strutturazione della micella (Attwood D., 1983).

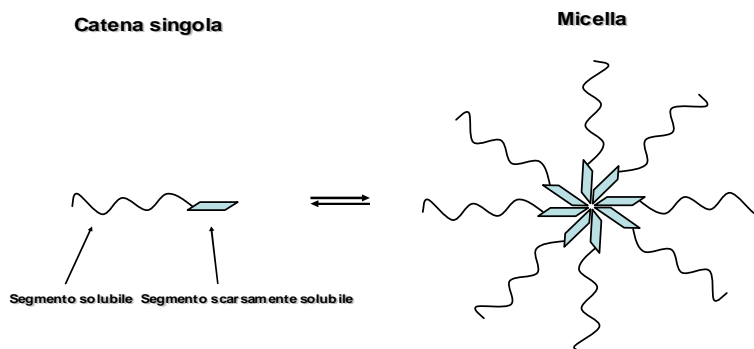


Figura 3.6: Meccanismo di formazione di una micella.

Il “*core*” idrofobico del sistema ne determina la stabilità e funge da *reservoir* per molecole lipofile, mentre le frazioni idrofiliche formano una corona idratata all’interfaccia con il solvente conferendogli solubilità, e prevenendo fenomeni di adsorbimento di proteine.

Gli aggregati micellari sono costituiti da poche unità fino a varie decine di molecole. Il numero di molecole polimeriche che vanno a formare la micella viene definito “*numero di aggregazione*”. La concentrazione in cui avviene la prima interazione fra i residui idrofobici senza la formazione di micelle viene detta “*concentrazione di aggregazione critica*” (CAC) ed è generalmente di diversi ordini di grandezza inferiore alla CMC. Nei sistemi micellari per uso farmaceutico il farmaco può essere fisicamente o chimicamente intrappolato all’interno del *core* della micella da cui viene rilasciato attraverso meccanismi di diffusione, disaggregazione, idrolisi o attraverso una combinazione di questi.

3.4.2.1 Polimeri strutturanti micelle

I sistemi micellari possono essere ottenuti con varie molecole anfifiliche che presentano caratteristiche chimico-fisiche molto diverse tra loro. Molecole anfifiliche di natura polimerica in grado di formare strutture estremamente flessibili e di offrire un’ampia possibilità di manipolazione chimica e di applicazioni biologiche (Torchilin, 2001). Da un punto di vista strutturale le molecole in grado di formare

micelle oltre ad essere di natura anfifilica devono possedere alcuni requisiti specifici quali ad esempio un caratteristico *Critical Packing Parameter* (CPP) (Israelachvili, J. 1991). Il CPP descrive un rapporto tra alcuni parametri strutturali delle parti idrofobiche e idrofiliche di una molecola. A differenza di quanto avviene per il valore di HLB, il Critical Packing Parameter fa riferimento esclusivamente alla forma della molecola. Esso viene definito come:

$$CP = \left[\frac{\text{Volume}(\text{hydrophobic part})}{(\text{Surface}(\text{hydrophilic part}) * (\text{length of the hydrophobic part}))} \right]$$

Tale parametro garantisce una efficiente predizione delle caratteristiche geometriche del “packing molecolare”. Le molecole anfifiliche, infatti, possono formare diverse strutture sovramolecolari (forma conica, cilindrica, a tronco di cono etc) .

I polimeri sono un’ampia categoria di materiali che possono essere classificati per la loro composizione chimica (organici, inorganici), degradabilità (degradabili o non degradabili), solubilità, origine (naturali o sintetici) e struttura (random,).

I *graft-copolymers* sono formati da un *backbone* funzionalizzato con molecole “pendenti” con diverse caratteristiche chimico-fisiche. La funzionalizzazione di catene polimeriche con funzioni idrofili che e idrofobiche porta alla formazione di strutture sopramolecolari (bioconiugati) con caratteristiche anfifiliche in grado di auto assemblarsi o assemblarsi a formare strutture di tipo micellare, definite come micelle polimeriche. In linea generale, le micelle formate da *graft-copolymers* a basso grado di derivatizzazione idrofobica tendono a formare più facilmente aggregati in quanto le catene idrofobiche risultano meno mobili e meno vicine che nelle micelle formate da *block-copolymers*, quindi tendono ad interagire più facilmente con residui di altre molecole. Le micelle ottenute da *graft-copolymers* ad elevato grado di derivatizzazione idrofobica invece hanno una dimensione minore rispetto a quelle ottenute da *block-copolymers* in quanto la micellizzazione può avvenire a basse concentrazioni anche per strutturazione di una singola molecola polimerica e, in ogni caso, il numero di aggregazione risulta spesso inferiore.

3.4.2.2 Formazione di micelle caricate con farmaci

Una delle principali caratteristiche delle micelle che le rende di particolare interesse nell'impiego farmaceutico è la loro capacità di incrementare la solubilità di sostanze scarsamente solubili in acqua. La solubilizzazione avviene per interazione reversibile del farmaco idrofobico con il core della struttura micellare, per formare una soluzione termodinamicamente stabile. Se si riporta in un grafico la correlazione tra la solubilità di un composto insolubile in funzione della concentrazione dell'agente solubilizzante in genere ciò che si osserva è che la solubilità cresce del farmaco non aumenta fino al raggiungimento della CMC. Raggiunto questo valore la solubilità aumenta proporzionalmente alla concentrazione del materiale anfifilico, indicando una correlazione con la micellizzazione (Figura 3.7).

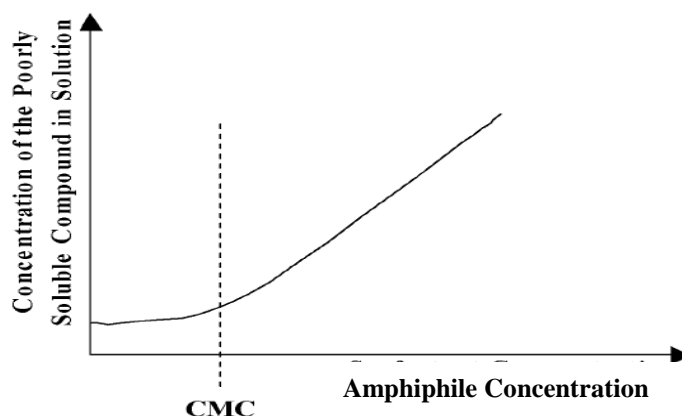


Figura 3.7: Grafico schematico della dipendenza della solubilità in acqua di un composto idrofobico dalla concentrazione di agente solubilizzante.

Dal punto di vista termodinamico, la solubilizzazione di una molecola può essere considerata come una normale ripartizione di una molecola tra due fasi (ossia tra il *core* idrofobico micellare e la fase acquosa), e l'energia libera di solubilizzazione (ΔG_s^0) può venire espressa dal corrispondente coefficiente di ripartizione (K) (Torchilin, 2001).

$$\Delta G_s^0 = - RT \ln K$$

E' noto che le micelle possiedono una distribuzione anisotropica dell'acqua all'interno della loro struttura. In altre parole, la sua concentrazione diminuisce dalla superficie verso il centro della micella, fino ad avere un *core* interno completamente idrofobico, con esclusione dell'acqua. Di conseguenza la disposizione di un farmaco solubilizzato all'interno di una micella dipenderà dalla sua polarità: molecole non polari saranno incorporate in profondità della micella, sostanze con polarità intermedia si distribuiranno a livelli intermedi tra il *core* idrofobico e il polimero idrofilico, mentre i substrati idrofilici verranno adsorbiti sulla superficie (Figura 3.8) (Torchilin, 2001).

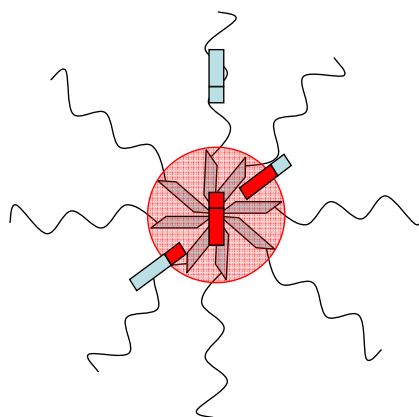


Figura 3.8: Disposizione di molecole a diversa polarità all'interno di una micella. Le barre azzurre rappresentano un farmaco con caratteristiche idrofiliche; quelle rosse, un farmaco con caratteristiche idrofobiche; quelle sia azzurre che rosse rappresentano un farmaco con caratteristiche sia idrofiliche che idrofobiche.

È stato dimostrato che l'iniziale solubilizzazione del farmaco avviene in seguito a spiazzamento di molecole di solvente dal *core* idrofobico della micella e successivamente il farmaco tende a muoversi verso il centro del *core* spingendo verso l'esterno i blocchi idrofobici. Studi condotti utilizzando il benzene come molecola modello hanno mostrato che la dissoluzione dovuta a un sistema micellare possa essere promossa da due eventi: il primo dovuto ad un fenomeno di adsorbimento (localizzazione all'interfaccia micella-acqua), il secondo dovuta a dissoluzione (localizzazione nel *core* idrofobico).

Qualora si ottengano micelle con elevato grado di *loading*, questo fenomeno può portare all'aumento sensibile delle dimensioni del *carrier* vescicolare. Un elevato caricamento è indice anche di estrema stabilità del sistema e spesso presenta ridotto rilascio, ridotta biodisponibilità e quindi ridotta efficacia.

Le capacità solubilizzanti dei sistemi micellari dipendono da diversi fattori, quali la struttura chimica del farmaco e delle porzioni polari ed apolari del polimero, la temperatura, il pH e il metodo di preparazione della micella. In generale, un aumento della lunghezza della regione idrofobica si ripercuote in una maggiore solubilizzazione di un farmaco nel *core* della micella. La riduzione della lunghezza dei blocchi idrofilici porta ad una riduzione della CMC e ad un aumento del numero di strutture micellari a parità di concentrazione polimerica, e quindi ancora una volta ad una maggiore solubilizzazione. Anche il rapporto tra porzione idrofobica e idrofilica nelle micelle risulta determinante nel caricamento in quanto il farmaco tenderà a posizionarsi diversamente all'interno della micella. Inoltre ciò influisce anche sulla cinetica di rilascio in quanto molecole inglobate nella corona vengono rilasciate molto più velocemente di quelle solubilizzate nel *core*.

Il grado di solubilizzazione in una particolare micella dipende dal sito di incorporazione e, di conseguenza, dalla morfologia della micella. All'aumentare del Critical Packing Parameter la micella diviene più asimmetrica e il volume del *core* interno aumenta in rapporto alla porzione idrofilica. Perciò è lecito attendersi che la solubilizzazione di un farmaco che si colloca nel nucleo idrofobico possa aumentare parallelamente al grado di asimmetria.

Anche l'interazione interfacciale fra il farmaco e solvente come pure il metodo di preparazione delle micelle può influire notevolmente sul caricamento del farmaco (Torchilin, 2001).

Le proprietà biofarmaceutiche delle micelle sono strettamente legate alla dimensione e alla natura chimico-fisica delle molecole anfifiliche che le compongono (Torchilin, 2001; Nishiyama *et al.*, 2006, Francis *et al.*, 2004). Oltre a migliorare la solubilità e stabilità di farmaci idrofobici e fragili, i sistemi micellari sono in grado di favorire l'assorbimento attraverso le membrane biologiche. Le molecole anfifiliche che costituiscono le micelle possono infatti interagire con le membrane disorganizzandole e rendendole in questo modo facilmente permeabili.

Pertanto formulazioni micellari possono essere impiegate per aumentare la biodisponibilità di farmaci dopo una somministrazione che preveda una forma di assorbimento come la via orale, topica, sottocutanea etc. In questi casi però la struttura micellare viene normalmente distrutta durante il passaggio di membrana. Il farmaco entra nel circolo sanguigno come tale mentre i componenti delle micelle vengono “persi” durante l’interazione con le strutture cellulari. Per somministrazione endovenosa, invece, le micelle possono presentare una prolungata permanenza nel circolo sanguigno che si può in buona parte ricondurre alla dimensione di tali sistemi che risulta maggiore della soglia di filtrazione glomerulare. Inoltre sebbene le micelle possano essere eliminate dal circolo sanguigno per captazione da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale (RES), la corona di idratazione ne previene in genere l’opsonizzazione evitando il riconoscimento da parte del RES. Le caratteristiche interfacciali micella/bulk dipendono dalla densità delle catene idrofiliche e dallo spessore della corona esterna.

L’eliminazione delle micelle dal sistema circolatorio avviene in seguito a dissociazione degli unimeri che le compongono. Nel caso di micelle polimeriche, se il peso molecolare delle singole catene polimeriche è inferiore a 20-30 kDa l’eliminazione avviene generalmente per via renale. Molecole a più alto peso molecolare vengono filtrate più lentamente e sottratte dal circolo sanguigno anche per via epatica.

Micelle fisicamente stabili possono comunque rimanere in circolo per molto tempo e accumularsi attraverso meccanismi passivi in tessuti permeabili quali ad esempio il fegato, in cui i capillari sono caratterizzati dall’assenza della membrana basale e da giunzioni interendoteliali larghe (circa 150 nm), i tessuti infiammati o tessuti caratterizzati da elevata angiogenesi e capillari particolarmente permeabili (Maeda H., 1992).

Micelle direzionate possono essere invece essere ottenute inserendo agenti *targeting* sulla superficie del sistema colloidale. Interessanti risultati sono stati ottenuti impiegando ligandi che vengono endocitati dopo riconoscimento con il proprio recettore di membrana, come l’acido folico (Lee E.S., 2003), in questo modo tutto il sistema sovramolecolare penetra nella cellula con il carico di farmaco. Per ottenere

sistemi a rilascio mirato e controllato sono stati introdotti nella struttura micellare funzioni che modificano la struttura in risposta a particolari stimoli microambientali. Polimeri termosensibili (Cammass S., 1997) o pH-sensibili (Meyer O., 1998) possono essere utilizzati per aumentare il rilascio del farmaco in determinati distretti dell'organismo in cui ci sono piccole variazioni dell'acidità o della temperatura come nei tumori solidi.

3.4.3 Bioconiugati farmaco-polimero

Il concetto di *carrier* macromolecolare era già stato definito all'inizio del secolo scorso, quando nel 1906 Ehrlich coniò il termine "pallottola magica" per indicare i trasportatori di farmaci ad elevato peso molecolare. Negli anni '70 Helmut Ringsdorf ideò il primo modello di "*polymer therapeutics*", in cui l'agente citotossico poteva essere coniugato a diversi *backbone* polimerici. (Ringsdorf, H., 1975).

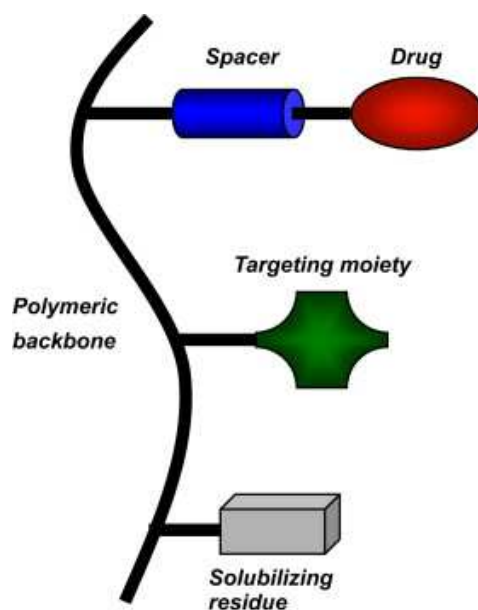


Figura 3.9: Struttura di bioconiugati polimerici per il direccionamento di farmaci

Il modello proposto da Ringsdorf, schematizzato in Figura 3.9, è costituito da un *carrier* polimerico idrosolubile inerte (*polymer backbone*) a cui sono legate diverse funzioni:

- uno spaziatore (*spacer*) 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*).

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 (Duncan, R., 1994). Tuttavia ci sono ancora diversi problemi da superare prima di ottenere il bioconiugato ideale. Uno degli obiettivi da raggiungere è ad esempio 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. Una ulteriore problematica è quella di ottenere polimeri ben caratterizzati e con bassa polidispersività ed infine vi è la necessità di sviluppare metodi analitici adatti per la caratterizzazione del coniugato tal quale e dei suoi componenti.

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

- mascheramento dei siti antigenici del farmaco, soprattutto per quanto riguarda farmaci proteici, con conseguente ridotta captazione da parte del sistema immunitario;
- una maggiore emivita plasmatica ed una riduzione dell'escrezione renale, dovuta all'elevato volume idrodinamico;
- maggiore solubilità di farmaci normalmente poco solubili;
- direzionamento specifico del farmaco nel tessuto tumorale grazie alla presenza di *targeting residues*;

- rilascio del farmaco nel tessuto tumorale per effetto EPR (vedi paragrafo 3.3.1);
- possibilità di somministrazioni meno frequenti e a dosi più basse;
- ridotta tossicità sistemica;

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.

Molti profarmaci polimerici sono attualmente in fase clinica di sperimentazione. Tra i primi a venire sperimentati sull'uomo vi è il "PK1", dove l'HPMA è usato come carrier per la doxorubicina. Gli studi hanno dimostrato che la bioconiugazione permette di aumentare fino a cinque volte la massima dose tollerata di doxorubicina, senza presentare fenomeni di cardiotossicità, che risulta essere l'effetto collaterale più pesante a carico del farmaco. (Vasey, P. 1999). Lo stesso polimero utilizzato per questo studio è stato ulteriormente modificato con l'introduzione di galattosamina, un ligando selettivo per l'asialoglicoproteina epatica, allo scopo di ottenere un targeting epatico. Il polimero ottenuto (PK2) [Seymour, L.2002) è entrato in sperimentazione clinica, dimostrando una buona capacità di accumulo nelle cellule tumorali epatiche, fino a 50 volte maggiore rispetto a quella del farmaco libero. Tuttavia il bioconiugato non si è dimostrato selettivo per le cellule tumorali, accumulandosi in ugual misura negli epatociti sani. Altri bioconiugati sono stati sintetizzati per aumentare la solubilità di farmaci scarsamente solubili come il paclitaxel o la camptotecina. I derivati di questi farmaci coniugati all'HPMA hanno messo in luce le problematiche legate alla stabilità del *linker* tra il farmaco e il polimero. Infatti a causa di una cinetica idrolisi troppo rapida del legame estereo tra il paclitaxel e il polimero si osserva un rilascio del farmaco nel circolo sanguigno, facendo registrare fenomeni di neurotossicità, ascrivibili alla circolazione del paclitaxel non coniugato (Meerum Terwogt, J. M.,2001).

3.5 MATERIALI IMPIEGATI NEL PROGETTO DI RICERCA

3.5.1 Pullulano

Il pullulano è un polisaccaride naturale neutro composto da unità ripetitive di D-maltotriosio (3 unità di glucosio unite da legame glicosidico α -1,4) legate tra loro mediante legami glicosidici α -1,6, viene prodotto per fermentazione dell'amido mediata dal microrganismo *Aureobasidium Pullulans*.

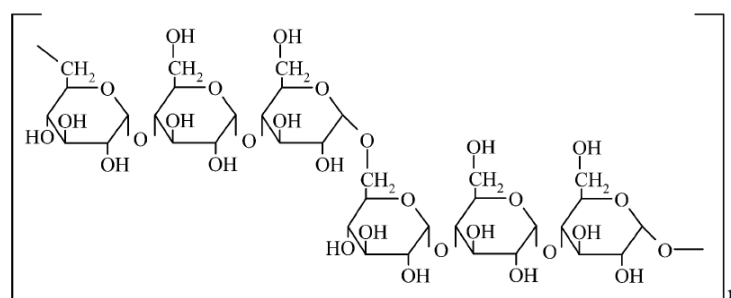


Figura 3.10: Struttura chimica del Pullulano

E' un polimero solubile in acqua e insolubile nei solventi organici. Le soluzioni acquose di pullulano sono stabili (decompone a 250-280 °C) e mostrano una viscosità relativamente bassa se confrontata con quelle di altri polisaccaridi. È inoltre un polimero biocompatibile e biodegradabile proprietà che lo rendono un materiale idoneo per la realizzazione di sistemi di drug delivery.

La biocompatibilità del polimero è stata confermata in studi su fibroblasti umani. Dopo periodi prolungati di incubazione con concentrazioni elevate di nanoparticelle di pullulano non si sono osservate diminuzioni significative della vitalità cellulare o variazioni morfologiche, né interferenze con l'adesione cellulare (Gupta M. 2004). E' noto che l'adesione è mediata da interazioni tra proteine di superficie (ad esempio integrine) e proteine della matrice extracellulare (o presenti sulla superficie di altre cellule o particelle). Dato che il processo di adesione è di cruciale importanza nella crescita, migrazione, differenziazione, sopravvivenza e organizzazione tissutale, è fondamentale accertare che il *carrier* non sia responsabile di tali interferenze o altri generici fenomeni infiammatori.

Come per molti altri polisaccaridi, dopo somministrazione endovenosa il pullulano si distribuisce prevalentemente a livello epatico. Studi di biodistribuzione in ratti hanno dimostrato che il recettore per l'asialoglicoproteina (ASGPR) contribuisce in modo determinante alla distribuzione epatica. Infatti l'inibizione di tale recettore riduce sensibilmente il legame e l'internalizzazione del polimero a livello del parenchima epatico. Sulla base di tali osservazioni è possibile pensare al suo utilizzo come carrier passivo o attivo via endocitosi mediata da recettore (RME) per il delivery al fegato. E' da ricordare tuttavia che l'uptake del pullulano, proprio perché avviene con un processo specifico di riconoscimento, risulta essere estremamente sensibile alla configurazione stereochimica della molecola e alla posizione dei gruppi idrossilici legati all'unità piranosica. Pertanto modifiche strutturali possono alterare significativamente le caratteristiche strutturali di tale polimero.

Come il destrano, il pullulano risulta idroliticamente stabile in ambiente neutro, moderatamente alcalino o acido, tuttavia qualunque processo porti alla perdita dell'integrità glucopiranosica influenza la stabilità dello zucchero. Tra i metodi più sfruttati per la modifica chimica dei polisaccaridi in generale, e del pullulano in particolare, vi è l'ossidazione selettiva dei dioli vicinali mediante periodato di sodio, reazione che permette l'apertura controllata dell'unità glucosidica e l'introduzione di gruppi reattivi aldeidici che possono essere sfruttati per l'inserimento di specifiche funzioni molecolari. Il processo di ossidazione porta alla formazione di prodotti tossici che provocano completa implicazione della attività cellulare. Studi condotti su derivati polialdeidici di destrano mostrano una considerevole citotossicità verso cheratinociti e fibroblasti in vitro, con valori di IC_{50} intorno ai 130 $\mu\text{g/ml}$ verso cellule RAW 264,7 murine (Sokolsky-Papkov et al.). Il mascheramento delle aldeidi con etanolamina riduce di 15 volte la tossicità del prodotto che può essere ulteriormente diminuita attraverso riduzione della base di Schiff con un riducente selettivo quale il sodiocianoboroidruro (formazione di un'ammina). La completa riduzione dei gruppi aldeidici con un riducente quale il sodioboroidruro (formazione di un poliolo) riporta il valore di IC_{50} allo stesso ordine di grandezza del destrano nativo, ossia trascurabile ($>5000 \mu\text{g/ml}$).

La velocità di idrolisi, sia essa chimica od enzimatica, viene modificata considerevolmente a seguito dell'ossidazione con periodato. Gli studi di degradazione enzimatica condotti utilizzando amilasi, enzimi lisosomiali, e valutando la degradazione nel siero, rivelano che la velocità di idrolisi diminuisce con l'aumentare del grado di ossidazione del pullulano (Bruneel D., 2001) I risultati hanno mostrato che sia il pullulano che molti derivati sono degradati lentamente dall' α -amilasi e nel siero, e non subiscono invece significative modifiche negli enzimi lisosomiali. Essendo noto che i polimeri tendono ad accumularsi nel fegato, è stata studiata anche la degradazione in sede epatica, che avviene a una velocità molto bassa. Lo stesso andamento è stato confermato su altri polisaccaridi: un destrano ossidato al 10% avente un PM 20 kDa viene completamente idrolizzato enzimaticamente in 24 h, mentre un corrispondente destrano ossidato al 90% subisce circa un dimezzamento del proprio PM nelle stesse condizioni e nello stesso arco di tempo (Ahmad, T., 2006).

Per quanto riguarda invece l'idrolisi chimica, l'alterazione della normale conformazione "a sedia" dovuta all'apertura dell'anello si traduce in una aumentata libertà di rotazione del legame "glicosidico" e lo rende più facilmente suscettibile all'idrolisi. I polisaccaridi ossidati con periodato inoltre formano una struttura emiacetalica che ne riduce ulteriormente la stabilità (Bruneel D., 2001). Effettivamente, molti studi di degradazione di polisaccaridi ossidati mostrano una riduzione del peso molecolare di quasi 2 ordini di grandezza nell'arco di 48 giorni di incubazione in PBS (Bouhadir K. , 2001).

I gruppi aldeidici del pullulano sono stati modificati con varie molecole per ottenere materiali con specifiche caratteristiche chimico-fisiche.

Il carbossimetilpullulano, ottenuto per reazione con sodio cloroacetato, è stato utilizzato per coniugare doxorubicina mediante spaziatori peptidici. Con una scelta appropriata della tipologia di amminoacidi utilizzati, si sono sintetizzati profarmaci con maggiore attività antitumorale in vivo (NogusaH., 2000).

Il pullulano acetato, più idrofobico del nativo, può essere sintetizzato utilizzando anidride acetica in presenza di piridina. Si tratta di una reazione piuttosto versatile, che consente di ottenere un biomateriale con grado di acetilazione, e quindi grado di idrofobicità, molto variabile. Studi di rilascio utilizzando Clonazepam come

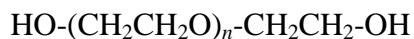
farmaco modello mostrano un rilascio più prolungato all'aumentare del grado di acetilazione (Jung S., 2003.)

Il derivato acetilato del pullulano, previa succinilazione con anidride succinica, può essere ulteriormente funzionalizzato con sulfodimetossina per creare un coniugato pH-responsivo che migliora il targeting tumorale dell'agente antineoplastico 5-fluorouracile. Tramite una reazione DCC mediata è invece possibile derivatizzare il pullulano acetato con biotina, sfruttando il suo gruppo carbossilico terminale, e ottenere nanoparticelle con diametro compreso tra gli 80 e i 130 nm e con buona efficienza di caricamento di adriamicina. Con una chimica simile è realizzabile un graft-copolymer pullulano-PLGA (poli-DL-lattide-co-glicolide, polimero noto per la sua biodegradabilità e biocompatibilità), con cui sono state formulate nanoparticelle di circa 100 nm e con contenuto di adriamicina compreso tra il 5 e il 10% in peso (Jeong Y., 2006)

3.5.2 PEG

Il polietilenglicole (PEG) è un polimero che si ottiene per polimerizzazione dell'ossido di etilene mediante attacco nucleofilo di uno ione idrossido sull'anello epossidico, che ne causa l'apertura con successiva propagazione della reazione.

Il PEG ha formula generale



A partire dalla struttura base si possono preparare diversi derivati lineari, ramificati e mono o bifunzionali. Tra i PEG bifunzionali si distinguono composti omo ed eterobifunzionali che permettono reazioni di coniugazione selettive e che consentono di legare alle due estremità del PEG molecole aventi gruppi reattivi diversi (Roberts, M.J. 2002).

Il PEG può essere ottenuto con una polidispersività (M_w / M_n) di 1,01 per i PEG a basso peso molecolare (<5kDa) e di 1,1 per quelli ad elevato peso molecolare

(>50kDa), che confrontate con quella di altri polimeri risulta essere relativamente bassa.

La struttura eterea conferisce al PEG carattere anfifilico: in soluzione è in grado di coordinare 2-3 molecole di acqua per ciascuna unità di ossido di etilene ed è solubile in molti solventi organici polari. Proprio in virtù della capacità di legare molecole d'acqua e della flessibilità della sua struttura, il volume idrodinamico del PEG risulta almeno 5 volte maggiore rispetto ad una proteina globulare di ugual peso molecolare.

In vivo gli oligomeri di PEG a basso peso molecolare (< 400 Da) sono substrati per alcool deidrogenasi, che producono metaboliti tossici. Per molecole di massa maggiore questo non accade, e sopra i 1000 Da il PEG risulta privo di tossicità.

Il PEG viene rapidamente eliminato senza subire modifiche strutturali. La clearance è influenzata dal peso molecolare: al di sotto dei 20 kDa il PEG viene liberamente filtrato a livello glomerulare, mentre a pesi molecolari più elevati l'eliminazione è più lenta. L'immunogenicità del PEG è scarsa, anche per molecole ad elevato peso molecolare.

Data la sua bassissima tossicità questo polimero viene usato in molte preparazioni alimentari, farmaceutiche e cosmetiche. Oltre ai suoi impieghi classici come umettante, addensante, viscosizzante, plasticizzante il PEG è usato anche per preparazioni peculiari. In particolare questo polimero viene usato nella preparazione di bioconiugati farmaco-PEG per il delivery prolungato di farmaci e nella modifica superficiale di sistemi colloidali in modo da evitare i processi di osponizzazione responsabili della loro rapida eliminazione .

Per quanto riguarda la modifica di farmaci si possono evidenziare due aspetti:

1. Il legame di farmaci a basso peso molecolare al plasma
2. la modifica di farmaci proteici con catene polimeriche.

3.5.3 Paclitaxel

Il Paclitaxel (Tassolo) è un diterpenoide di origine naturale estratto dalla corteccia della specie *Taxus brevifolia*.

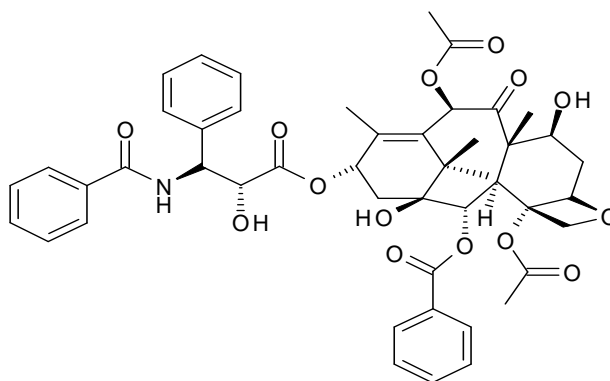


Figura 3.11: Struttura chimica del Paclitaxel.

La struttura comprende un *core* tetraciclico (Baccatina III) e una catena laterale ad esso legata tramite link estereo. A causa dell'alta richiesta da parte del mercato per scopi terapeutici, il paclitaxel viene in genere sintetizzato a partire dal composto naturale, assai più abbondante, 10-deacetilbaccatina III, estratto dalle bacche della specie più diffusa *Taxus baccata*.

Il Paclitaxel è un noto agente citotossico utilizzato in terapia antitumorale, da solo o in associazione con *cis*-platino, in pazienti affetti da carcinoma ovarico, o come farmaco di seconda scelta nel cancro mammario non rispondente ad altri trattamenti. E' indicato inoltre nel carcinoma polmonare e nel sarcoma di Kaposi AIDS-correlato.

L'attività biologica del tassolo è attribuibile al legame specifico e stechiometrico con la tubulina, costituente proteica dello scheletro dei microtubuli. I microtubuli sono componenti cellulari coinvolti nel processo che consente la separazione corretta dei cromosomi nel corso della divisione cellulare. Quando il paclitaxel lega la tubulina ne promuove la polimerizzazione e stabilizza la struttura microtubulare, modificandone il normale equilibrio. Una cellula con microtubuli stabilizzati subisce un processo di morte cellulare programmata o apoptosi. E' noto

che il farmaco interagisca con la tubulina inserendosi in una tasca idrofobica della proteina (Nogales *et al.*, 2001), ma non sono ancora state completamente chiarite le conformazioni assunte dal farmaco e il *target* durante l'associazione.

Il paclitaxel è caratterizzato da una natura spiccatamente idrofobica, infatti risulta scarsamente solubile in acqua (approssimativamente 1 µg/ml). Per incrementare la solubilità e consentirne l'uso clinico, esso viene attualmente formulato con Cremophor EL. L'utilizzo di tale veicolo è associato a reazioni di ipersensibilità, neurotossicità e nefrotossicità, al punto da richiedere in alcuni casi una preventiva medicazione con corticosteroidi e antistaminici. La somministrazione endovenosa del farmaco prevede tempi molto lunghi e flusso lento, e studi recenti sembrano inoltre confermare una riduzione dell'efficacia antitumorale del paclitaxel dovuta alla presenza del Cremophor EL. Per questi motivi si è prestata particolare attenzione allo sviluppo di sistemi di *drug delivery* alternativi o Cremophor-free. Tra questi, l'uso di liposomi, ciclodestrine, microemulsioni, micelle, microsfeere e nanoparticelle polimeriche.

Tali sistemi sono stati utilizzati non solo per incrementare la solubilità del farmaco, ma anche per ottenere un *targeting* tumorale. Risultati promettenti nel direccionamento attivo sono stati ottenuti sintetizzando coniugati chimici del Paclitaxel (profarmaci) e incorporandoli in sistemi lipidici aventi l'acido folico quale ligando per un'azione direzionante in sito. Quest'ultimo gruppo chimico è stato utilizzato anche nella realizzazione di sistemi liposomiali, dotati di emivita maggiore rispetto ai veicoli tradizionali e di una citotossicità 4 volte superiore rispetto agli analoghi liposomi senza gruppo di *targeting*.

Micelle polimeriche aventi diametro medio di 130 nm sono state ottenute utilizzando il copolimero (NIPAAm-co-DMAAm)-b-PLGA, in cui il paclitaxel veniva caricato in modo fisico con alto grado di *loading* e assicurando allo stesso un rilascio prolungato (Liggins R. *et al.*, 1997). Caratteristiche analoghe sono possedute dagli aggregati micellari basati sul *triblock-copolymer* PLA-PEG-PLA sintetizzato per polimerizzazione mediante apertura dell'anello con differenti rapporti molari di etilenglicole/acido lattico (Venkatraman *et al.*, 2005). I sistemi micellari basati sul *diblock-copolymer* a basso peso molecolare mPEG-block-poly (D,L-lattide) mantengono una citotossicità comparabile al farmaco libero sulla linea cellulare

MCF-7, ma consentono una biodistribuzione in vivo con livelli di farmaco dalle 2 alle 3 volte superiori nel fegato, rene, milza, polmone e tessuto tumorale (Kim J. *et al.*, 2006).

Un sistema di tipo micellare è stato ottenuto preparando immunomicelle di PEG-fosfolipidi covalentemente modificate con specifici anticorpi monoclonali in grado di riconoscere un'ampia gamma di cellule tumorali (Torchilin *et al.*, 1995), è stato dimostrato che questi sistemi aumentano la citotossicità del farmaco su linee cellulari modello.

Micelle polimeriche di paclitaxel formulate con Pluronic di diametro di 25 nm rilasciano efficacemente il farmaco in vivo, ma ne modificano la farmacocinetica, prolungandone la permanenza in circolo, aumentandone l'*uptake* a livello di reni, organi riproduttivi e polmoni, e riducendolo significativamente nel cervello e nel fegato (Han S.K. *et al.*, 2003).

Tra i sistemi di *drug delivery* per il tassolo basati su polisaccaridi, i risultati più incoraggianti sono stati ottenuti con l'utilizzo di derivati anfifilici del chitosano, come il coniugato N-octil-O-solfato, in grado di solubilizzare una quantità di paclitaxel che arriva al 25% in peso (Zhang *et al.*, 2007), il derivato N-mPEG-N-Octil-O-Solfato-chitosano col quale si raggiunge una percentuale vicina al 40%, e il coniugato N-lauril-carbossimetil-chitosano, che garantisce un aumento della solubilità di 1000 volte in ambiente acquoso e garantendo l'attività citotossica in vitro (Miwa A. *et al.*, 1998).

Glicol-chitosano idrofobizzato con acido 5 β -colanico è stato utilizzato per realizzare nanoparticelle di 400 nm di diametro in grado di caricare paclitaxel fino al 10% in peso e che risultano stabili in PBS fino a 10 giorni. E' stato determinato che il 50% del farmaco viene rilasciato nelle prime 24 h, e si stabilizza progressivamente fino all'80% nei successivi 10 giorni. Tuttavia gli studi di citotossicità in vitro mostrano un'efficacia minore del sistema micellare rispetto al preparato commerciale con Cremophor (Kim J. *et al.*, 2006).

3.5.4 Gold (III) derivati ditiocarbammati: [(ESDT)AuBr₂]

Negli ultimi anni la ricerca riguardante lo sviluppo di complessi metallici come potenziali agenti anticancro ha avuto un forte impulso. La ricerca in questo settore ebbe inizio in seguito al successo dei complessi di Pt (II) nel trattamento di molte patologie neoplastiche. L'introduzione del *Cis*-diamminodichloroplatino(II), detto comunemente *Cis*-platino in campo farmaceutico risale al 1979, quando fu approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) e immesso in commercio.

Da allora, il *cis*-platino viene largamente utilizzato come antineoplastico, anche se presenta numerosi limiti in ambito clinico durante il trattamento chemioterapico: esso, infatti, ha attività limitata solo ad alcune forme tumorali, presenta tossicità diffusa coinvolgendo molti tessuti sani (rene, fegato, sistema nervoso) ed in grado di indurre resistenza al trattamento. Il più grave effetto collaterale che venne riscontrato a partire dai test tossicologici pre-clinici fu una nefrotossicità correlata al legame del *cis*-platino con le cisteine di enzimi renali con conseguente inattivazione.

Negli ultimi anni la ricerca sta ampliando le opportunità di impiego dei complessi metallici usati come agenti antitumorali e denominati "*metal-based anticancer drugs*". L'idea di base degli studi è quello di sfruttare il meccanismo d'azione del *cis*-platino ma ridurre gli effetti indesiderati.

In questo contesto, l'attenzione è stata indirizzata verso i complessi di oro già utilizzati per il trattamento dell'artrite reumatoide. Il razionale di questa scelta è dovuto al fatto che l'Au (III) ha configurazione strutturale simile al Pt (II) ed inoltre alcuni farmaci già impiegati per l'artrite reumatoide, come alcuni derivati dell'oro, hanno dimostrato una certa affinità chemioterapica. Di conseguenza complessi dell'oro potevano essere buoni candidati per un'alternativa al *cis*-platino. Alcuni dati incoraggianti sono emersi dallo studio di alcuni complessi di Au (I), come l'Auranofin, ovvero S-trietilfosfina di Au (I), che ha dimostrato di possedere un'attività citotossica in vitro paragonabile a quella del *cis*-platino verso diverse linee cellulari tumorali umane, ma scarsa efficacia in vivo (Ronconi L. *et al.*, 2005).

I ricercatori si sono ben presto rivolti verso lo studio di complessi contenenti l'oro nello stato di ossidazione +3, essendo isoelettronico ed isostrutturale rispetto al Pt

(II) e, come il platino, in grado di formare una struttura quadrata planare con i suoi leganti. Sorprendentemente, nonostante la stretta somiglianza, esistono pochi dati in letteratura sull'uso di complessi di Au (III) come agenti antitumorali; probabilmente, questo è dovuto al loro alto potenziale redox e quindi alla loro bassa stabilità elettrochimica che rendono il loro utilizzo piuttosto problematico.

Negli ultimi anni, grazie al forte contributo della ricerca, sono stati sintetizzati e caratterizzati nuovi derivati di Au (III) che hanno mostrato maggiore stabilità all'ossidazione in condizioni fisiologiche. Questi derivati sono stati stabilizzati attraverso una scelta appropriata dei ligandi, che nella maggior parte dei casi hanno gruppi elettrondonatori come atomi d'azoto. Alcuni di questi complessi di Au (III) mostrano in vitro citotossicità comparabile o addirittura maggiore del *cis*-platino verso alcune linee cellulari di tumore umano, ed è stata osservata solo una minima resistenza crociata con il farmaco di riferimento (Pt (II)). Confrontando i complessi dell'oro (III) con quelli del *cis*-platino (II), potrebbe essere ipotizzato che l'azione biologica dei complessi di Au (III) e in particolare la loro attività antitumorale sia mediata da una interazione diretta col DNA cellulare. La modalità di legame di Au (III) al DNA è stata determinata attraverso modelli cristallografici e indagini spettroscopiche dell'Au (III) complessato con nucleosidi e nucleotidi. Inoltre, un certo numero di studi suggeriscono che probabili siti di legame per l'Au (III) sono gli atomi N (1)/N (7) dell'adenosina, N (7) o C (6) O della guanosina, N (3) della citidina, e N (3) della timidina, analogamente a quanto riscontrato per lo ione isoelettrico Platino (II).

Rimane ancora da stabilire quale sia la forza di legame dei complessi di Au (III) con il DNA. Sorprendentemente, recenti studi suggeriscono che le interazioni in vitro di alcuni complessi dell'Au (III) con il DNA del timo di vitello sono deboli, il che implica che il loro meccanismo d'azione potrebbe essere sostanzialmente diverso da quello evidenziato per i derivati di *cis*-platino (II).

Recentemente sono stati sintetizzati complessi ditiocarbammici di Au (III) dalla formula generale $[(ESDT)AuX_2]$, (dove X= Cl, Br. ESDT= etilsarcosinditiocarbammato) (Ronconi *et al.*, 2005), (Figura 1.14) dotati di migliorata stabilità in condizioni fisiologiche.

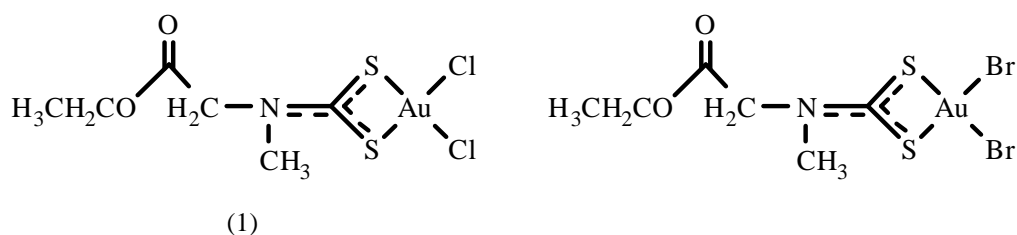


Figura 3.12: Struttura di [(ESDT)AuCl₂] (1), [(ESDT)AuBr₂] (2).

Tali composti hanno manifestato un'attività antitumorale in vitro superiore a quella del *cis*-platino di 4 ordini di grandezza e inoltre sono citotossici anche su cellule divenute resistenti ad altri chemioterapici.

Studi sull'attività biologica del *cis*-platino, hanno evidenziato che il danno cellulare indotto è dose- ed in particolare tempo- dipendente. Infatti, la vitalità cellulare dopo 3 ore di incubazione ad una concentrazione massimale di *cis*-platino, è superiore al 60%, ma diminuisce al 20% dopo 24 ore di contatto. Questo risultato è coerente col fatto che il *target* cellulare del *cis*-platino è il DNA e, quindi richiede un più lungo intervallo di tempo per indurre la morte cellulare. Al contrario i test eseguiti trattando le cellule con i complessi di Au (III) dimostrano una riduzione della vitalità cellulare del 50% già dopo solo 3 ore di incubazione a bassa concentrazione, e diminuisce ulteriormente al 20% dopo 6 ore di incubazione, il che fornisce supporto per altri meccanismi d'azione differenti rispetto alla sola interazione col DNA su cui sono in fase di svolgimento ulteriori indagini.

Studi approfonditi, hanno dimostrato l'interazione del *cis*-platino con i fosfolipidi di membrana, con i microfilamenti del citoscheletro, con l'actina e con l'RNA, ma è il DNA il bersaglio più sensibile all'azione antitumorale del farmaco, sebbene solo l'1% del *cis*-platino intracellulare riesca ad interagire con esso (Eastman A, 1999). Affinché il Pt (II) svolga attività antitumorale, è fondamentale l'interazione del centro metallico del Pt col DNA, che provoca l'inibizione della replicazione del DNA; inoltre, il legame del Pt (II) col DNA induce mutazioni sia per spostamento del modulo di lettura (*frameshift*) che per sostituzione di base. A questo proposito, per spiegare i dati biologici sopra descritti, si può ipotizzare che i complessi di Au (III) formino addotti col DNA con una cinetica più veloce ma che siano tuttavia

meno stabili di quelli formati dal Pt. Alcuni studi riportati recentemente sostengono che i composti dell'Au (III) sono in grado di interagire con la doppia elica del DNA in modo debole e reversibile, essendo questa interazione prevalentemente di natura elettrostatica (Marcon *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda l'attività biologica dei complessi di Au (III), sono stati eseguiti alcuni studi per evidenziare in quale forma i complessi fossero realmente attivi a livello biologico. Considerando i complessi Ditiocarbammici di Au (III) in soluzione acquosa, si è notato che tendono a perdere 2 moli di alogenuro per sostituzione con 2 moli di OH⁻. Lo scambio ha cinetica bifasica con una fase veloce che si compie in pochi minuti in cui 1 mole di alogenuro viene rilasciato per mole di complesso. La seconda fase, che prevede la sostituzione del secondo alogenuro, avviene in almeno 30-40 min. In tampone fisiologico, i derivati ESDT (Figura 3.14) convertono rapidamente nei complessi [Au(ESDT)(OH)₂], che sembrano essere meno solubili in acqua rispetto ai complessi di partenza, e se mantenuti in PBS, subiscono un processo di riduzione di Au (III) ad Au (I) entro le 24 ore. Comunque, questo processo di riduzione non dovrebbe interferire con le proprietà citotossiche dei derivati ESDT, in quanto è stato dimostrato che essi esercitano la loro attività citotossica entro 12 h dall'incubazione anche a concentrazioni nM, prima che il processo di riduzione sia completo. È stato poi riscontrato che i complessi di Au (I) [Au(ESDT)₂] sono meno citotossico rispetto ai complessi di Au (III) con evidente vantaggio clinico nell'utilizzo terapeutico dei derivati ESDT di Au (III).

In questo lavoro di tesi è stato studiato in particolare un derivato ditiocarbammico, l'[(ESDT)AuBr₂] ovvero Di Bromo (EtilSarcosinditiocarbammato) Oro (III), riportato in Figura 3.12. Sono quindi state indagate alcune strategie tecnologiche per aumentare da un lato la solubilità e dall'altro la stabilità del complesso. Sono stati studiati alcuni polimeri semisintetici automicellanti e derivati di ciclodestrine per migliorare le caratteristiche chimico-fisiche di [(ESDT)AuBr₂] per un impiego di tipo terapeutico.

3.5.5 Doxorubicina

La Doxorubicina è un farmaco antitumorale che viene venduto con il nome commerciale di Adriamicina o Rubex ed è conosciuto anche come idrossidaunorubicina. È un antibiotico appartenente alla categoria delle antracicline, strettamente correlato al prodotto naturale daunomicina ed è utilizzato per carcinomi, sarcomi e tumori della pelle. La caratteristica chimica delle antracicline è il nucleo chinolonico centrale al quale è legato uno zucchero ammino sostituito. Essendo una molecola anfotera, si lega bene alle proteine plasmatiche e alle membrane cellulari. Viene somministrato in forma di sale dell'acido cloridrico per vie endovenosa ed è fotolabile, per prevenirne la degradazione viene spesso conservato in buste di alluminio.

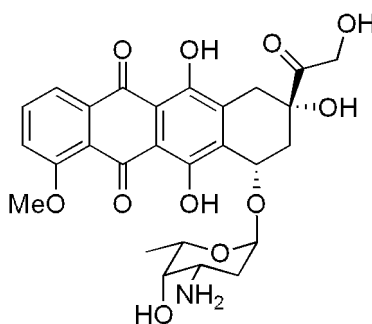


Figura 3.13: Struttura molecolare di Doxorubicina

La Doxorubicina (C₂₇H₂₉NO₁₁) ha peso molecolare di 543,5 Da, mentre il suo derivato cloridrato (C₂₇H₂₉NO₁₁HCl) di 579,98. Il cloridrato è molto stabile allo stato solido e in soluzione acquosa ad un pH compreso tra 3.0 e 6.5, mentre si decompone a velocità sempre maggiore quando il pH va da 6.5 a 12.0.

Il meccanismo d'azione della Doxorubicina è complesso e rimane a tutt'oggi da chiarire, nonostante si siano fatti e si stiano facendo ancora numerosi studi. Sicuramente interagisce con il DNA intercalandosi, determinandone un parziale disavvolgimento che causa il blocco delle macromolecole addette alla sintesi (Fornari, F.A.,1994). Inoltre l'intercalazione nel DNA potrebbe determinare la rottura di uno o di entrambi i filamenti di DNA portando ad apoptosi della cellula con un meccanismo mediato dal gene p-53. In particolare inibisce la topoisomerasi

II, che normalmente srotola il DNA permettendo la trascrizione e la replicazione. La Doxorubicina stabilizza il complesso formato dall'enzima, dopo che questo ha tagliato la catena di DNA, impedendo al DNA di essere rilasciato e bloccando quindi la replicazione e la trascrizione (Mompalmer, R.L., 1976). La porzione aromatica planare cromofora della molecola si intercala tra due paia di basi del DNA, mentre lo zucchero daunosamino si posiziona nel solco minore ed interagisce con le paia di basi a fianco immediatamente adiacenti al sito di intercalazione, come evidenziato da numerosi studi (Pigram, W., 1972)

Anche la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), probabilmente mediata dall'interazione con lo ione ferro, e la conseguente perossidazione lipidica sembrerebbero coinvolte nel meccanismo antitumorale del farmaco. Tuttavia quest'ultimo punto rimane controverso, dato che molti studi sembrano dimostrare che lo stress ossidativo prodotto dalle antracicline non abbia alcuna rilevanza per la loro azione antitumorale (Simunek, T., 2009).

Clinicamente la Doxorubicina viene usata per trattare alcune forme di leucemia, sarcomi, il linfoma di Hodgkin's, varie forme di cancro come quello a seno, vescica, stomaco, polmone, ovaie, tiroide e per mielomi multipli. È utilizzata anche contro l'AIDS e a questo scopo è stata recentemente coniugata con un anticorpo monoclonale murino ottenendo un immunocomplesso capace di eliminare l'infezione da HIV-1 in topi, eradicando completamente i linfociti T che esprimono l'antigene. Questa cura potrebbe essere associata alla terapia antiretrovirale (ART), che non riesce ad eliminare completamente il virus (Johansson, S., 2006).

Purtroppo la Doxorubicina presenta numerosi effetti collaterali, anche letali. Come effetti acuti si possono avere immunosoppressione, nausea, vomito, diarrea e aritmie (in genere transitorie), più raramente si manifestano neutropenia e alopecia reversibile. A partire da una dose di 550 mg/m^2 (la dose consigliata è di $60\text{-}75 \text{ mg/m}^2$ ogni 21 giorni) si possono manifestare cardiomiopatie e disfunzioni vascolari che portano ad aritmie, cambiamenti non specifici dell'elettrocardiogramma, diminuzione del volume di eiezione del ventricolo sinistro e possono culminare con insufficienza cardiaca congestizia. Il rischio di sviluppare una cardiotossicità irreversibile dipende da diversi fattori come la dose usata di Adriamicina, l'età (persone molto giovani o molto vecchie sono i casi più a rischio), pre-esistenti

problemi cardiaci o cure antitumorali e associazione con altri farmaci, come paclitaxel e trastuzumab. La cardiotossicità della Doxorubicina è caratterizzata da una diminuzione dose-dipendente della fosforilazione ossidativa nei mitocondri e degli enzimi antiossidanti a livello cardiaco, le specie reattive dell'ossigeno che si generano dall'interazione della Doxorubicina con il ferro, con formazione di un derivato semichinonico, possono quindi danneggiare i miociti, causando apoptosi, perdita di miofibrille e vacuolizzazioni citoplasmatiche. Inoltre l'ossidazione dei lipidi di membrana fa sì che le cellule cardiache vengano attaccate dal sistema immunitario, con aumento del danno e a questo si aggiunge quello sul sistema di sintesi degli acidi grassi (Bordoni, A., 1999). La somministrazione di sostanze, come il dexrazoxano, che legano il ferro impedendone l'interazione con la Doxorubicina o sostanze *scavenger* nei confronti delle ROS, sembrano infatti avere un effetto cardioprotettivo. Tuttavia alcuni studi non sono riusciti a dimostrare questa tesi, per cui lo stress ossidativo potrebbe essere solo una conseguenza di un danno a livello dei mitocondri e delle cellule e non la causa primaria della cardiotossicità della Doxorubicina. Altri possibili meccanismi cardiotossici presi in considerazione sono stati: la produzione di metaboliti delle antracicline maggiormente idrofili e cardiotossici, che si accumulano nei cardiomiociti; alterata espressione e funzione di importanti proteine cardiache, come la Na-K adenosin trifosfatasi; inibizione del coenzima Q₁₀; perdita dell'omeostasi del calcio a livello di cellule e mitocondri e legame dell'Adriamicina a cationi bivalenti come Mg²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺; induzione di lesioni a carico del DNA mitocondriale ed alterazione dei processi bioenergetici; degradazione di proteine dei miofilamenti e del citoscheletro, interferenze con diverse chinasi (Simunek, T., 2009) e l'interazione con il sistema contrattile actina-miosina, con conseguente alterazione della cinetica di contrazione cardiaca.

L'Adriblastina è la più semplice forma farmaceutica contenente Doxorubicina cloridrato in commercio in Italia, come soluzione o polvere liofilizzata. Per cercare di migliorare le proprietà chimico-fisiche e la farmacocinetica e per limitare gli effetti collaterali della Doxorubicina, sono state fatte diverse formulazioni. Doxil è la Doxorubicina incapsulata in liposomi ricoperti con polietilenglicole, prodotta da *Ben Venue Laboratories* per *Jonson&Jonson* negli USA, al di fuori degli Stati Uniti è conosciuto come Caelyx e venduto da *Schering-Plough*. Questa forma è stata

sviluppata per il trattamento del sarcoma di Kaposi, una forma di cancro correlata all'AIDS che causa lesioni alla pelle e ad altri organi. È inoltre utilizzato per il cancro al seno e alle ovaie in stadio avanzato, soprattutto nei casi a più alto rischio cardiaco. La peghilazione dei liposomi fa sì che si concentrino preferenzialmente nella pelle, ma si hanno comunque effetti collaterali, dovuti, ad esempio, alla fuoriuscita di Doxil dai capillari dei palmi delle mani e delle piante dei piedi, che determina arrossamenti, eritema e dolore (*Hand-Foot Syndrome*). Questa sindrome si presenta nel 50% dei pazienti trattati e limita la dose terapeutica Doxil, che rimane tuttavia preferibile alla Doxorubicina non incapsulata, in quanto risulta meno cardiotossico. Doxil è inoltre approvato dall'FDA per il trattamento del mieloma multiplo.

Myocet è invece la forma non peghilata di liposomi contenenti Doxorubicina, prodotta da *Enzon Pharmaceuticals* per *Cephalon* in Europa e per *Sopherion Therapeutics* negli USA e in Canada. Questa forma è approvata per il trattamento del cancro al seno in fase metastatica in Europa e Canada, ma non dalla FDA negli Stati Uniti. Non essendo ricoperto con polietilenglicole, Myocet dà una minor incidenza della *Hand-Foot Syndrome* rispetto a Doxil e come questo limita gli effetti cardiotossici della Doxorubicina non incapsulata. Il vantaggio dei liposomi è che permettono di ottenere una maggior concentrazione del composto nel sangue (AUC), ma con un rilascio lento, che non permette di raggiungere il picco ematico (Cmax) di farmaco libero che determinerebbe la cardiotossicità. Studi clinici hanno dimostrato che utilizzando Doxorubicina libera in associazione con Herceptin e tassolo si ottiene una maggior risposta da parte delle cellule tumorali, ma anche danni cardiaci letali. Utilizzando invece il farmaco incapsulato in liposomi in associazione ai suddetti composti, a fronte di una miglior efficacia non si manifesta la cardiotossicità. Questa scoperta ha permesso l'entrata di Myocet nella terza fase clinica, per l'approvazione della FDA.

Risultati migliori si sono ottenuti con micelle polimeriche autoassemblabili stabilizzate dal PEG: sfruttando così l'effetto EPR e l'*uptake* da parte del sistema reticolo endoteliale. Inoltre la diffusione del farmaco attraverso la micella è favorita dalla presenza di un gruppo amminico sulla molecola protonabile che favorisce la

diffusione del farmaco al pH acido del lisosoma, piuttosto che a quello neutro del plasma e questo incrementa il rilascio del farmaco a livello cellulare.

Recentemente sono state sintetizzate nanoparticelle peghilate di PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)), che hanno dimostrato di avere una maggior efficacia rispetto alla Doxorubicina in vivo su topi e in vitro su cellule-B tumorali murine, ma una minor cardiotossicità. Il PLGA è biodegradabile e quindi non si accumula nell'organismo, mentre il PEG offre protezione contro l'azione fagocitaria dei macrofagi e l'adsorbimento da parte di proteine, diminuendo quindi la *clearance* e aumentando il tempo di circolazione del farmaco (Park, J., 2009).

In questo lavoro di tesi è stato studiato un bioconiugato di Doxorubicina, in cui il farmaco è legato covalentemente ad un polimero formato da pullulano, PEG e acido folico, con un legame pH sensibile.

4. MATERIALI E METODI

4.1 REAGENTI

- o Il mPEG-NH₂ PM=2000 è prodotto da Nektar (Huntsvill, AL, USA)
- o Il paclitaxel è stato donato da INDENA S.p.A (Milano)
- o La doxorubicina HCl è stata acquistata come formulazione commerciale Adriblastina 50 mg, da Pfizer (LT, Italia)
- o [(ESDT)AuBr₂] è stato fornito dalla Prof. Dolores Fregona del Dipartimento di Chimica Inorganica, Metallorganica e Analitica (Università di Padova).
- o L'acido 5 β -colanico, il mannitolo, il sodiocianoboroidruro, l'acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico, l'idrossido di sodio, l'acido cloridrico, l'etanolo e il metanolo sono stati acquistati da Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA).
- o Il PEG(NH₂)₂ con peso molecolare 1900 Da utilizzato dopo dissoluzione in diclorometano e precipitazione in etere, il pullulano 100 kDa, gli standard di destrano, la dodecildiammina, il cloruro di tionile, la trietilammina, acetonitrile, cloroformio, dimetilsolfossido, il sodioboroidruro (NaBH₄), l'N-idrossisuccinimide, la N,N'-dicioesilcarbodiimmide, dimetilformammide, acido trinitrobenzensolfonico, l'acido folico sono stati acquistati da Fluka (Buchs, Switzerland) .
- o Il dimetilsolfossido deuterato per l'analisi all'NMR, l'acido trifluoroacetico, la cisteamina e l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), il PBS, il terreno DMEM, FD-DMEM, la glutammina, la penicillina, la streptomina, l'anfotericina, il glucosio e il bicarbonato sono stati acquistati da Aldrich (Stheim, Germany).
- o L'etere, l'idrossilammina cloridrato e il diclorometano sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia).
- o I sali per la preparazione dei tamponi e metaperiodato di sodio sono stati acquistati dalla Riedel-de-Haen (Seelze, Germany).

- o L'acido N-[ϵ -maleimidocaproil]-idrazide trifluoroacetilato (EMCH) è stato acquistato da Pierce (Rockford, USA)
- o Le β -ciclodestrine e le Metil- β -ciclodestrine (Kleptose® Crysmeb) sono state fornite da Roquette (Lestrem, France).
- o I prodotti per biologia cellulare e le plastiche Greiner sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) oppure da Biological Industries Ltd. (Israel).
- o I terreni EBM ed EGM-2 sono stati acquistati da Lonza (Switzerland).
- o La matrice da membrana basale Matrigel™ è stata acquistata da BD Biosciences (USA).
- o Le linee cellulari di adenocarcinoma mammario (MCF-7), carcinoma nasofaringeo (KB) e di carcinoma della cervice uterina (HeLa), le *human umbelical vein endothelial cells* (HUVEC) e le *human bone marrow endothelial cells* (HBMEC) provengono dalla banca cellulare ATCC-USA.
- o I topi balb/c femmine del peso di circa 20-25 g sono stati forniti dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova.

4.2 STRUMENTI

- o Le determinazioni spettrofotometriche sono state eseguite con spettrofotometro UV-Vis λ 25 Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA)
- o Per le analisi cromatografiche in reverse-phase si sono utilizzati:
 - 1) sistema HPLC Shimadzu, composto da due pompe LC 10AS, un rivelatore UV SDP 10A e un integratore Class VP Chromatography data System, versione 4.2 della Shimadzu (Kyoto, Japan), con colonna analitica RP Phenomenex Luna C18 250x4,60 mm.
 - 2) sistema HPLC Jasco composto da due pompe P1580, un rivelatore UV-1575, integratore Hercule Lite fornito da JMBS, con colonna analitica RP Phenomenex Luna C18 250x4,60 mm.
- o Per le analisi cromatografiche in gel-filtrazione si è utilizzato il sistema HPLC Jasco composto da due pompe P1580, rivelatore di indice di rifrazione RI-2031 PLUS, un integratore Hercule Lite fornito da JMBS, con colonna analitica BioGel SEC 40-XL (BioRad) oppure con colonne analitiche TSKgel G3000SW_{XL} e TSKgel G4000SW_{XL}, 7,8 mm x 30,0 cm (Tosoh, Bioscience, Stuttgart, Germany)
- o Le liofilizzazioni sono state eseguite con liofilizzatore Hettich HETO Lab Equipment e con Speed Vac Vacuum Centrifuge della HETO lab Equipment (Birkerød, Denmark)
- o I solventi sono stati evaporati con Rotavapor R114 della BÜCHI Labortechnik AG (Postfach, Switzerland)
- o Le misure di pH sono state effettuate con pHmetro Seven Easy S20-K Mettler Toledo con elettrodo Mettler Toledo Inlab 413 (Schwerzenbach, Switzerland)
- o Le centrifugazioni sono state eseguite con centrifughe CENTRIKON T-42K Kontron Instruments, Z300 Hemle e con ALC microcentrifughette 4214 della ALC international (Cologno Monzese, Italy)
- o Gli spettri NMR sono stati eseguiti con Spectrospin AMX 300 Mhz Bruker (Billerica, MA, USA)

- o Per la lettura delle piastre è stato utilizzato il sistema Microplate Autoreader acquistato da Biotek Instruments inc., mod. EL311SK (Highland, Vermont U.S.A.)
- o Le cellule endoteliali sono state contate con Coulter Counter Cell and Particle Counters, Coulter Z Series, della Beckman Coulter, Inc. (Brea, U.S.A.)
- o Le dimensioni particellari sono state determinate mediante Dinamic Light Scattering Particle Sizing System NICOMP 380ZLS (Santa Barbara, CA, USA)
- o Le analisi di fluorescenza sono state condotte con fluorimetro LS 50 B Perkin-Elmer (Wellesley, MA, USA)
- o Le analisi di ESI-MS sono state eseguite con spettrometro di massa a tempo di volo (ESI-TOF) con Applied Biosystem Mariner ESI-TOF (Monza, MI, Italy).
- o Per le ultrafiltrazioni si è utilizzato un sistema Amicon (Danver, MA, USA) con membrane YM1 (cut-off 10.000 Da) e Amicon ultraFree-MC Millipore con cut-off 30.000 Da, per la filtrazione dei tamponi si sono usati sistemi Millipore (Bendford, MA, USA) con filtro da 0.22 μm , i campioni da analizzare all'HPLC sono stati filtrati con Spin-X Centrifugate tube filter 0.22 μm .
- o L'analisi quantitativa dell'oro è stata condotta con Atomic Absorption Spectrometers (AAS) usando il Varian's AA240 con fornetto di grafite GTA120 e Zeeman background corrector e autosampler, (Varian AA240 Zeeman, Varian Inc.).

4.3 METODI

4.3.1 Metodi analitici

4.3.1.1 Determinazione dei residui aldeidici

La determinazione del grado di ossidazione del pullulano è stata eseguita mediante titolazione potenziometrica secondo la metodica descritta da Bruneel e coll. (Bruneel D., 1993). La reazione delle aldeidi con idrossilammina cloridrato porta alla formazione della corrispondente ossima (Figura 4.1) e liberazione di acido cloridrico che viene titolato con una soluzione standard di NaOH 0.01 N.



Figura 4.1: Schema di reazione tra un composto aldeidico e idrossilammina cloridrato.

5.0 ml di una soluzione 1 mg/ml di pullulano ossidato in acqua milliQ vengono fatti reagire con 10 ml di una soluzione di idrossilammina cloridrato 0.04 M. La miscela viene mantenuta a temperatura ambiente sotto costante agitazione. Dopo 2 ore la soluzione viene titolata con una soluzione standard di NaOH 0.01 N. Per confronto viene eseguita anche la titolazione di 10 ml di idrossilammina cloridrato 0.04 M.

4.3.1.2 Test del TNBS per la determinazione dei gruppi amminici primari

Le ammine primarie sono state determinate mediante reazione con l'acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico che porta alla formazione di composti colorati di giallo determinati mediante spettroscopia UV-Vis.

A. Metodica Snyder

A 940 μl di tampone borato 0.1 M pH 9.3 vengono aggiunti di 30 μl di soluzione di PEG-NH₂ contenenti 0-0.6 μmoli e 30 μl di soluzione di TNBS 1% p/v in DMF. Dopo 45 minuti di incubazione a temperatura ambiente viene determinata l'assorbanza a 420 nm (Snyder, S.L. 1975).

La percentuale di gruppi amminici è stata determinata basandosi su una retta di taratura costruita con soluzioni a concentrazione nota di mPEG-NH₂. I valori di assorbanza ottenuti sono riportati in una retta di taratura in funzione della quantità di gruppi amminici presenti nelle soluzioni di saggio (Figura 4.2).

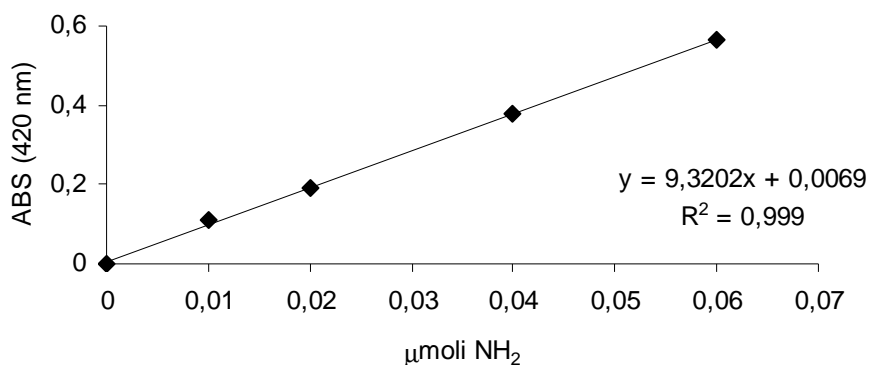


Figura 4.2: Retta di taratura di mPEG-NH₂ mediante saggio TNBS

La quantità di gruppi amminici presenti nella soluzione da analizzare sono stati determinati miscelando 940 μL di tampone borato, 30 μL di soluzione incognita e 30 μL di TNBS. L'assorbanza ottenuta a 420 nm è stata quindi riferita alla retta di taratura.

B. metodica Habeeb

250 μl di NaHCO₃ 4% pH 8.5 sono aggiunte a 250 μl di acqua contenente quantità note di PEG-NH₂ e 250 μl di TNBS 1 mg/ml in acqua mQ. Dopo due ore di incubazione a 40°C, si aggiungono 250 μl di sodiododecilsolfato (SDS) 10% p/v e 125 μl di HCl 1 N e si determina l'assorbanza a 335 nm (Habeeb A., 1966). I valori di assorbanza così ottenuti sono riportati in grafico in funzione della quantità di

gruppi amminici presenti nella soluzione di saggio, ottenendo così una curva di taratura (Figura 4.3).

La quantità di gruppi amminici nelle soluzioni incognite è stata determinata in modo analogo a quelli allestiti per la retta di taratura utilizzando 250 µl di soluzione da analizzare.

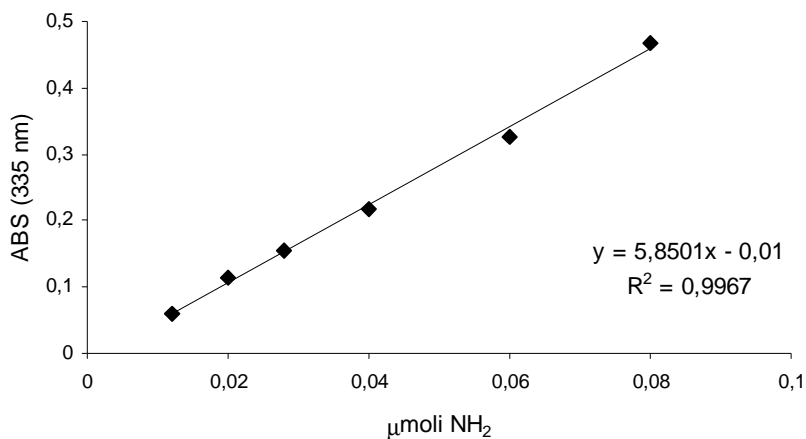


Figura 4.3: Retta di taratura con mPEG-NH₂.

4.3.1.3 Test di Ellman per la determinazione dei gruppi tiolici liberi

La concentrazione dei gruppi tiolici (-SH) in una soluzione è stata determinata mediante il saggio di Ellman in cui l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) reagisce selettivamente a pH neutro con i residui tiolici formando il cromoforo 2-nitro,5-tiobenzato (Ellman G.L., 1959).

200 µl di campione sono stati incubati con 30 µl di DNTB (4 mg/ml in fosfato 50 mM, pH 7.0) ed analizzati dopo 30 minuti a 405 nm. La concentrazione di gruppi -SH è stata calcolata sulla base di una retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di cisteamina (Figura 4.4).

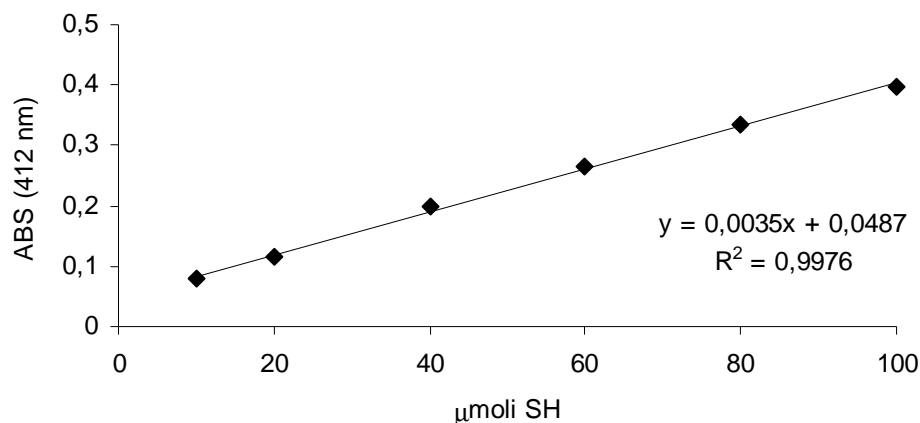


Figura 4.4: retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di cisteamina.

4.3.2 Sintesi e caratterizzazione di graft copolymers autoassemblanti

4.3.2.1 Studio preliminare della cinetica di ossidazione del pullulano

Ad una soluzione di 100 mg di pullulano (PM 100 kDa, 0.617 mmoli di monomero) in 8.15 ml di acqua mQ vengono aggiunti 1.85 ml di periodato di sodio 0.4 M (0.74 mmoli). La soluzione finale così ottenuta viene suddivisa in tre aliquote mantenute sotto agitazione al buio, a temperatura ambiente, a 4°C e a 25°C. A tempi prestabiliti (30', 1h, 2h, 4h, 6h, 9h, 24h) viene prelevata un'aliquota di 0.5 ml a cui vengono aggiunti 10 mg di mannitolo (0.05 mmoli). Dopo 1 ora la soluzione viene purificata per ultrafiltrazione con membrana 10 kDa. Sul campione si esegue la determinazione del contenuto di aldeidi mediante il metodo dell'idrossilammina cloridrato (Bruneel D., 1993).

4.3.2.2 Sintesi di pullulano ossidato

Ad una soluzione di 1 g di pullulano (PM 100 kDa, 6.17 mmoli di unità glicosidiche) in 90.75 ml di acqua mQ vengono aggiunti 9.25 ml (PULL₁) o 2.6 ml (PULL₂) di periodato di sodio 0.8 M. La soluzione viene poi mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente e al buio. Dopo 6 ore vengono aggiunti 11.1 mmoli (PULL₁) o 3.1 mmoli (PULL₂) di mannitolo. Dopo 1 ora la miscela di

reazione viene purificata con sistema di ultrafiltrazione Amicon utilizzando una membrana con cut-off 10 kDa e liofilizzata. Il prodotto ottenuto viene analizzato per determinarne il grado di ossidazione e il peso molecolare.

4.3.2.3 Clorurazione dell'acido 5 β -colanico

600 mg di acido 5 β -colanico (1.664 mmoli) vengono disciolti in 6 ml di cloroformio anidro. Si porta a riflusso con refrigerante a ricadere a 40 °C sotto costante agitazione. Alla soluzione limpida vengono aggiunti 1450 μ l di cloruro di tionile (16.64 mmoli) e si mantiene la reazione in condizioni anidre in corrente d'azoto per 3 ore. Successivamente si procede alla distillazione sotto vuoto del tionilcloruro in eccesso, quindi si porta a secchezza in rotavapor. Il prodotto si presenta come una polvere gialla.

Una piccola quota di prodotto viene prelevata e disciolta in metanolo per ottenere il corrispondente estere metilico dell'acido colanico. Si elimina il solvente residuo in SpeedVac e si riprende il precipitato con cloroformio deuterato su cui si esegue un'analisi $^1\text{H-NMR}$.

4.3.2.4 Sintesi del derivato Colanico-dodecilammina

In 4 ml di diclorometano anidro si sciolgono 400 mg di dodecildiammina (1.99 mmoli) sotto costante e vigorosa agitazione. Si aggiungono 600 μ l di trietilammina (TEA, 4.3 mmoli). Alla soluzione vengono aggiunti goccia a goccia 2 ml di diclorometano anidro contenenti 140 mg di acido colanico attivato a cloruro (0.37 mmoli) Si mantiene la reazione in condizioni anidre *overnight* sotto agitazione e a temperatura ambiente.

La miscela di reazione viene quindi filtrata, trasferita in un pallone da 500 ml contenente 300 ml di HCl 0.01 N. La miscela viene posta in rotavapor per eliminare la fase organica. Dopo completa evaporazione del diclorometano, si esegue una filtrazione utilizzando un filtro 0.22 μ m. La frazione di solido trattenuta dal filtro viene recuperata e liofilizzata. Una aliquota del prodotto viene disciolta in MeOH ed analizzato mediante spettrometria di massa.

4.3.2.5 Sintesi di (colanico)-(PULL₁)-(PEG)

	Rapporto molare rispetto ai gruppi aldeidici	mg	mmol
Pull ₁		100	0.74 (gruppi aldeidici)
Colanico-(CH ₂) ₁₂ -NH ₂	0.25	100.3	0.185
mPEG ₂₀₀₀ -NH ₂	0.25	370	0.185
(CH ₃ COO) ₃ BHNa	0.75	118	0.555
NaBH ₄	1	28	0.74

Tabella I

Ad una soluzione di 3 ml di cloroformio contenente 100.3 mg di colanico-dodecilammina (0.185 mmoli) vengono aggiunti 7 mL di DMF in cui sono sciolti a 50°C 100 mg di pullulano ossidato (PULL₁). Dopo 24 ore si aggiungono 118 mg di sodiotriacetossiboroidruro (0.555 mmoli, in 300 µl di DMF). La reazione viene mantenuta sotto stirring per 6 ore. Si aggiungono quindi 370 mg di mPEG₂₀₀₀-NH₂ sciolti in 1 ml di cloroformio. La miscela di reazione viene mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente overnight. Il volume del solvente viene ridotto in rotavapor, e il residuo oleoso viene ripreso con 10 ml di acqua mQ, agitando su vortex per garantire la completa dissoluzione del polimero anfifilico. La soluzione risulta torbida per la presenza di colanico-dodecilammina che non ha reagito. Si aggiungono 500 µl di una soluzione 56 mg/ml di sodioboroidruro (0.74 mmoli). Dopo 24 h la miscela di reazione viene acidificata con cautela a pH 6 per aggiunta di acido acetico, quindi si filtra con filtro 0.22 µm per rimuovere il derivato del colanico in sospensione e si purifica per ultrafiltrazione con Centricon con membrana con cut off di 30 kDa. L'eluato viene raccolto e su di esso viene determinata la presenza di PEG libero. Il prodotto viene liofilizzato e una aliquota viene prelevata per la caratterizzazione ¹H-NMR.

4.3.2.6 Sintesi di (colanico)-(PULL₂)-(PEG)

	Rapporto molare rispetto ai gruppi aldeidici	mg	mmol
Pull ₂		100	0.272 (gruppi aldeidici)
Colanico-(CH ₂) ₁₂ -NH ₂	0.25	37	0.068
mPEG ₂₀₀₀ -NH ₂	0.25	136	0.068
(CH ₃ COO) ₃ BHNa	0.75	43	0.204
NaBH ₄	1	10.3	0.272

Tabella II

Ad una soluzione di 6 ml di cloroformio contenente 37 mg di colanico-dodecilammina (0.068 mmoli) vengono aggiunti 14 mL di DMSO in cui sono sciolti a 50°C 100 mg di pullulano ossidato (PULL₂). Dopo 24 ore si aggiungono 43 mg di sodiotriacetossiboroidruro (0.204 mmoli, in 300 µl di DMF). La reazione viene mantenuta sotto stirring per 6 ore. Si aggiungono quindi 136 mg di mPEG₂₀₀₀-NH₂ sciolti in 1 ml di cloroformio. La miscela di reazione viene mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente *overnight*, e quindi il volume del solvente viene ridotto sotto vuoto e ripreso in acqua come riportato nel paragrafo precedente.

Si aggiungono quindi 500 µl di una soluzione 20.6 mg/ml di sodioboroidruro (0.272 mmoli). Dopo 24 h la miscela di reazione viene acidificata con cautela a pH 6 per aggiunta di acido acetico. Il prodotto della reazione viene purificato e caratterizzato come riportato nel paragrafo precedente.

4.3.2.7 Sintesi di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)

	Rapporto molare rispetto ai gruppi aldeidici	mg	mmol
Pull ₂		200	0.543 (gruppi aldeidici)
Colanico-(CH ₂) ₁₂ -NH ₂	0.25	73.6	0.136
PEG ₁₉₀₀ -(NH ₂) ₂	7.5	7737.8	4.073
(CH ₃ COO) ₃ BHNa	0.75	86.31	0.407
NaBH ₄	1	20.54	0.543

Tabella III

	Rapporto molare rispetto ai gruppi aldeidici	mg	mmol
Pull ₂		200	0.543 (gruppi aldeidici)
Colanico-(CH ₂) ₁₂ -NH ₂	1	294.3	0.543
PEG ₁₉₀₀ -(NH ₂) ₂	7.5	7737.8	4.073
(CH ₃ COO) ₃ BHNa	0.75	86.31	0.407
NaBH ₄	1	20.54	0.543

Tabella IV

	Rapporto molare rispetto ai gruppi aldeidici	mg	mmol
Pull ₂		200	0.543 (gruppi aldeidici)
Colanico-(CH ₂) ₁₂ -NH ₂	2	588.6	1.086
PEG ₁₉₀₀ -(NH ₂) ₂	7.5	6330	4.073
(CH ₃ COO) ₃ BHNa	0.75	70.57	0.407
NaBH ₄	1	20.54	0.543

Tabella V

Ad una soluzione di 12 ml di cloroformio contenente 73.6 mg (0.136 mmoli) (Tab. III), 294.3 mg (0.543 mmoli) (Tab. IV), 588.6 mg (1.09 mmoli) (Tab. V) di colanico-dodecilammina vengono aggiunti 28 mL di DMSO in cui sono sciolti a 50°C 200 mg di pullulano ossidato (PULL₂). Dopo 48 ore si aggiungono 86.31 mg di sodiotriacetossiboroidruro (0.407 mmoli, in 300 µl di DMSO). La reazione viene mantenuta sotto stirring per 24 ore. Si aggiungono quindi 7.737 g di PEG₁₉₀₀-(NH₂)₂ sciolti in una miscela 7/3 v/v di DMSO/cloroformio. La miscela di reazione viene mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente overnight. Il volume del solvente viene ridotto in rotavapor, e il residuo oleoso viene ripreso con 10 ml di acqua mQ, agitando fortemente su vortex per garantire la completa dissoluzione del polimero anfifilico. La soluzione risulta torbida per la presenza di colanico-dodecilammina che non ha reagito. Si aggiungono 20.54 mg di sodioboroidruro (0.543 mmoli). Dopo 24 h la miscela di reazione viene acidificata con cautela a pH 6 per aggiunta di acido acetico, quindi si filtra con filtro 0.22 µm per rimuovere il derivato del colanico in sospensione e si purifica per ultrafiltrazione con Centricon con membrana con cut off di 30 kDa. Il prodotto viene liofilizzato e una aliquota viene prelevata per la caratterizzazione ¹H-NMR.

4.3.2.8 Determinazione del peso molecolare del derivato ossidato del pullulano

I pesi molecolari medi del pullulano di partenza e del derivato ossidato sono stati determinati mediante analisi SEC-HPLC utilizzando colonne TSK G3000SW_{XL} e TSK G4000SW_{XL} (7.8 x 300 mm, Tosoh) in serie, eluite in condizioni isocratiche con tampone fosfato 100 mM, solfato di sodio 150 mM e 10% di metanolo, pH 6.9, ad un flusso 0.8 ml/min. Il profilo di eluizione è stato valutato utilizzando un detector ad indice di rifrazione (RI). Il peso molecolare del derivato del pullulano è stato determinato valutando i tempi di eluizione dei prodotti analizzati sulla base di una retta di taratura ottenuta impiegando standard di destrano a pesi molecolari noti (270 kDa, 150 kDa, 80 kDa, 50kDa, 25 kDa, 12kDa) (Figura 4.5).

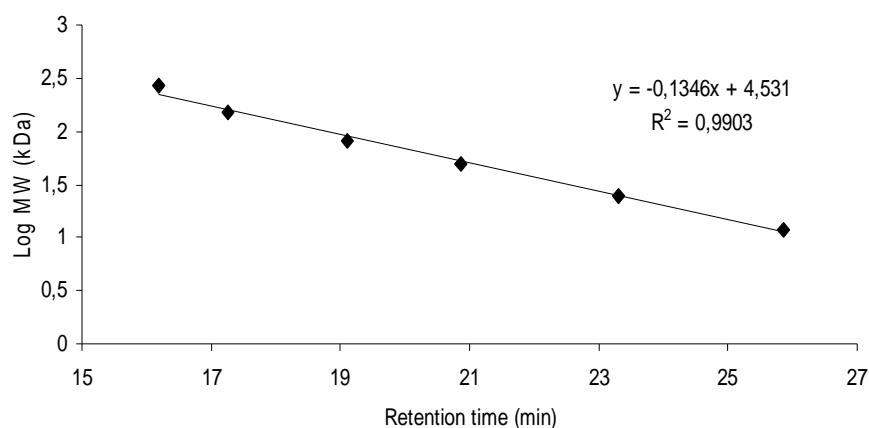


Figura 4.5: Retta di taratura di colonna GPC tramite standard di destrano a PM noto.

4.3.2.9 Determinazione della Concentrazione Micellare Critica (CMC)

Aliquote di ml di una soluzione mg/ml di pirene in acetone vengono poste in provette da 1.5 ml. Il solvente viene allontanato sotto vuoto in *Speed-Vac* e ad ogni campione vengono aggiunti 1 ml di soluzioni polimeriche a concentrazione crescente da 0.001 a 5 mg/ml. I campioni vengono mantenuti in agitazione overnight e quindi centrifugati a 4000 rpm per 2 minuti. Il surnatante viene quindi analizzato per fluorescenza ($\lambda_{eccitazione} = 339$ nm, $\lambda_{emissione} = 394$ nm). I valori di fluorescenza in scala logaritmica vengono riportati in grafico in funzione delle concentrazioni polimeriche per determinare il valore di CMC (Kwon G., 1993).

4.3.2.10 Determinazione delle dimensioni micellari

La dimensione delle micelle è stata valutata mediante Light-Scattering Dinamico (DLS) con soluzioni polimeriche in acqua a concentrazione 1 mg/ml.

4.3.2.11 Studio di solubilizzazione di paclitaxel

500 µg di paclitaxel vengono sciolti in 200 µl di una soluzione di (colanico)-(PULL₁)-(PEG) o (colanico)-(PULL₂)-(PEG) o (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) in DMF a concentrazione crescente (2, 4, 6, 10, 15 mg/ml). Il solvente viene rimosso sotto vuoto mediante *Speed-Vac* e ad ogni campione vengono aggiunti 200 µl di tampone PBS. I campioni vengono centrifugati a 6000 rpm per 4 minuti, e il surnatante prelevato viene immediatamente filtrato con filtro 0.22 µm e le soluzioni ottenute vengono sottoposte ad analisi HPLC con colonna Phenomenex Luna C18, eluita isocraticamente a 1 ml/min con acetonitrile/acqua (55:45 v/v), 0.05% TFA, e leggendo l'assorbanza a 227 nm. La concentrazione viene determinata considerando l'area del picco riferita ad una retta di taratura di paclitaxel in metanolo (Figura 4.6). Viene eseguita anche un'analisi utilizzando come bianco il pullulano ossidato per escludere eventuali capacità solubilizzanti del polisaccaride come tale.

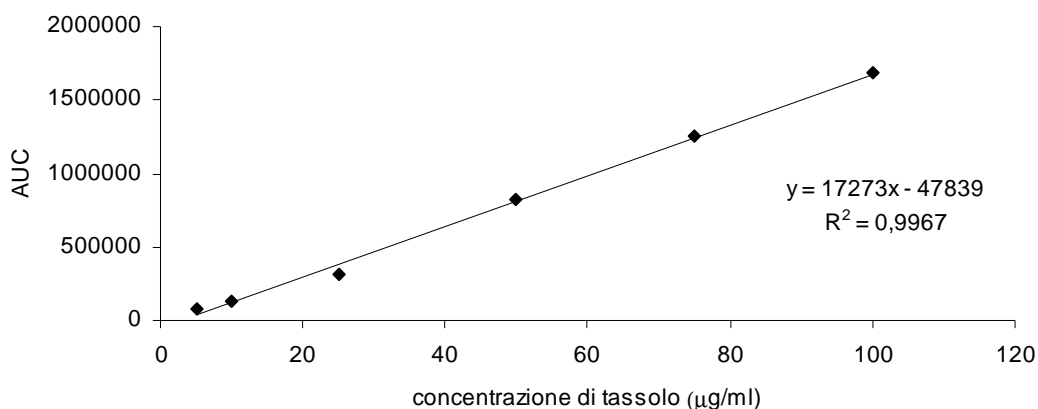


Figura 4.6: Retta di taratura di paclitaxel in metanolo mediante HPLC

4.3.3 Studio di veicolazione di [(ESDT)AuBr₂]

4.3.3.1 Determinazione epsilon molare

Viene preparata una soluzione madre a titolo noto di [(ESDT)AuBr₂] sciogliendo 4 mg di complesso metallico (7.28 μmoli) in 4 ml di DMSO (1.82 mM). La soluzione viene opportunamente diluita e ne viene determinato lo spettro di assorbimento nell'intervallo 200-400 nm. Si ottiene quindi l'assorbanza a 273 nm e si calcola l'ε molare sulla base della legge di Lambert Beer:

$$\text{Abs} = [\text{Conc}] \times [\text{cammino ottico}] \times [\epsilon_{\text{molare}}]$$

L'estinzione molare (ε) molare è risultata essere 18165 mol⁻¹ cm⁻¹.

Analogamente è stata determinata la ε molare anche di soluzioni di [(ESDT)AuBr₂] diluite in vari tamponi:

- Tampone acetato di sodio 50 mM a pH 4.5 : ε₂₆₇ molare = 15101
ε₃₁₃ molare = 9496
- Tampone fosfato 50 mM a pH 7.2 : ε₂₆₁ molare = 12054
ε₃₁₃ molare = 6284
- Tampone borato 50 mM a pH 8.5: ε₂₆₅ molare = 15088
ε₃₁₂ molare = 9359

4.3.3.2 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in tampone acquoso a vari pH

Si prepara una soluzione di [(ESDT)AuBr₂] 5.49 mg/ml in DMSO. La soluzione viene opportunamente diluita in:

- DMSO
- Tampone acetato di sodio 50 mM a pH 4.5
- Tampone fosfato 50 mM a pH 7.2
- Tampone borato 50 mM a pH 8.5

A tempi prestabiliti le soluzioni vengono analizzate mediante cromatografia RP con colonna Luna Phenomenex C18, eluita ad un flusso di 1 ml/min con gradiente acetonitrile/acqua contenenti lo 0.05% di TFA (gradiente: 0-18 minuti al 30% di acetonitrile; 24 minuti al 95% di acetonitrile; 27 minuti al 30% di acetonitrile). Il detector UV-Vis è stato impostato a 270 nm.

La Figura 4.7 mostra il profilo cromatografico RP-HPLC di [(ESDT)AuBr₂].

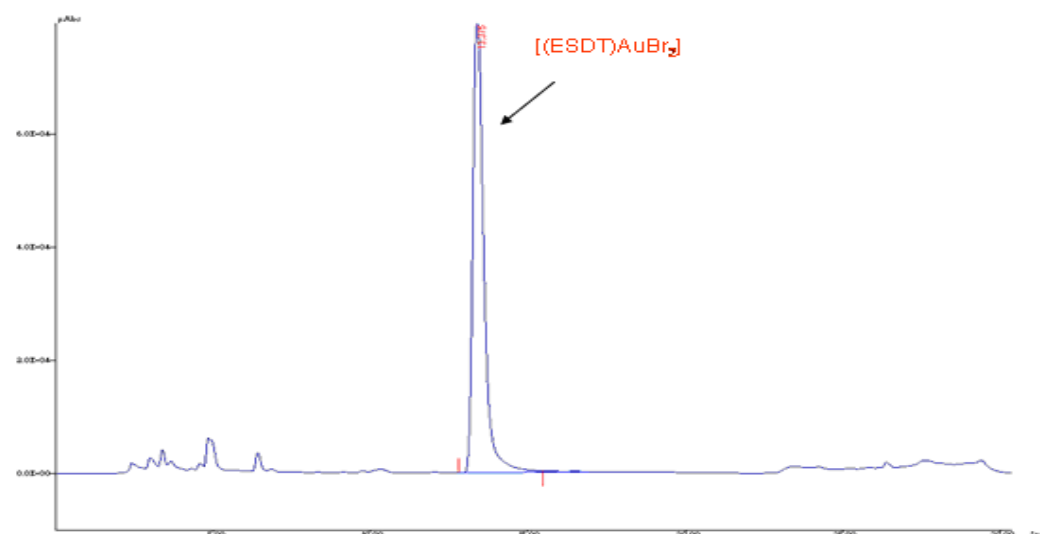


Figura4.7: Profilo cromatografico RP-HPLC di [(ESDT)AuBr₂].

La concentrazione di [(ESDT)AuBr₂] nei campioni è stata determinata sulla base dell'area del picco riferita ad una retta di taratura ottenuta con soluzioni a diluizioni note di [(ESDT)AuBr₂] (Figura 4.8).

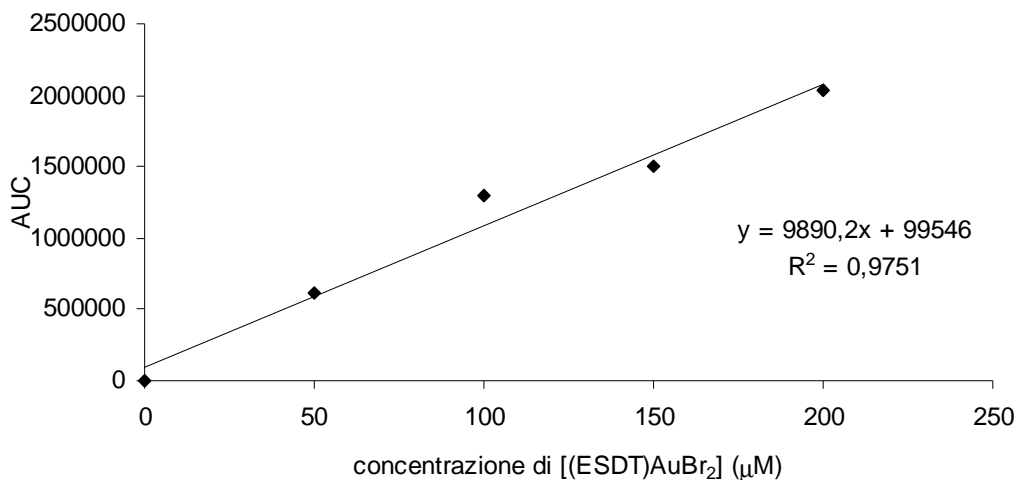


Figura 4.8: Retta di taratura di [(ESDT)AuBr₂] in DMSO eseguita mediante RP-HPLC.

4.3.3.3 Studi di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] in soluzione acquosa in presenza di micelle di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)

Lo studio di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] è stato condotto sia con il metodo per “co-solubilizzazione” in solvente organico (A) che per contatto diretto con [(ESDT)AuBr₂] solido (B) con i vari campioni di polimeri anfifilici.

A) Metodo per “co-solubilizzazione”. A 30 µl di soluzione 10 mg/ml di [(ESDT)AuBr₂] in DMF, vengono aggiunti 200 µl di una soluzione in DMF di polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) a concentrazione crescente (0, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 30 mg/ml). Il solvente organico viene rimosso mediante *Speed-Vac* e ogni campione viene risospeso in 200 µl di tampone acetato di sodio 50 mM a pH 4.5 posto sotto agitazione per 10 minuti.

B) Metodo per contatto diretto. A campioni di 30 µg di [(ESDT)AuBr₂] essiccati vengono aggiunti 200 µl di una soluzione in tampone acetato di sodio 50 mM a pH 4.5 di polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) a concentrazione

crescente (0, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 30 mg/ml) e le miscele vengono agitate blandamente per 72 ore.

Per entrambi i metodi, i campioni vengono centrifugati a 6000 rpm per 4 minuti, il surnatante filtrato con filtro da 0.22 μm . Le soluzioni ottenute vengono analizzate mediante RP-HPLC impiegando il metodo riportato precedentemente.

4.3.3.4 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in soluzione acquosa in presenza di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)

30 μl di una soluzione 10 mg/ml di [(ESDT)AuBr₂] in DMF, vengono aggiunti a 200 μl di contenente ciascuno dei polimeri (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) in DMF (5 mg/ml). Il solvente organico viene rimosso mediante *Speed-Vac* e ogni campione viene risospeso in 200 μl di tampone fosfato 50 mM a pH 7.2 agitando per 10 minuti. La sospensione viene centrifugata a 6000 rpm per 4 minuti e il surnatante filtrato con filtro da 0.22 μm .

Le soluzioni ottenute vengono analizzate a tempi definiti mediante cromatografia RP-HPLC come riportato precedentemente.

4.3.3.5 Studio di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] in soluzione acquosa in presenza di Ciclodestrine

Lo studio di dissoluzione di [(ESDT)AuBr₂] con ciclodestrine è stato condotto sia con il metodo per “co-solubilizzazione” in solvente organico (A) che per contatto diretto con [(ESDT)AuBr₂] solido (B) come riportato per i derivati del pullulano nel paragrafo 4.3.3.3. Sono state preparate soluzioni a concentrazioni crescenti di ciclodestrine nei seguenti range:

- β -ciclodestrine : da 0 a 14 mg/ml
- Me- β -ciclodestrine : da 0 a 40 mg/ml.
- HP- β -ciclodestrine : da 0 a 40 mg/ml.

Dopo filtrazione, le soluzioni ottenute sono state analizzate tramite spettroscopia UV-Vis determinando l'assorbanza a 270 nm e 312 nm e ricavando la concentrazione del farmaco in soluzione dal valore della ϵ molare. La concentrazione del farmaco è stata anche determinata mediante analisi RP-HPLC come riportato nel paragrafo 4.3.3.2.

4.3.3.6 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in soluzione acquosa in presenza di Ciclodestrine

Lo studio di stabilità di [(ESDT)AuBr₂] è stato condotto seguendo la stessa procedura riportata nel paragrafo 4.3.3.4 ma impiegando β -CD o metil- β -CD o HP- β -CD.

4.3.3.7 Studio di citotossicità

Le linee cellulari MCF-7 (adenocarcinoma mammario), KB (carcinoma nasofaringeo) ed HeLa (carcinoma della cervice uterina) sono state mantenute in crescita logaritmica a 37° C, 5% CO₂ impiegando terreno DMEM, addizionato di glutammina, penicillina (50 U/ml), streptomicina (50 μ g/ml) e siero fetale bovino (10%). Vengono seminate 6×10^3 cellule per pozzetto in 200 μ L di terreno completo in piastra a 96 pozzetti. Dopo 24 ore il terreno viene rimosso e sostituito con 100 μ L di terreno contenente concentrazioni crescenti di [(ESDT)AuBr₂] e di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)-[(ESDT)AuBr₂], oppure di HP- β -CD -[(ESDT)AuBr₂] (0.1-100 μ M [(ESDT)AuBr₂] equivalente). Dopo 24 ore dal trattamento vengono aggiunti in ogni pozzetto 20 μ L di soluzione di MTT (5 mg/ml in tampone PBS). Trascorse 5 ore il terreno viene rimosso da ciascun pozzetto e sostituito con 200 μ L di DMSO. Le piastre vengono mantenute sotto blanda agitazione per 2 ore per garantire la completa dissoluzione dei cristalli di formazano, e quindi si determina l'assorbanza a 570 nm.

4.3.3.8 Farmacocinetica

14 mg di polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) oppure 80 mg di HP-β-CD sono stati sciolti in 200 μL di DMF e a ciascuna soluzione sono stati aggiunti 4.4 mg di [(ESDT)AuBr₂]. Dopo completa dissoluzione del farmaco il solvente organico è stato rimosso sotto vuoto, e il residuo solido risospeso in 2 ml di tampone acetato di sodio 50 mM, pH 4.5, agitato per 10 minuti a temperatura ambiente per favorire la completa dissoluzione del residuo. Il campione è stato centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti, filtrato con filtro da 0.22 μ, e quindi analizzato in HPLC per determinare la concentrazione di farmaco: 200 μL di soluzione sono stati iniettati nella vena caudale a 5 topi BALB/c. A tempi prestabiliti si sono prelevati 100 μL di sangue dalla seno retro-orbitale. Il sangue è stato trattato con acqua regia (HNO₃/HCl 1:3 v/v) riscaldando a 90°C per 2 h. La soluzione è stata trasferita in matraccio da 5 ml, e portata a volume con HCl all'1% v/v. L'analisi quantitativa dell'oro è stata condotta con Atomic Absorption Spectrometers (AAS) usando il Varian's AA240 con il fornetto di grafite GTA120 e Zeeman background corrector e autosampler, (Varian AA240 Zeeman, Varian Inc.).

4.3.4 Sintesi e caratterizzazione dei profarmaci polimerici (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX)

4.3.4.1 Sintesi di (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst)

Il polimero (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst) è stato sintetizzato con la procedura modificata ripresa da Matsunaga e coll. (Matsunaga, K., 2004).

1.5 g di pullulano ossidato al 22% (4.07 mmoli di aldeidi reattive) sono stati sciolti in 100 ml di acqua. A completa dissoluzione del pullulano, 1.57 g di cisteamina (20 mmoli) vengono aggiunti in 5 aliquote a distanza di 2 ore direttamente alla soluzione, che viene posta a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. La miscela di reazione viene acidificata a pH 6 con HCl. Dopo 3 ore dall'ultima aggiunta di cisteamina si aggiungono 1.25 g di NaCNBH₃ (20 mmoli). Dopo 24 ore di reazione si aggiungono 15.5 g di PEG₁₉₀₀(NH₂)₂ anidrificato (8.15

mmoli). Si lascia reagire per ulteriori 24 ore mantenendo costantemente il pH a 6. Infine, la soluzione viene basificata a pH 9 per aggiunta di NaOH 1.0 N e aggiunta di 0.758 g di NaBH₄ (20 mmoli). Dopo altre 24 ore si acidifica nuovamente la soluzione per neutralizzare l'eventuale NaBH₄ che non ha reagito e la soluzione finale viene liofilizzata. Il residuo ottenuto viene sospeso in 100 ml di diclorometano in modo da solubilizzare ed eliminare il PEG in eccesso. Dopo aver centrifugato e allontanato tutto il diclorometano, il precipitato rimasto viene essiccato a pressione ridotta fino alla completa rimozione del solvente organico ed infine sciolto in 150 ml di acqua milliQ. La soluzione viene quindi purificata per ultrafiltrazione con una membrana con *cut-off* di 10 kDa. La purificazione viene condotta estesamente fino alla completa eliminazione della cisteamina non legata. La soluzione finale viene liofilizzata e sul prodotto, (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst), si eseguono il test di Snyder per la determinazione dei gruppi amminici ed il test di Elmann per la quantificazione dei gruppi tiolici, come riportato nei paragrafi 4.3.1.2 e 4.3.1.3, rispettivamente.

4.3.4.2 Sintesi di acido folico N-idrossisuccinimide estere (FA-NHS)

Ad una soluzione di 1 g di acido folico (2.27 mmoli) in 20 ml di DMSO anidro si aggiungono 0.261 g di N-idrossisuccinimide (2.27 mmoli) e 0.468 g di dicicloesilcarbodiimide (2.27 mmoli). La reazione viene condotta per 12 ore sotto agitazione, a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene filtrata per allontanare la dicicloesil urea e FA-NHS viene precipitato in etere anidro, lavato più volte con etere, ed essiccato sottovuoto (Lee, R.J. 1994).

4.3.4.3 Derivatizzazione di (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst) con acido folico

1.0 g di (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst) (0.15 mmoli di -NH₂) viene solubilizzato in 10 ml di DMSO anidro. Alla soluzione vengono aggiunti direttamente 323 mg di acido folico attivato (0.6 mmoli) in presenza di trietilammina (TEA) e la miscela di reazione viene mantenuta per 24 ore a temperatura ambiente sotto costante agitazione e al buio. Il polimero derivatizzato viene recuperato per ricristallizzazione in dietilere ed essiccato a pressione ridotta (Lee R.J.,1994). Il precipitato viene sciolto

in acqua e, dopo centrifugazione, purificato ulteriormente per ultrafiltrazione con membrana con *cut-off* di 10 kDa. Il processo di ultrafiltrazione viene condotto fino a scomparsa di colorazione gialla nell'eluato, verificando l'assenza di AF che non ha reagito mediante analisi RP-HPLC con colonna Phenomenex Luna C18 RP, eluita con acqua e acetonitrile entrambi con 0.05% TFA e gradiente dal 5% al 75% di acetonitrile in 22 minuti. Il rivelatore UV-Vis è stato fissato a 363 nm. Il prodotto ottenuto viene liofilizzato e il grado di derivatizzazione del prodotto finale, (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst), con l'acido folico è stato valutato mediante analisi spettrofotometrica. Una quantità esattamente pesata di polimero viene sciolta in PBS, pH 7.2, e su questa soluzione si determina la concentrazione di acido folico legato, sapendo che il suo coefficiente di estinzione molare a 363 nm è 6500 M⁻¹ cm⁻¹.

4.3.4.4 Sintesi doxorubicina-EMCH (DOX-EMCH)

150 mg di doxorubicina cloridrato (0.26 mmoli - DOX HCl), liofilizzato commerciale, vengono sospesi in 60 ml di metanolo ed il lattosio viene allontanato per filtrazione. La soluzione limpida che si ottiene contenente la DOX HCl viene concentrata con rotavapor a pressione ridotta.

100 mg di acido N-(ε-maleimidocaproico)-idrazide trifluoroacetilato (0.294 mmoli - EMCH) e 20 µl di acido trifluoroacetico (TFA) vengono aggiunti alla miscela di reazione che viene mantenuta *overnight* a temperatura ambiente sotto costante agitazione magnetica ed al riparo dalla luce. La miscela di reazione viene quindi concentrata in rotavapor al minimo volume (7-8 ml) e successivamente diluita con 35 ml di acetonitrile. Dopo 48 ore a 4°C e al riparo dalla luce viene recuperato il prodotto desiderato come un precipitato di colore rosso. Il prodotto viene raccolto per centrifugazione, lavato con una miscela 1:10 di MeOH/ACN ed essiccato sotto vuoto. L'identità chimica del prodotto finale viene confermata mediante analisi ESI-TOF (Willner, D., 1993).

4.3.4.5 Derivatizzazione di (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst) e (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst) con DOX-EMCH

DOX-EMCH è stata coniugato ad (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst) e ad (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst) secondo la metodica riportata in letteratura (Di Stefano, G., 2004).

300 mg di (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst) o (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst) (0.29 mmoli di gruppi -SH) vengono sciolti in 50 ml acqua milliQ in presenza di 10 mg di tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP). Il pH della soluzione viene portato a 8 con NaOH 0.1N. Nella soluzione vengono aggiunti 500 µl di una soluzione di DOX-EMCH in DMF in 10 aliquote da 50 µl ad intervalli di 5 minuti. La reazione viene condotta a temperatura ambiente sotto costante agitazione e al riparo dalla luce. Il pH viene costantemente controllato e mantenuto a 7, neutralizzando eventualmente la soluzione con NaOH 0.1N. Dopo 1 ora dall'ultima aggiunta la soluzione viene centrifugata e il surnatante viene ultrafiltrato con sistema Centriprep utilizzando una membrana con *cut-off* di 10 kDa.

Il prodotto viene quindi liofilizzato e poi ulteriormente lavato in metanolo per eliminare eventuali prodotti secondari ancora presenti. La quantità di doxorubicina legata al polimero (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) o (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX) viene misurata spettrofotometricamente a 495 nm ($\epsilon = 9250 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (Di Stefano, G., 2004) da una soluzione a quantità nota di bioconiugato in tampone fosfato 20 mM, NaCl 150 mM (PBS) a pH 7.4

4.3.4.6 Determinazione del peso molecolare del pullulano, del suo derivato ossidato e del (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX)

Il peso molecolare del pullulano di partenza, del suo derivato ossidato e del polimero (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) sono stati determinati mediante analisi SEC-HPLC utilizzando colonne TSK G3000SW_{XL} e TSK G4000SW_{XL} (7.8 x 300 mm, Tosoh) come riportato nel paragrafo 4.3.2.8.

4.3.4.7 Analisi dimensionale

La dimensione dei bioconiugati (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX) sono state valutate mediante Light-Scattering Dinamico (DLS).

È stata analizzata una soluzione di polimero in tampone 20 mM fosfato di sodio, 0.15 M NaCl, pH 7.4 a concentrazione 0.2 e 20 mg/ml, con l'utilizzo di un software che permette l'identificazione di distribuzioni gaussiane o multidisperse (funzione Nicomp).

4.3.4.8 Rilascio di doxorubicina

Una soluzione di (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) oppure (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX) in tampone 1 mM fosfato di sodio, pH 6.9 viene suddivisa in 3 parti e diluita 1:2 con tampone 40 mM fosfato di sodio e 0.3 M NaCl pH 7.4 e con tampone acetato di sodio 0.2 M pH 5.5 e con plasma. I campioni sono stati incubati a 37°C. A tempi prestabiliti sono stati prelevati 50 µL dei campioni in tampone e analizzati mediante SEC-HPLC utilizzando una colonna Bio-GEL 40 XL, eluita in maniera isocratica con tampone 150 mM Na₂SO₄ e 100 mM NaH₂PO₄, 10% ACN, pH 7.2. Il profilo di eluizione è stato acquisito mediante determinazione spettrofotometrica a 495 nm e dalle AUC relative ai picchi ottenuti è stato possibile quantificare la doxorubicina legata al polimero rispetto alla doxorubicina rilasciata.

Del campione in plasma vengono prelevati 30 µl e diluiti 1:2 con tampone 150 mM Na₂SO₄ e 100 mM NaH₂PO₄, 10% ACN, pH 7.2. I campioni così ottenuti sono stati centrifugati per 3 minuti a 10000 rpm ed il surnatante è stato analizzato con SEC-HPLC. È stata effettuata anche un'analisi di un campione di plasma senza doxorubicina in modo da quantificare e sottrarre l'assorbimento di proteine plasmatiche.

4.3.4.9 Studi di citotossicità su cellule tumorali

Le cellule MCF-7, KB ed HeLa vengono mantenute in crescita logaritmica a 37° C, 5% CO₂ impiegando terreno DMEM *folate free*, addizionato di glutammina, penicillina (50 U/ml), streptomina (50 µg/ml) e siero fetale bovino (10%). Dopo diversi passaggi in terreno privo di acido folico, le linee cellulari KB ed HeLa sovraesprimono il recettore per l'acido folico, e pertanto sono chiamate KB-HiFR ed HeLa HiFR. I saggi di citotossicità vengono condotti con 2 diverse metodi: Il primo (A) prevede una incubazione di 24 o 72 ore a contatto coi polimeri da testare, il secondo (B) consiste in una metodica “*pulse & chase*”, con un breve tempo di contatto tra le cellule e i composti (30 min), seguiti da 72 ore di incubazione in terreno completo.

A) Vengono seminate 6×10^3 cellule per pozzetto in 200 µL di terreno completo in piastra a 96 pozzetti. Dopo 24 ore il terreno viene rimosso e sostituito con 100 µL di terreno contenente concentrazioni crescenti di doxorubicina e dei bioconiugati (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX). Dopo 24 o 72 ore dal trattamento vengono aggiunti in ogni pozzetto 20 µL di soluzione di MTT (5 mg/ml in tampone PBS). Trascorse 5 ore il terreno viene rimosso da ciascun pozzetto e sostituito con 200 µL di DMSO. Le piastre vengono mantenute sotto blanda agitazione per 2 ore per garantire la completa dissoluzione dei cristalli di formazano, e quindi si determina l'assorbanza a 570 nm.

B) Il saggio viene allestito come riportato nel paragrafo precedente. In breve si seminano 6×10^3 cellule per pozzetto in 200 µL di terreno completo in piastra a 96 pozzetti. Dopo 24 ore il terreno viene rimosso e sostituito con 100 µL di terreno contenente concentrazioni crescenti di doxorubicina e dei bioconiugati (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX). Trascorsi 30 minuti il trattamento viene rimosso, le cellule vengono lavate 2 volte con 200 µL di PBS, e quindi incubate per 72 ore con terreno completo.

Trascorso il periodo di incubazione vengono aggiunti in ogni pozzetto 20 µL di soluzione di MTT (5 mg/ml in tampone PBS). Dopo 5 ore il terreno viene rimosso da

ciascun pozzetto e sostituito con 200 μL di DMSO. Le piastre vengono mantenute sotto blanda agitazione per 2 ore e quindi si determina l'assorbanza a 570 nm

4.3.4.10 Studio di internalizzazione mediante citofluorimetro

2×10^6 cellule HeLa HiFR sono state seminate in piastre di Petri in terreno FD-DMEM. Dopo 24 h, il terreno viene rimosso e le cellule trattate con una soluzione di DOX 10 μM , oppure di (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) oppure (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX) (conc. 10 μM DOX-equivalente). A tempi prestabiliti (5, 30, 60, 300 min) il terreno è stato rimosso, le cellule sono state raccolte con tripsina, la sospensione è stata centrifugata e lavata più volte con PBS. Il *pellet* è stato infine sospeso in 100 μL di PBS, e i campioni sono stati analizzati con ImageStream® multispectral imaging flow cytometer (Amnis co).

4.3.4.11 Studi di citotossicità su linee cellulari endoteliali

La citotossicità dei coniugati è stata valutata su due linee endoteliali umane, HUVEC (*human umbelical vein endothelial cells*) e su HBMEC (*human bone marrow endothelial cells*). Le cellule endoteliali sono state seminate (15000 per pozzetto) in piastra a 24 pozzetti; dopo 24 ore il terreno è stato rimosso e le cellule sono state trattate con soluzioni a concentrazione crescente di DOX, (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) o (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX). Il trattamento è stato condotto per 72 ore, quindi le cellule sono state trattate con tripsina, e la sospensione analizzata con Coulter Counter. La percentuale di cellule viene valutata in riferimento al controllo non trattato.

4.3.4.12 Studio di formazione di capillari su Matrigel

La superficie di una piastra a 24 pozzetti è stata trattata con Matrigel (matrice da membrana basale) (50 $\mu\text{L}/\text{well}$) in bagno di ghiaccio. La matrice è stata incubata per 30 min a 37° per favorire la polimerizzazione.

Le HUVEC (3×10^4) sono state trattate con DOX, (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) o (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX) a concentrazioni di 0.01 μ M e 1 μ M. Le cellule così trattate sono state seminate nelle piastre precedentemente ricoperte da Matrigel, in presenza di terreno EGM-2. Dopo 6 h di incubazione (37°C; 5% CO₂), I pozzetti sono stati analizzati con microscopio invertito Nikon TE2000E equipaggiato con fotocamera Nikon DS5 cooled CCD con obiettivo 4X, usando una tecnica bright-field.

4.3.4.13 Studi di farmacocinetica

100 μ l di una soluzione 0.5 mg/ml di doxorubicina o di (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) doxorubicina equivalente in tampone 20 mM fosfato di sodio, 0.15 M NaCl, pH 7.4 sono stati iniettati nella vena caudale di topi Balb/c maschi del peso di 20-22 g. Le concentrazioni di doxorubicina delle due soluzioni sono state determinate con una misura spettrofotometrica a 495 nm. A tempi prestabiliti, vengono prelevati 50 μ l di sangue dal plesso retrobulbare. I campioni di sangue sono centrifugati a 3500 rpm per 3 minuti e si prelevano 20 μ l di surnatante ai quali vengono aggiunti 200 μ l di una miscela 50:50 (v/v) di metanolo/ZnSO₄ al 40%. La miscela viene centrifugata a 12000 giri per 5 minuti. Il surnatante viene diluito 1:2 con acqua al 5% di TFA, centrifugato a 5000 giri per 10 minuti ed analizzato in RP-HPLC equipaggiata con colonna Phenomenex Luna C18 (4.6 x 250 mm) eluita in condizioni isocratiche con acqua milliQ (0.05% TFA) e 30% ACN (0.05% TFA), ad un flusso di 1 ml/min utilizzando il rivelatore a fluorescenza, con λ eccitazione= 475 nm e λ emissione= 580 nm. Per l'integrazione delle aree è stata utilizzata una retta di taratura realizzata in RP-HPLC per la quantificazione della doxorubicina in metanolo (Figura 4.9).

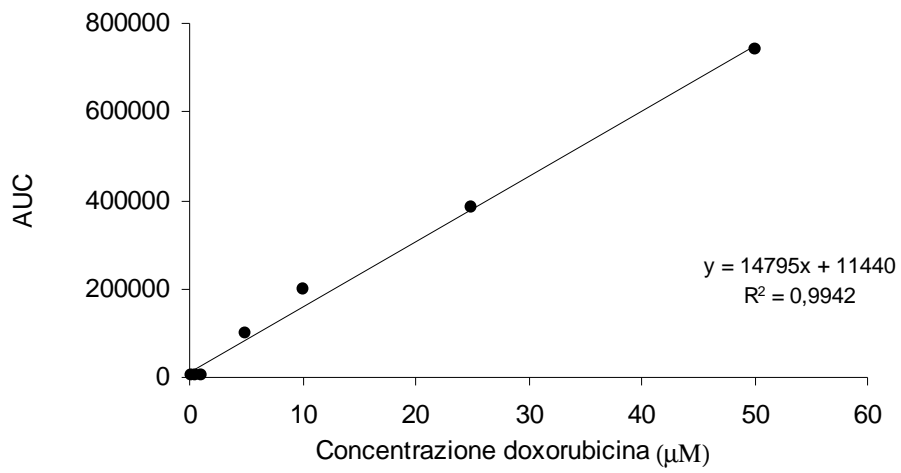


Figura 4.9: retta di taratura per la quantificazione della doxorubicina in metanolo

I valori sperimentali sono stati elaborati con il software Kinetica per calcolare i principali parametri farmacocinetici.

5. RISULTATI

5.1 Sintesi e caratterizzazione di graft copolymers auto assemblanti

5.1.1 Ossidazione del pullulano

Uno studio preliminare è stato condotto per valutare le condizioni di attivazione del pullulano con periodato di sodio. Tale reattivo permette l'ossidazione selettiva dei dioli vicinali dell'unità glucopiranosica ad aldeidi, con simultanea rottura del legame C₂-C₃ e conseguente apertura dell'anello glucopiranosico secondo lo schema di reazione riportato in Figura 5.1.

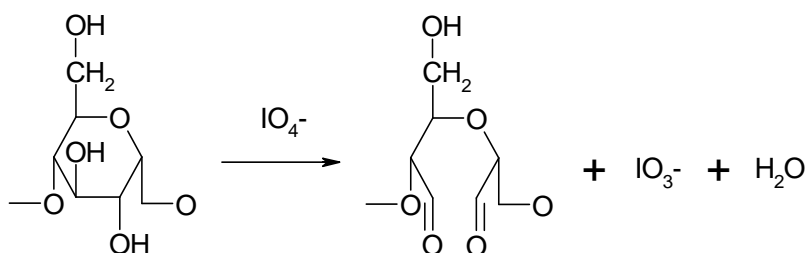


Figura 5.1: Reazione di ossidazione del pullulano e formazione del derivato polialdeidico

In realtà il pullulano possiede 3 differenti unità glucosidiche e di conseguenza anche i gruppi diolici vicinali dei singoli residui acquistano caratteristiche e reattività leggermente differenti (Figura 5.2).

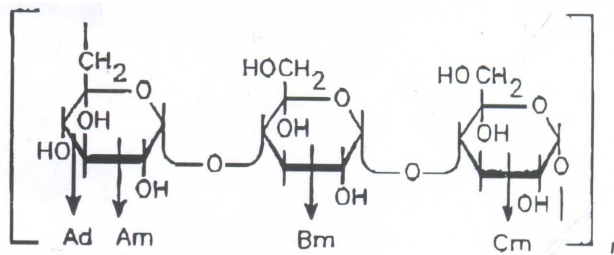


Figura 5.2: Siti di ossidazione del pullulano trattato con periodato. Am, Bm e Cm rappresentano ossidazioni singole, Ad rappresenta il sito che subisce ossidazione a doppio step

I polisaccaridi caratterizzati dalla presenza di legami glicosidici α -1,6 (come il destrano e il pullulano stesso) possiedono unità glicosidiche con 3 gruppi idrossilici adiacenti. Mentre l'ossidazione di una unità glucosidica legata tramite legame α -1,4 porta alla formazione di una dialdeide in un singolo passaggio. Lo schema di ossidazione riportato in Figura 5.3 mostra che l'ossidazione totale del monomero avente il legame α -1,6 è a due passaggi: nel primo viene generato un gruppo α -idrossialdeidico, nel secondo questo viene ulteriormente ossidato portando alla formazione della dialdeide finale con liberazione di una molecola di acido formico.

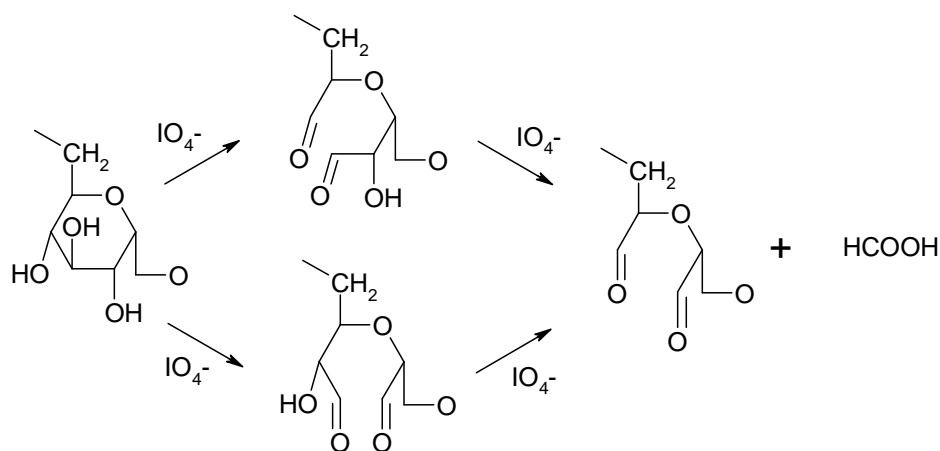


Figura 5.3: Ossidazione di una unità glucosidica avente legame glicosidico α -1,6

La determinazione del contenuto di aldeidi del polimero viene effettuata mediante reazione del prodotto ossidato con idrossilammina cloridrato e successiva titolazione potenziometrica dell'HCl liberato con standard di sodio idrossido. Come riportato in letteratura, tale metodo è in grado di determinare solo 2/3 delle aldeidi totali (Bruneel D., 1993). Il metodo infatti prevede un attacco nucleofilo del reagente al carbonio carbonilico, ma non tutte le aldeidi sono accessibili. Una possibile spiegazione di tale fenomeno è la formazione di un emiacetale (con riciclaggio) a livello dei residui glicosidici con legami α -1,4. Questo si traduce, nell'unità maltotriosica completamente ossidata, in una protezione (e conseguente perdita di reattività) di 2 delle 6 aldeidi ottenute. La Figura 5.4 mostra il profilo cinetico ottenuto utilizzando un rapporto molare tra periodato e unità glicosidiche pari a 1.2:1.

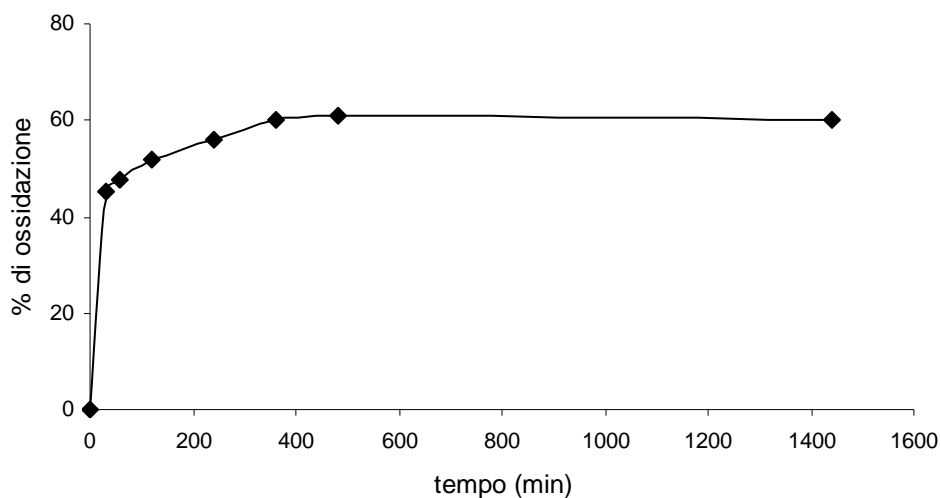


Figura 5.4: Cinetica di ossidazione di pullulano con eccesso di periodato (rapporto ossidante/unità glicosidiche 1.2:1)

Il grafico mostra come l'ossidazione dei dioli sia un processo rapido, con formazione del 60% delle aldeidi totali in soli 30 minuti e raggiungimento del plateau dopo circa 6 ore.

Lo studio condotto a 25 e a 4 °C ha dimostrato una influenza trascurabile della temperatura sul processo di ossidazione.

Sulla base dei risultati ottenuti sono stati preparati due polimeri ossidati impiegando un rapporto periodato/monomeri glucosidici 1.2:1 e 1:3. Nel primo caso si sono titolati il 65% di aldeidi sul massimo del valore possibile. Poiché solo 2/3 delle aldeidi sono reattive, l'ossidazione del polimero è da considerarsi completa con il 100% di unità glicosidiche ossidate. La resa di prodotto è risultata essere dell'89%, mentre l'ossidazione ha portato ad una riduzione del PM del pullulano da 136 kDa a 20 kDa. Impiegando un rapporto periodato/unità glucosidiche di 1:3 si è calcolata la presenza di 22% di aldeidi sul valore massimale. Questo significa che si sono ossidate il 33% delle unità glicosidiche. La resa di prodotto di ossidazione è risultata essere dell'85%. L'analisi di gel filtrazione del prodotto ossidato ha dimostrato che l'ossidazione porta ad una riduzione del peso molecolare del pullulano da 136 kDa a 93 kDa.

5.1.2 Sintesi dell'acido 5 β -colanico-dodecilammina

Il derivato acido 5 β -colanico-dodecilammina è stato ottenuto facendo reagire il cloruro dell'acido β -colanico con dodecildiammina. Il cloruro dell'acido 5 β -colanico è stato ottenuto per reazione dell'acido colanico con tionilcloruro secondo lo schema di reazione descritto il Figura 5.5

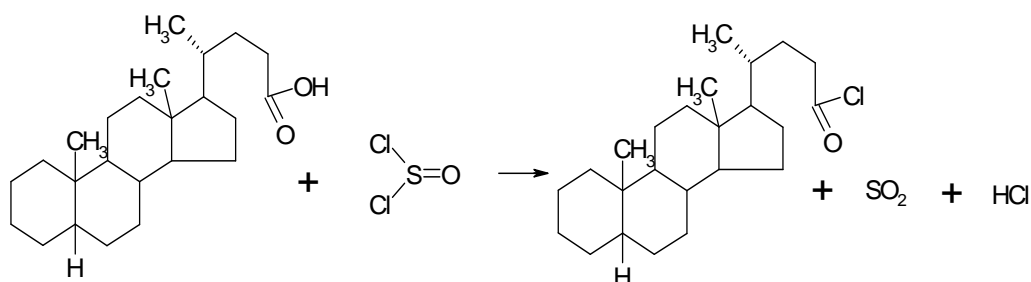


Figura 5.5: Schema di sintesi dell'attivazione a cloruro dell'acido 5 β -colanico

Il grado di attivazione dell'acido colanico al conseguente cloruro è stato determinato per reazione con metanolo e analisi ¹H-NMR. In Figura 5.6 viene riportato lo spettro NMR del prodotto di reazione del cloruro dell'acido colanico con metanolo in CDCl₃.

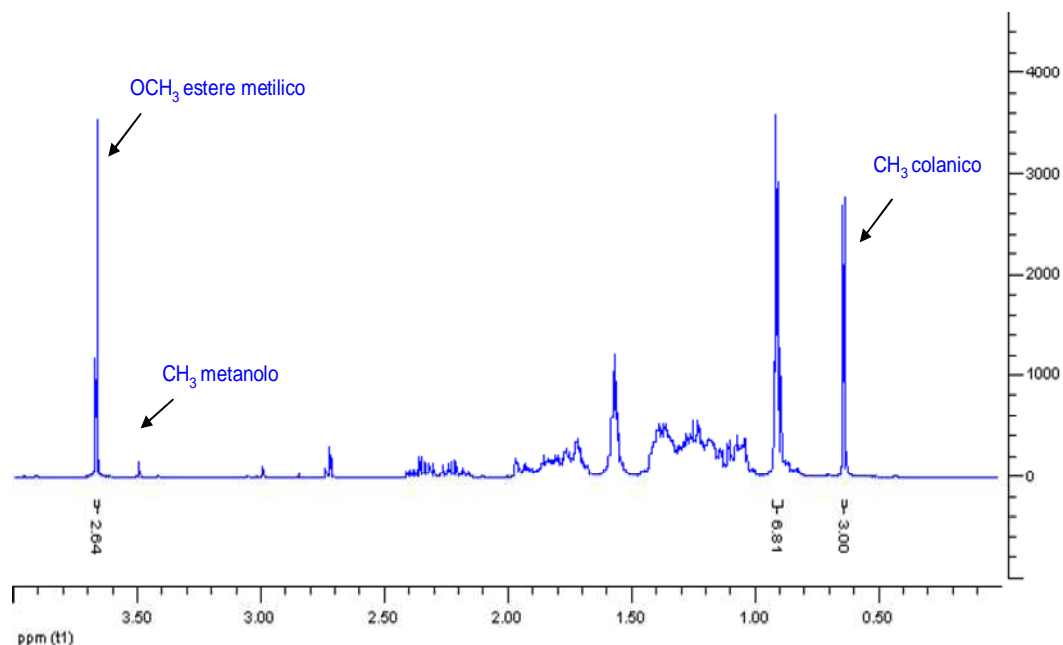


Figura 5.6: Spettro $^1\text{H-NMR}$ del colanico attivato a cloruro in CDCl_3

Chemical Shift (δ , ppm)	Molteplicità	Assegnazione	n. protoni
0.640	S	18- CH_3	3
0.911	S	19- CH_3	3
0.92	D	21- CH_3	3
1-2.5	M	Scheletro metilenico/metinico	
3.661	S	OCH_3 dell'estere metilico	2,64 (attesi 3)

Tabella VI

Imponendo pari a 3H l'integrale del picco a 0.640 ppm, il rapporto fra l'area del segnale a 3.661 ppm e l'area del primo picco permette di risalire al grado di attivazione a cloruro. Una eventuale traccia di metanolo residuo non interferisce con il calcolo in quanto il suo singoletto cade a δ diverso (3.49 ppm). La percentuale di derivatizzazione è risultata essere del 92%, mentre la resa di reazione è dell' 88%.

La reazione del cloruro dell'acido colanico con dodecildiammina è stata condotta in cloruro di metilene secondo lo schema in Figura 5.7, impiegando un forte eccesso di dodecildiammina per evitare la formazione del composto a entrambi i gruppi amminici della catena alchilica.

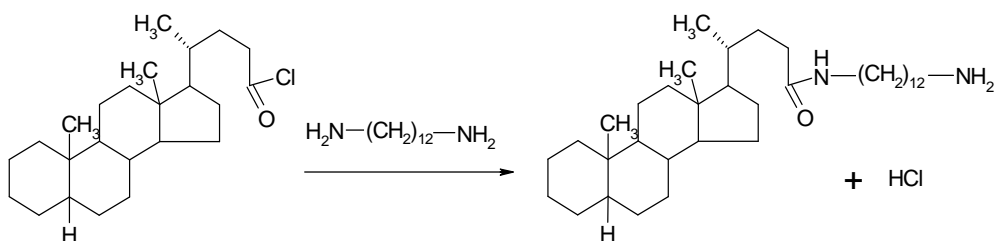


Figura 5.7: Schema di sintesi del derivato colanico-dodecilammina

Il processo di purificazione del derivato acido colanico-dodecilammina sfrutta l'insolubilità del prodotto in acqua acida, in cui invece risulta solubile la dodecildiammina. Il metodo consente di ottenere un prodotto puro, come evidenzia lo spettro di massa riportato in Figura 5.8 conseguente al prodotto precipitato.

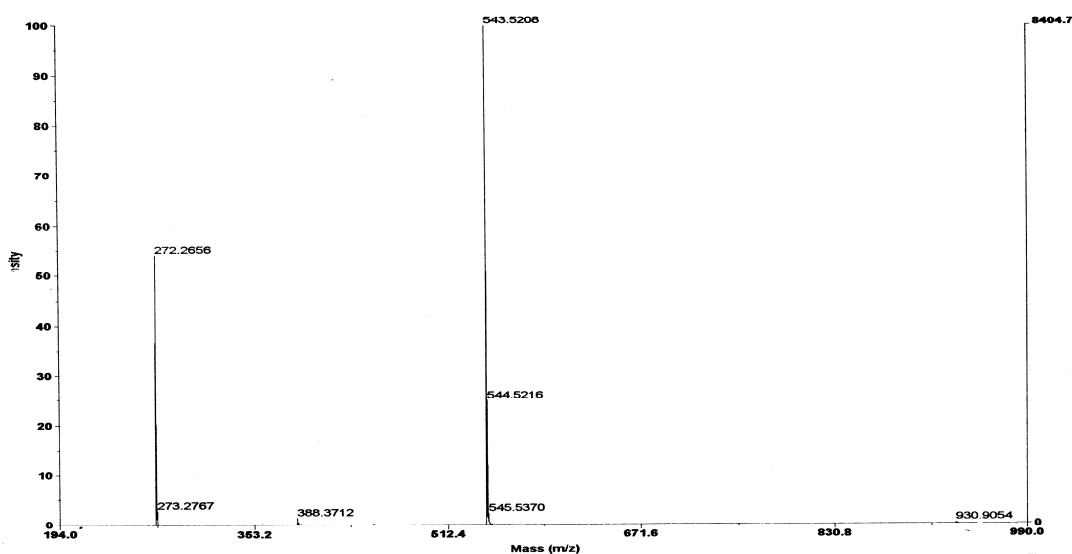


Figura 5.8: Spettro di massa di colanico-dodecilammina

La sostanza ha un PM teorico di 542 Da. Lo spettro mostra un segnale a 543.5 m/z (ione molecolare, +1) e uno a 272.2 m/z (+2), dimostrando la formazione del prodotto desiderato. La purezza è elevata, data l'assenza dei segnali tipici dei reagenti a 343 m/z per l'acido 5 β -colanico e a 200 m/z per la dodecildiammina.

5.1.3 Sintesi di (colanico)-(PULL)-(PEG)

Lo schema di reazione per la coniugazione del colanico-dodecilammina e PEG-NH₂ al pullulano ossidato è riportato in Figura 5.9. Nel primo passaggio i derivati amminici di PEG e colanico vengono fatti reagire col pullulano polialdeidico. La formazione della base di Schiff, legame instabile, si verifica lentamente e prevede un equilibrio poco favorevole. Nel passaggio successivo tale legame viene stabilizzato ad ammina secondaria tramite aggiunta di sodio triacetossiboroidruo, riducente selettivo per le immine. Nell'ultimo passaggio le aldeidi residue del polimero vengono ridotte con un secondo riducente, il sodio boroidruo, attivo su gruppi aldeidici e carbonilici ma non su esteri ed ammidi (Figura 5.9).

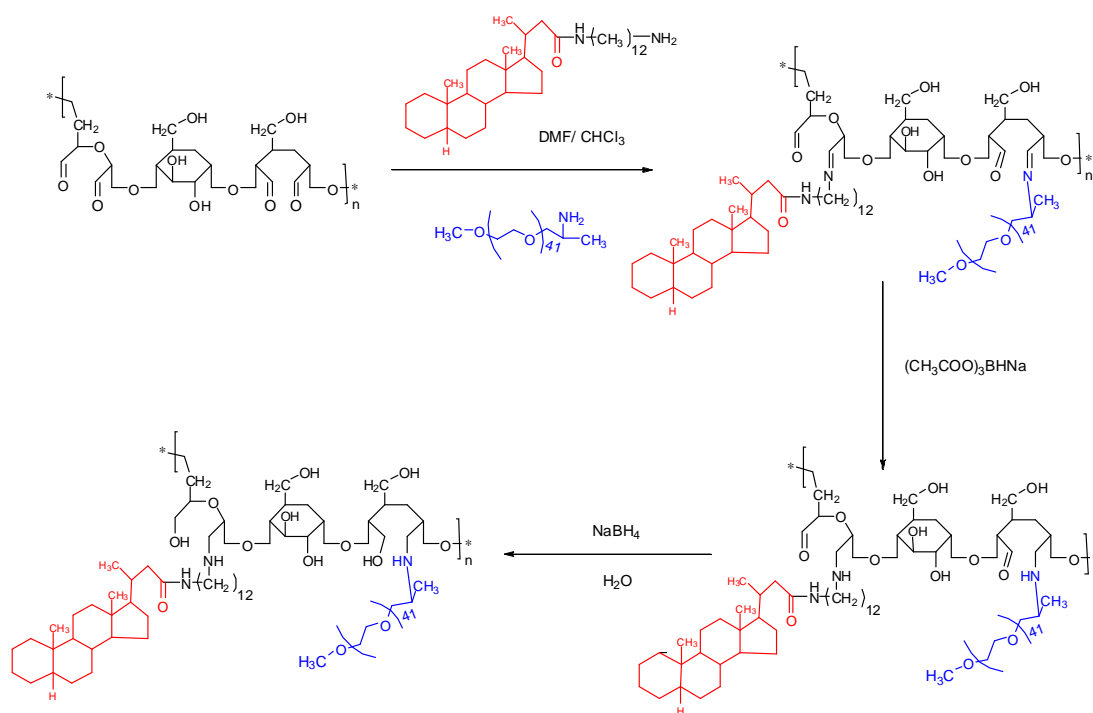


Figura 5.9: Sintesi del polimero anfifilico (colanico)-(PULL₁)-(PEG)

Il passaggio con doppio riducente è risultato necessario a causa delle differenti solubilità dei due reattivi. Il sodio triacetossiboroidruo è solubile in

solventi organici e consente di stabilizzare immediatamente la base di Schiff (Abdel-Magid A., 1996). Il sodio boroidruro è solubile esclusivamente in acqua e in solventi protici come etanolo e metanolo, di conseguenza può essere aggiunto solo dopo evaporazione dei solventi organici e ridissoluzione del residuo in acqua.

La composizione chimica del prodotto finale è stata determinata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$. Lo spettro riportato in Figura 5.10 mostra i segnali caratteristici del metile in posizione 18 dell'acido colanico e del metossile del m-PEG.

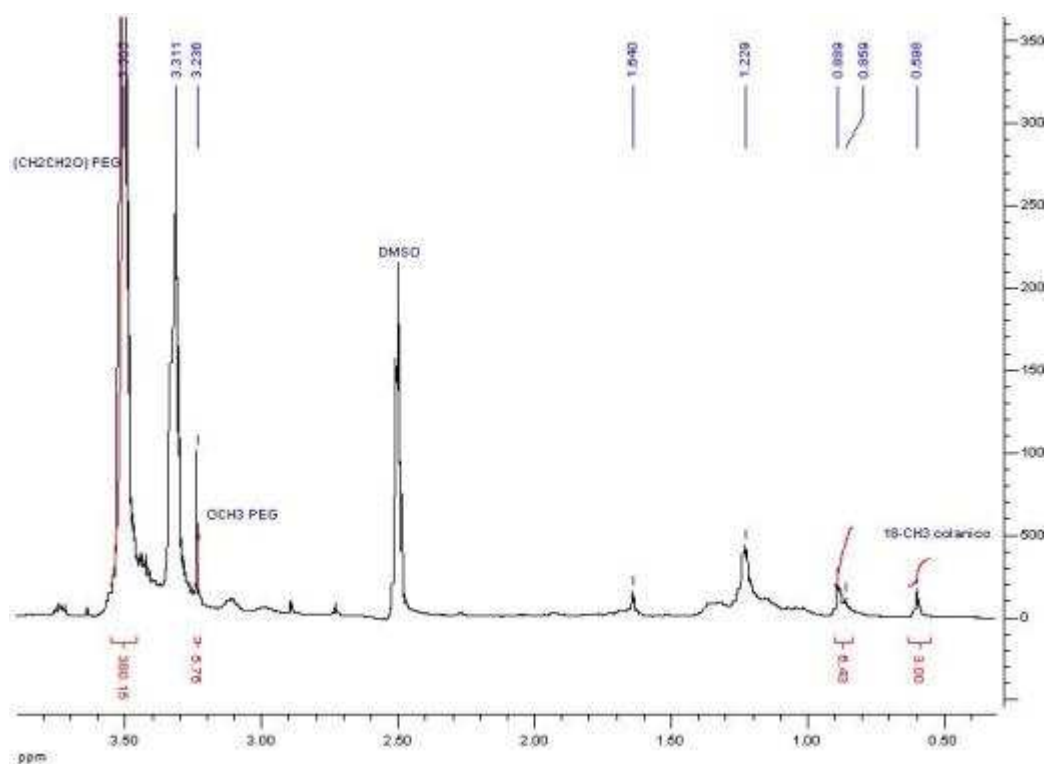


Figura 5.10: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (colanico)-(PULL₁)-(PEG) in $\text{DMSO-}d_6$

Come si osserva in tabella VII imponendo pari a 3H l'integrale del picco a 0.60 ppm, il rapporto fra l'area del segnale a 3.235 ppm e l'area del primo picco permette di risalire al rapporto tra PEG:colanico, che è pari a 1.9/1.

Chemical Shift (ppm)	Molteplicità	Assegnazione	n. protoni
0.60	s	18-CH ₃ colanico	3
3.235	s	OCH ₃ metossilico del PEG	5.75

Tabella VII

Dallo spettro NMR non è possibile eseguire integrazioni affidabili riguardanti i picchi del pullulano, essendo parzialmente sovrapposti ai segnali del PEG e dell'acqua. Per poter quindi ricavare il grado di derivatizzazione del polimero finale è necessario avvalersi di un metodo indiretto. È stata quindi determinata la quantità di PEG non legata mediante saggio del TNBS che consente di valutare i gruppi amminici del PEG che non hanno reagito, che sono risultati il 6% del totale. Per differenza quindi si ottiene che il 94% del PEG aggiunto nella miscela di reazione risulta legato al pullulano. Sulla base di questo risultato e del rapporto molare PEG:aldeidi nella miscela di reazione (0.25:1) si calcola un grado di derivatizzazione del pullulano del 23% circa dei gruppi aldeidici disponibili.

Sulla base del rapporto PEG/colanico calcolato dallo spettro NMR (1.9:1), possiamo calcolare che la quantità di colanico legato è il 49% di quello impiegato nella miscela di reazione. Il pullulano avrà quindi il 23.5% delle aldeidi disponibili PEGhilate e il 12.25% delle aldeidi derivatizzate con colanico-dodecilammina. Il prodotto finale è stato analizzato mediante cromatografia SEC, utilizzando un rivelatore a indice di rifrazione (RI) e basandosi su una retta di taratura costruita con standard di destrani. Il coniugato possiede un volume idrodinamico pari a 230 kDa, e un PM calcolato di 99.5 kDa.

Per la sintesi di (colanico)-(PULL₂)-(PEG) si sono modificate le condizioni di reazione rispetto alla sintesi di (colanico)-(PULL₁)-(PEG). La frazione di DMF è stata sostituita da DMSO. A causa della ridotta solubilità del pullulano ossidato al 22% rispetto al corrispondente derivato col 65% di ossidazione nella miscela di solventi la concentrazione del polimero è stata 5 mg/ml.

Lo spettro ¹H-NMR relativo a questo bioconiugato è riportato in Figura 5.11. Anche in questo caso si osservano i segnali caratteristici del colanico e del m-PEG.

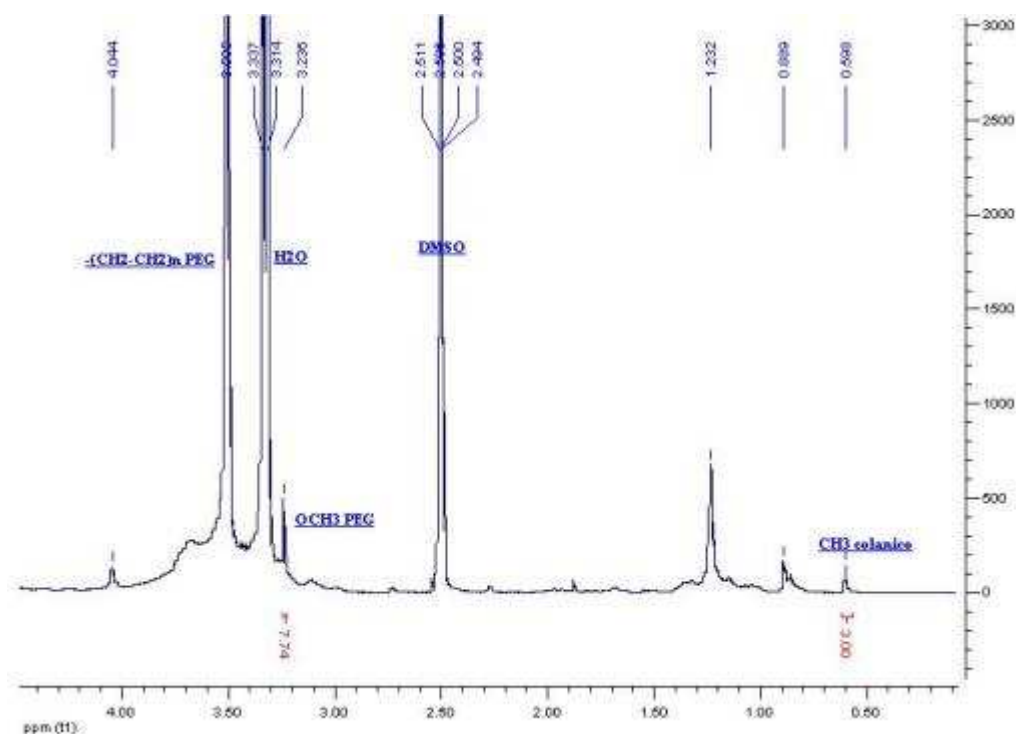


Figura 5.11: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (colanico)-(PULL₂)-(PEG) in $\text{DMSO-}d_6$

Come si osserva in tabella VIII imponendo pari a 3H l'integrale del picco a 0.598 ppm, il rapporto fra l'area del segnale a 3.236 ppm e l'area del primo picco permette di risalire al rapporto tra PEG e colanico, che è pari a ~2.6:1.

Chemical Shift (δ , ppm)	Molteplicità	Assegnazione	n. protoni
0.598	s	18- CH_3 colanico	3
3.236	s	OCH_3 metossilico del PEG	7.74

Tabella VIII

I risultati ottenuti mediante saggio del TNBS (metodica Snyder) indicano una quantità di PEG non legato pari al 3%. Il 97% quindi del PEG aggiunto alla miscela di reazione (rapporto PEG:aldeidi 0.25:1) risulta legato al pullulano, dando quindi una % di modifica con PEG delle aldeidi disponibili del 24.5%.

In base al rapporto PEG:colanico ottenuto dallo spettro NMR (2.6:1), si calcola il grado di derivatizzazione con colanico-dodecilammina, che risulta essere del 9.4%. L'analisi cromatografica ha dimostrato che questo prodotto ha peso

molecolare apparente di 440 kDa, e un PM calcolato di 230 kDa. In tabella IX sono riassunte le composizioni dei due polimeri ottenuti, (colanico)-(PULL₁)-(PEG) e (colanico)-(PULL₂)-(PEG).

	Grado di ossidazione del pullulano (% di aldeidi)	Rapporto PEG/colanico	Aldeidi funzionalizzate con PEG	Aldeidi funzionalizzate con colanico	PM teorico
(colanico)-(PULL₁)-(PEG)	65%	~1.9:1	23.5 %	12.25%	99.5 kDa
(colanico)-(PULL₂)-(PEG)	22%	~2.6:1	24.5 %	9.4%	230 kDa

Tabella IX

La tabella X riporta la composizione in % w/w dei 2 derivati.

SOSTITUENTE	(colanico)-(PULL₁)-(PEG)	(colanico)-(PULL₂)-(PEG)
Monomeri di glucosio	20.1%	40.5%
PEG	70%	53.8%
Colanico	9.9%	5.7%

Tabella X

5.1.4 Sintesi di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)

Lo schema di sintesi del polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) è descritto in Figura 5.12

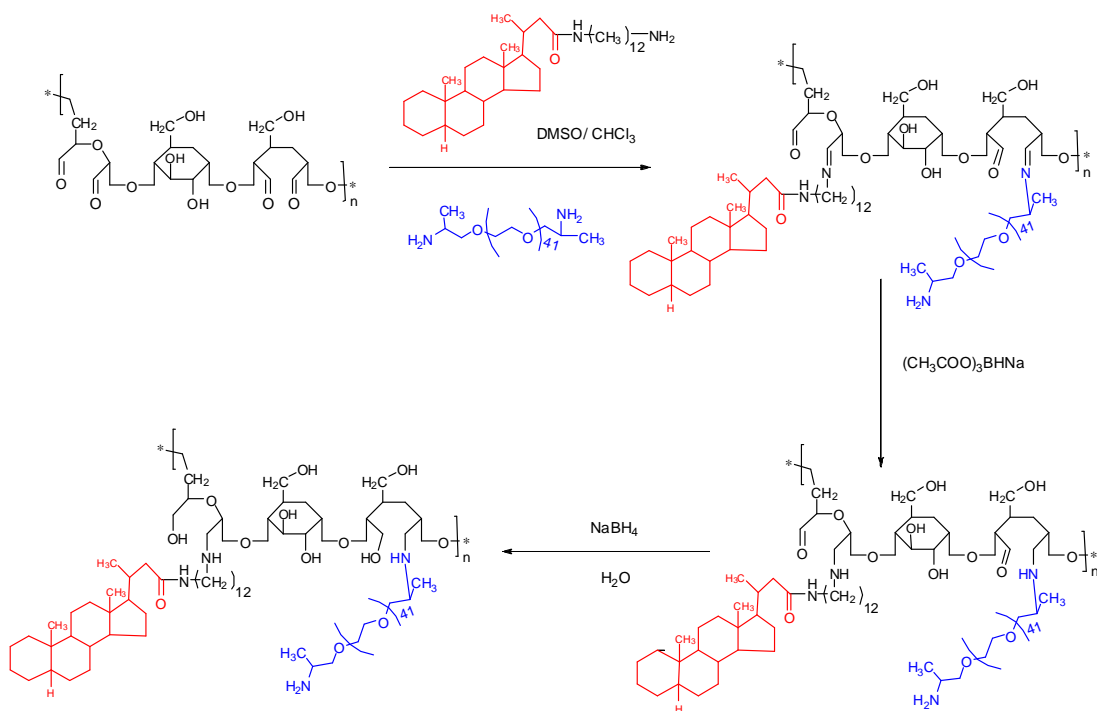


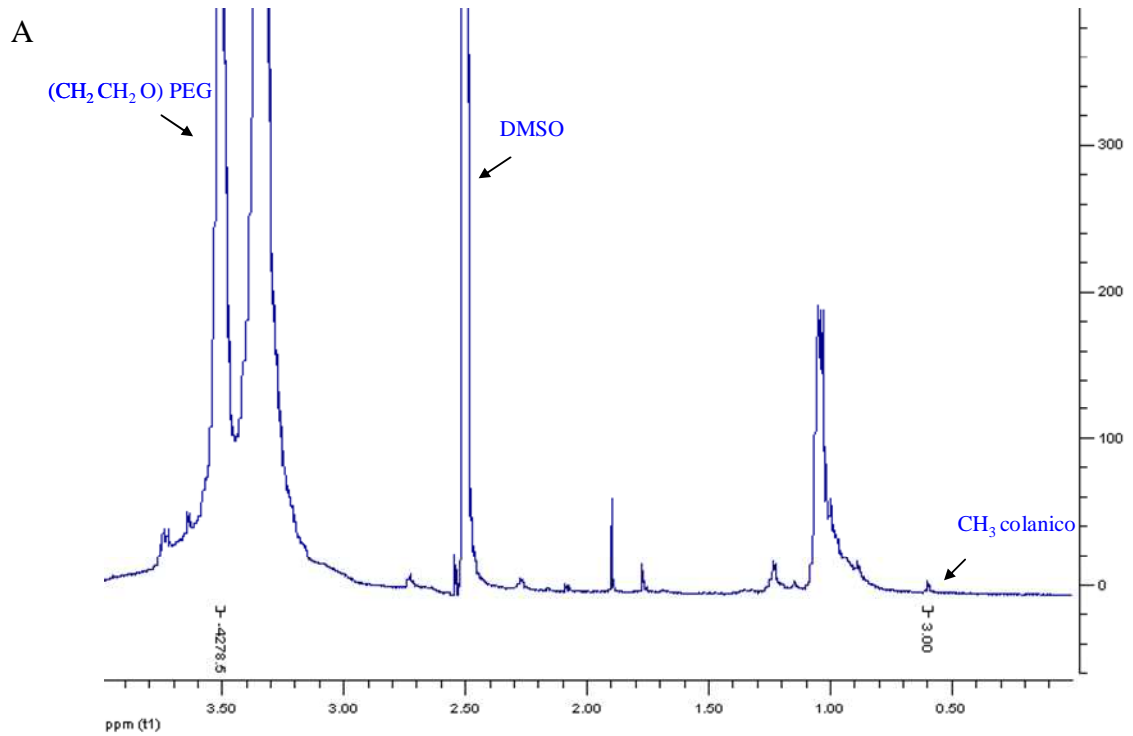
Figura 5.12: Schema di sintesi del polimero anfifilico (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂).

Le fasi di reazione e i rapporti molari tra i reagenti sono stati fissati per introdurre un PEG omobifunzionale, evitando fenomeni di reticolazione tra le diverse catene polimeriche, che porterebbero a derivati insolubili.

Nella prima fase si è fatto reagire il colanico-dodecilammina il cui legame con il polimero è stato stabilizzato con sodiotriacetossiboroidruo. Successivamente si è aggiunto un grande eccesso di PEG-(NH₂)₂ e la coniugazione è stata stabilizzata con NaBH₄ che riduce le basi di Schiff formate tra PEG e pullulano e simultaneamente trasformano i gruppi aldeidici che non hanno reagito ad alcoli.

Sono stati ottenuti polimeri con diversi rapporti molari PEG(NH₂)₂ / colanico-dodecilammina che sono stati caratterizzati mediante spettroscopia ¹H-NMR. Le figure 5.13 riporta gli spettri NMR relativi ai tre diversi prodotti ottenuti rispettivamente con un rapporto molare colanico:aldeidi nella miscela di reazione di

0.25:1 (A), 1:1 (B) e 2:1 (C), e mostrano i segnali relativi al colanico e agli ossietileni delle unità ripetitive del PEG.



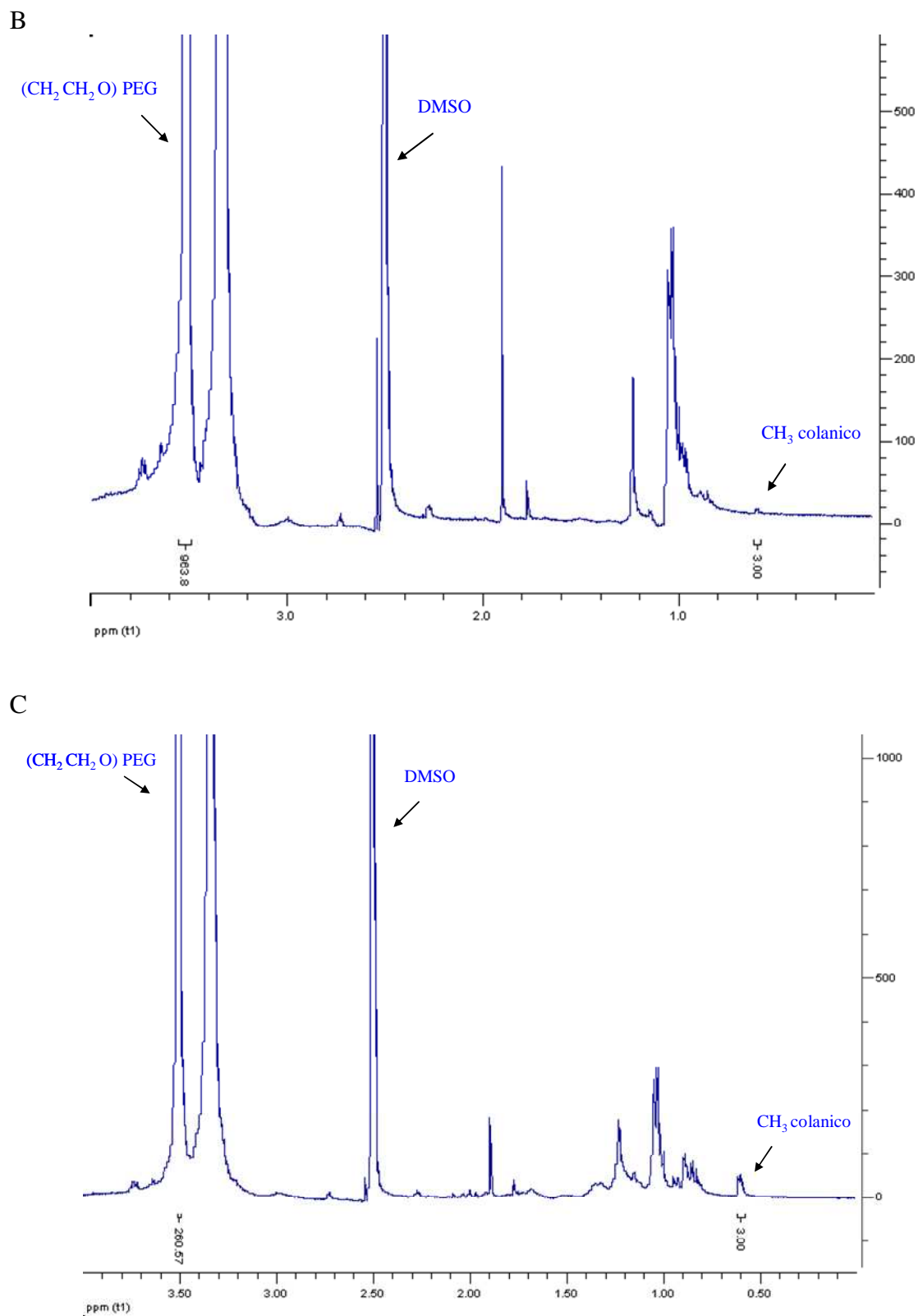


Figura 5.13: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) in DMSO-*d*₆ ottenuto con rapporto colanico/aldeidi 0.25:1 nella miscela di reazione (A), con rapporto colanico/aldeidi 1:1 nella miscela di reazione (B), con rapporto colanico/aldeidi 2:1 nella miscela di reazione (C)

Le tabelle X-XII riportano i valori di chemical shift e le integrazioni per i segnali degli ossietileni del PEG e al metile in posizione 18 del colanico ottenuti rispettivamente con rapporto colanico/aldeidi 0.25:1 (Tabella XI), 1:1 (Tabella XII) e 2:1 (tabella XIII) nella miscela di reazione.

Chemical Shift (ppm)	Molteplicità	Assegnazione	n. protoni
0.60	S	18-CH ₃ colanico	3
3.5	Broad s	(CH ₂ -CH ₂ -O) ₄₁ del PEG	4278.5

Tabella XI

Chemical Shift (ppm)	Molteplicità	Assegnazione	n. protoni
0.60	S	18-CH ₃ colanico	3
3.5	Broad s	(CH ₂ -CH ₂ -O) ₄₁ del PEG	963.8

Tabella XII

Chemical Shift (ppm)	Molteplicità	Assegnazione	n. protoni
0.598	S	18-CH ₃ colanico	3
3.5	Broad s	(CH ₂ -CH ₂ -O) ₄₁ del PEG	260.57

Tabella XIII

Imponendo pari a 3H l'integrale del segnale a 0.60 ppm corrispondente al 18-CH₃ del colanico, il rapporto fra l'area del segnale a 3.5 ppm degli ossietileni del PEG e l'area del primo segnale permette di determinare il rapporto molare tra PEG:colanico, che è pari a ~27:1 (tabella XI), ~6:1 (tabella XII) e ~1.6:1 (tabella XIII).

Mediante il metodo del TNBS che consente di determinare i gruppi amminici, è stato possibile determinare il grado di modifica dei gruppi aldeidici con PEG-NH₂. La % di modifica delle aldeidi è pari al 27.2%, 32.8 % e 43.7 % rispettivamente per i polimeri con rapporto PEG:colanico ~27:1, ~6:1 e ~1.6:1. Sulla base della modifica con PEG e del rapporto PEG:colanico si ottiene la percentuale di derivatizzazione con colanico, che risulta rispettivamente del 1%, 5.5% e 26.8%.

La composizione percentuale dei tre composti sintetizzati è riassunta in Tabella XIV.

Rapporti molari in miscela di reazione	Rapporto PEG/Colanico nei prodotti	Aldeidi funzionalizzati con PEG	Aldeidi funzionalizzati con colanico	PM teorico
colanico/aldeidi 0.25:1	~27/1	27.2%	1.0%	224 kDa
colanico/aldeidi 1:1	~6/1	32.8%	5.5%	258 kDa
colanico/aldeidi 2:1	~1.6/1	43.7%	26.8%	339 kDa

Tabella XIV

La tabella XV riporta la composizione quantitativa in % w/w dei 3 derivati.

SOSTITUENTE	(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) rapporto PEG/colanico ~ 27/1	(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) rapporto PEG/colanico ~ 6/1	(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) Rapporto PEG/colanico ~ 1.6/1
Monomeri di glucosio	41.3%	36%	27.4%
PEG	58.1%	61%	61.8%
Colanico	0.6%	3%	10.8%

Tabella XV

5.1.5 Determinazione della Concentrazione Micellare Critica (CMC) dei derivati

I valori di Concentrazione Micellare Critica dei polimeri sintetizzati sono stati ottenuti dall'intersezione delle rette di regressione dei valori di fluorescenza del pirene solubilizzato in micella diagrammati contro i valori di concentrazione polimerica in scala logaritmica.

Nelle Figure 5.14-5.18 vengono riportati i grafici usati per la determinazione di CMC per (colanico)-(PULL₁)-(PEG) e (colanico)-(PULL₂)-(PEG); per (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale di PEG₁₉₀₀/colanico ~ 27/1, (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale di PEG₁₉₀₀/colanico ~ 6/1, (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale di PEG₁₉₀₀/colanico ~ 1.6/1.

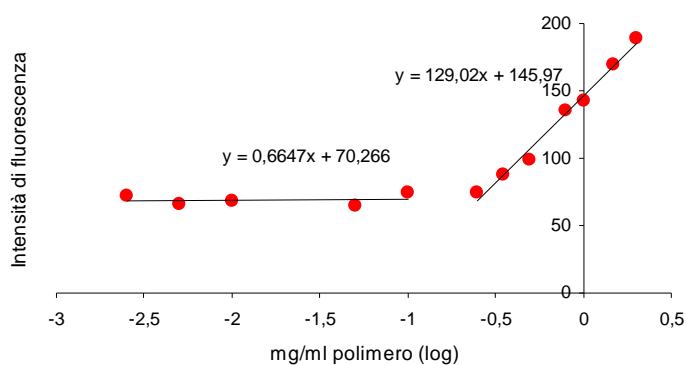


Figura 5.14: CMC di (colanico)-(PULL₁)-(PEG)

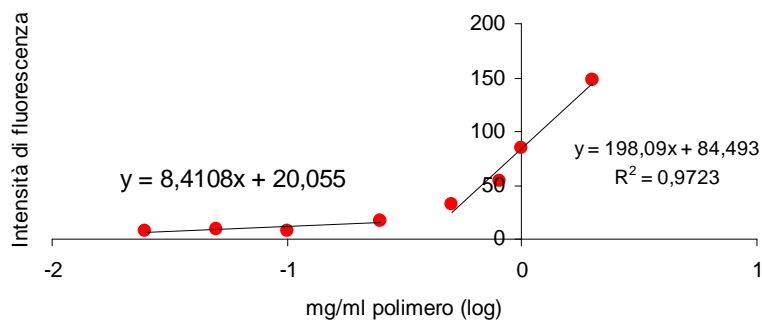


Figura 5.15: CMC di (colanico)-(PULL₂)-(PEG)

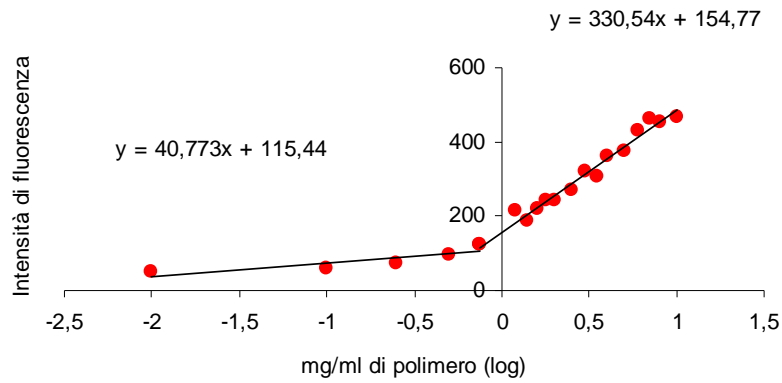


Figura 5.16: CMC di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale PEG₁₉₀₀/colanico ~ 27/1.

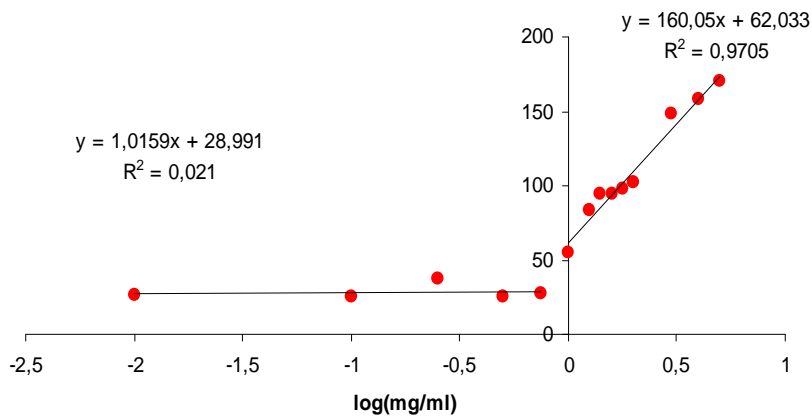


Figura 5.17: CMC di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale PEG₁₉₀₀/colanico ~ 6/1.

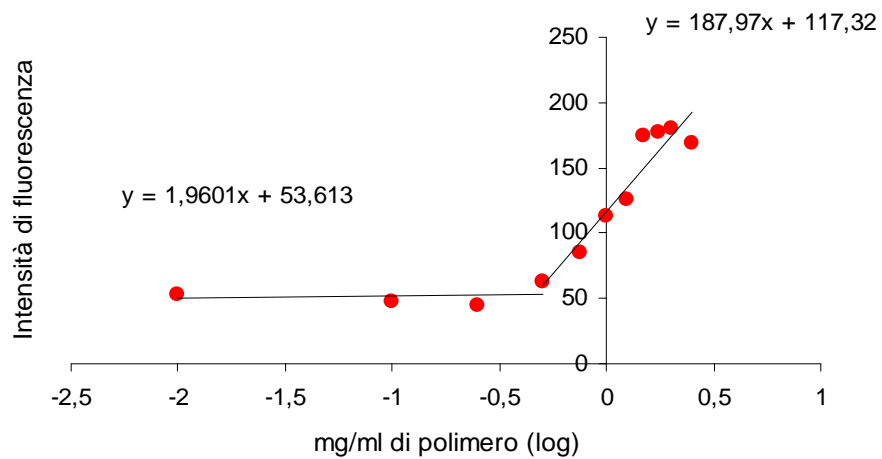


Figura 5.18 : CMC di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale PEG₁₉₀₀/colanico ~ 1.6/1.

I valori di concentrazione micellare critica dei bioconiugati di PULL₁ e PULL₂ sono riportati in Tabella XVI e risultano dalla media di tre misurazioni.

Polimero	CMC (µg/ml)	CMC (µM)
(colanico)-(PULL ₁)-(PEG)	279 ± 2.5	2.8
(colanico)-(PULL ₂)-(PEG)	470 ± 3.4	2.0

Tabella XVI

I dati di CMC riportati nella tabella mostrano che il polimero a minor grado di ossidazione (colanico)-(PULL₂)-(PEG) ha una maggior tendenza rispetto al derivato ad alto grado di ossidazione a formare strutture micellari, come indica il valore di CMC µM, pur presentando valori maggiori di CMC in µg/ml. Questo è dovuto al diverso PM dei due coniugati, 99.5 kDa nel caso del derivato (colanico)-(PULL₁)-(PEG), 230 kDa per (colanico)-(PULL₂)-(PEG).

I valori di CMC dei bioconiugati ottenuti con PEG-(NH₂)₂ che presentano quindi gruppi amminici liberi sono riassunti in tabella XVII.

Polimero	CMC (µg/ml)	CMC (µM)
(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) 27/1	731.6 ± 7.3	3.3
(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) 6/1	720.1 ± 8.2	2.7
(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) 1.6/1	454.4 ± 7.0	1.3

Tabella XVII

In questo caso si osserva una correlazione tra il rapporto PEG/colanico e il valore di CMC sia in termini ponderali che molari. Il valore di CMC diminuisce al diminuire del rapporto PEG/colanico indicando che bioconiugati con un minor dominio di PEG idrofilico rispetto al dominio idrofobico (colanico) tendono a formare micelle più facilmente.

5.1.6 Determinazione delle dimensioni micellari

La dimensione delle micelle è stata determinata mediante light-scattering dinamico (DLS). I valori sono stati elaborati mediante analisi NICOMP con $3 < \chi^2 < 30$, *fit error* < 10, *baseline adjustment* < 0.3 e *residuals* < 30.0.

La Tabella XVIII riassume i valori delle dimensioni micellari dei bioconiugati di PULL₁ e PULL₂ sintetizzati (media di tre misurazioni).

Polimero	Dimensione in volume (nm)
(colanico)-(PULL ₁)-(PEG)	26.6 ± 5.6
(colanico)-(PULL ₂)-(PEG)	24.7 ± 3.9

Tabella XVIII

Il diametro medio delle particelle formate dai bioconiugati di PEG-(NH₂)₂ che presentano quindi gruppi amminici liberi sono riassunti in tabella XIX.

Polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)	Dimensione in volume (nm)
Rapporto PEG/colanico 27/1	441 ± 70.2
Rapporto PEG/colanico 6/1	370 ± 81.7
Rapporto PEG/colanico 1.6/1	313 ± 67.1

Tabella XIX

Anche in questo caso, come per i valori di CMC, si osserva una correlazione tra il rapporto PEG/colanico e le dimensioni delle micelle. Il diametro medio delle particelle diminuisce al diminuire del rapporto PEG/colanico indicando che bioconiugati con un minor dominio di PEG idrofilico rispetto al dominio idrofobico (colanico) tendono a formare micelle più compatte.

5.1.7 Studio di solubilizzazione di paclitaxel

La capacità solubilizzante dei derivati (colanico)-(PULL)-(PEG) e (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) nei confronti di farmaci insolubili è stata valutata utilizzando il paclitaxel come farmaco modello. Per tale studio si sono preparate micelle con il metodo per co-solubilizzazione utilizzando un solvente in grado di portare in soluzione sia il polimero che il principio attivo. Nei grafici in Figura 5.19 e 5.20 vengono riportati i profili di solubilizzazione in funzione della concentrazione di polimero espressa in mg/ml.

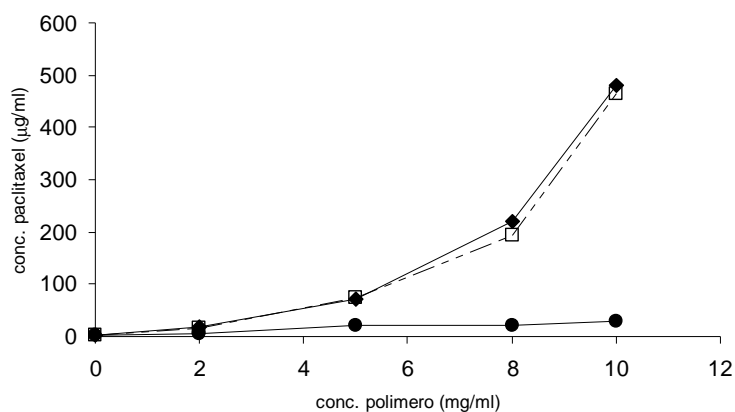


Figura 5.19: Profilo di solubilizzazione di paclitaxel con (colanico)-(PULL₁)-(PEG) Tempo 0 ore (◆); tempo 3 ore (□); tempo 18 ore (●).

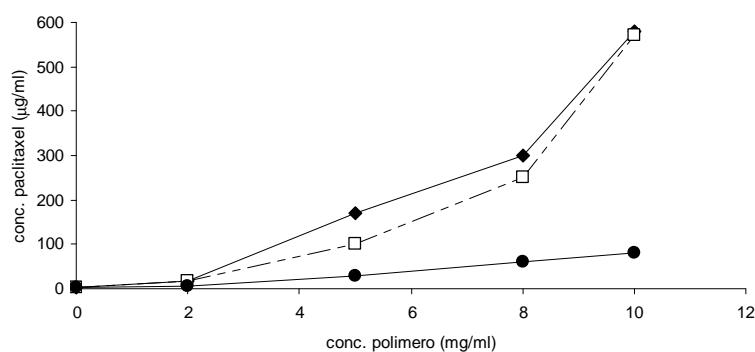


Figura 5.20: Profilo di solubilizzazione di paclitaxel con polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG) Tempo 0 ore (◆); tempo 3 ore (□); tempo 18 ore (●).

I profili di dissoluzione riportati nei grafici mostrano che per entrambi i polimeri la solubilità di paclitaxel aumenta all'aumentare della concentrazione di bioconjugati macromolecolari e tale effetto è simile per entrambi i derivati. Inoltre si osserva che il sistema è stabile almeno fino a 3 ore di incubazione, mentre dopo 18 ore il paclitaxel tende a precipitare.

Nelle Figure 5.21-5.23 vengono riportati i profili di dissoluzione di paclitaxel in presenza dei 3 coniugati di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂).

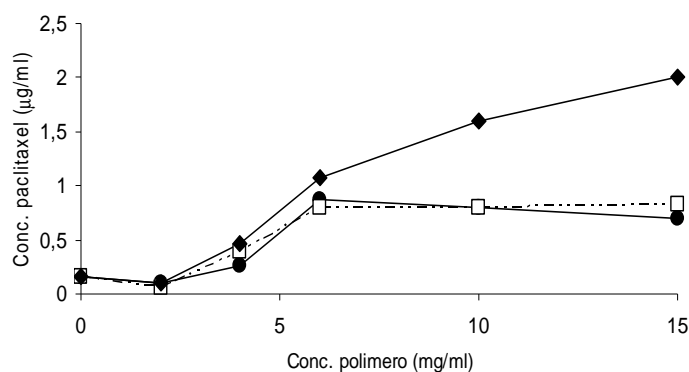


Figura 5.21: Profilo di solubilizzazione di paclitaxel con (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale PEG₁₉₀₀/colanico ~ 27/1. Tempo 0 ore (◆); tempo 3 ore (□); tempo 18 ore (●).

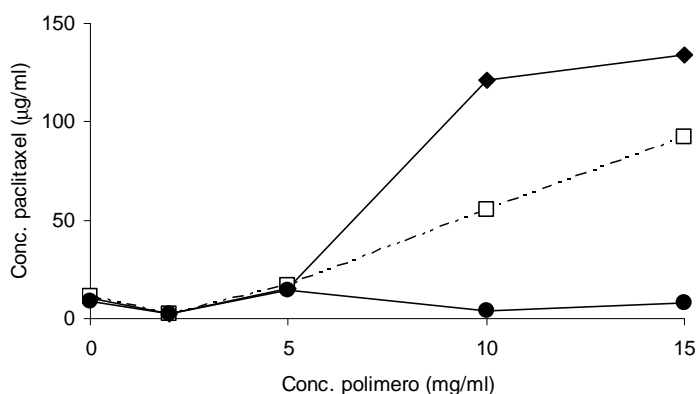


Figura 5.22: Profilo di solubilizzazione di paclitaxel con polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale PEG₁₉₀₀/colanico ~ 6/1. Tempo 0 ore (◆); tempo 3 ore (□); tempo 18 ore (●).

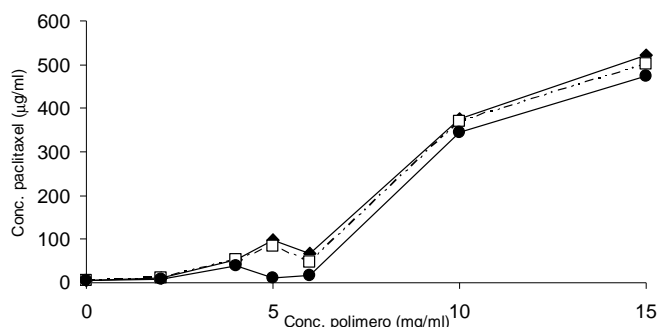


Figura 5.23: Profilo di solubilizzazione di paclitaxel con polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale PEG₁₉₀₀/colanico ~ 1.6/1. Tempo 0 ore (◆); tempo 3 ore (□); tempo 18 ore (●).

Dai profili di dissoluzione si assume che la solubilità del paclitaxel aumenta in modo all'aumentare della concentrazione di polimero. I tre polimeri considerati hanno però una capacità solubilizzante molto diversa in base al rapporto molare PEG/colanico coniugato al polimero.

Il polimero con un elevato rapporto PEG/colanico (27:1) ha una capacità solubilizzante praticamente trascurabile mentre la solubilità di paclitaxel aumenta significativamente al diminuire del rapporto PEG/colanico raggiungendo valori di 140 mg/ml e 500 mg/ml con soluzioni di 15 mg/ml di bioconiugato contenente rispettivamente 6:1 e 1.6:1 PEG/colanico.

I grafici descrivono anche la stabilità fisica nel tempo della soluzione del farmaco nella soluzione micellare. La stabilità del sistema valutata a 0, 3 e 18 ore mostra che i bioconiugati (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto finale PEG/colanico = 27/1 e 6/1 portano alla formazione di sistemi relativamente instabili, mentre il bioconiugato con rapporto PEG/colanico 1.6:1 forma un sistema altamente stabile in cui la solubilità del paclitaxel viene mantenuta ai livelli massimali per 18 ore.

5.2 Studio di veicolazione di [(ESDT)AuBr₂]

5.2.1 Stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in diversi solventi

Studi preliminari sono stati condotti per valutare la stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in DMSO e in tamponi. I profili di stabilità descritti in Figura 5.24 mostrano che il farmaco è stabile a pH acido e in DMSO mentre degrada rapidamente a pH neutro e basico.

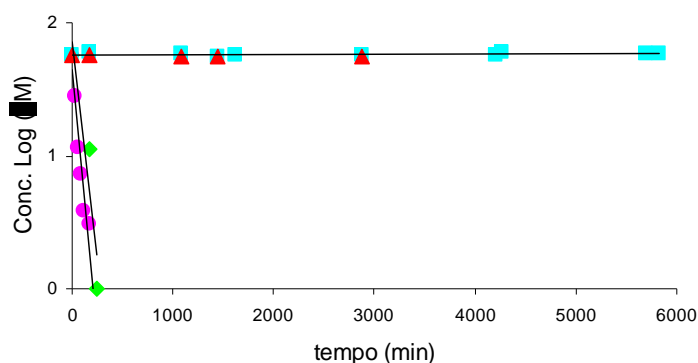


Figura 5.24: Stabilità di [(ESDT)AuBr₂]: in DMSO (▲), in tampone acetato 50 mM pH 4.5 (■), in tampone borato 50 mM pH 8.5 (◆), in tampone fosfato 50 mM pH 7.2 (●).

In Tabella XX sono riassunte le cinetiche di degradazione calcolate sulla base dei profili riportati in Figura 5.24.

Costanti cinetiche di degradazione di [(ESDT)AuBr₂]	
Solvente	K_{obs} x 10⁻⁴ (min⁻¹)
DMSO	0.001
tampone acetato 50 mM pH 4.5	0.0003
tampone borato 50 mM pH 8.5	6.4
tampone fosfato 50 mM pH 7.2	9.1

Tabella XX

5.2.2 Solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] con (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)

La solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] con (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) è stata determinata in tampone acetato di sodio 50 mM pH 4.5 impiegando due metodiche diverse di preparazione del sistema colloidale: “co-solubilizzazione” (A) e per contatto diretto (B). Nei Figure 5.25 e 5.26 vengono riportati i profili di solubilizzazione in funzione della concentrazione di polimero espressa in mg/ml ottenuti con i due diversi metodi.

Dai grafici seguenti risulta un profilo di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] differente per i tre polimeri e dipendente dal metodo utilizzato.

In Figura 5.25 è riportato il profilo di solubilizzazione col metodo per “co-solubilizzazione” in cui si osserva come il polimero con rapporto PEG/colanico maggiore (27:1) consente una maggiore solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] mentre il polimero con minor rapporto PEG/colanico (1.6:1) non ha capacità solubilizzanti nei confronti di questo farmaco..

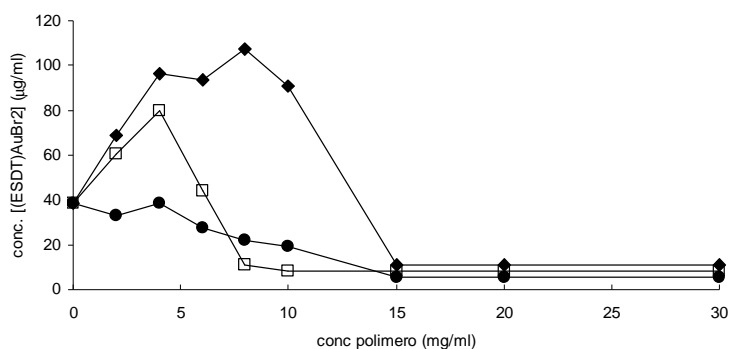


Figura 5.25: Profilo di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] con polimero in rapporto PEG/colanico = 27/1 (◆), 6/1(□); 1.6/1 (●) in tampone acetato 50 mM pH 4.5.

Inoltre le dissoluzioni ottenute con i campioni contenenti 27:1 e 6:1 PEG/colanico aumentano all’aumentare della concentrazione del carrier fino ad un valore massimo di 3 mg/ml nel caso del polimero con rapporto PEG/colanico 6:1 o di 8 mg/ml col polimero con rapporto PEG/colanico 27:1. A concentrazioni di carrier maggiori la concentrazione di [(ESDT)AuBr₂] diminuisce per tornare a valori basali a concentrazioni di bioconiugato superiori

In Figura 5.26 è riportato mostra il profilo di solubilizzazione ottenuto con il metodo per contatto di [(ESDT)AuBr₂].

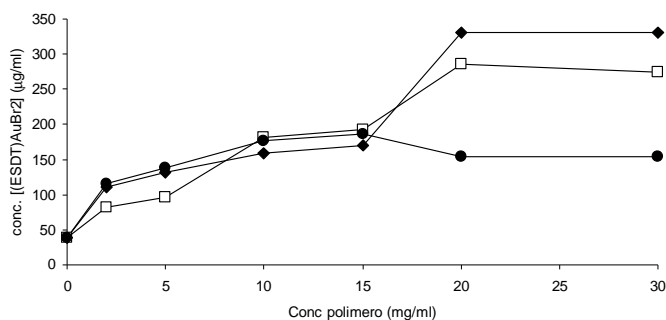


Figura 5.26: Profilo di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] con polimero in rapporto PEG/colanico = 27/1 (◆), 6/1(□); 1.6/1 (●) in tampone acetato 50 mM pH 4.5.

Si può notare come i bioconiugati con diverso rapporto PEG/colanico siano in grado di solubilizzare una quota di farmaco superiore rispetto al metodo precedente. In ogni caso la quantità di farmaco solubilizzata aumenta all'aumentare della concentrazione di bioconiugato. Inoltre permettono un aumento della solubilità del farmaco di circa 5 volte. Come osservato con il metodo per “co-solubilizzazione”, il polimero avente rapporto molare di PEG minore, ha capacità solubilizzante di [(ESDT)AuBr₂] inferiori rispetto agli altri due.

5.2.3 Solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] in presenza di ciclodestrine

Si è valutata la solubilità di [(ESDT)AuBr₂] in presenza di β-ciclodestrina, Me-β-ciclodestrina e HP-β-ciclodestrina. Anche in questo caso soluzioni farmaco/CD sono state ottenute per “co-solubilizzazione” (A) e per contatto diretto (B). Nei grafici 3.27 e 3.28 vengono riportati i profili di solubilità in funzione della concentrazione di ciclodestrine ottenuti con i due diversi metodi.

Dai grafici seguenti risulta un profilo di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] differente per le tre ciclodestrine considerate in base al metodo utilizzato.

I profili di dissoluzione riportati in Figura 5.27 mostrano che il metodo di “co-solubilizzazione” permette una maggiore solubilizzazione del farmaco rispetto al metodo per contatto riportato in Figura 5.28.

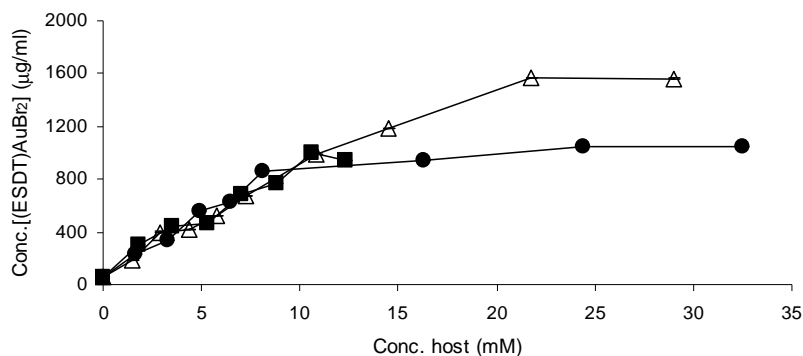


Figura 5.27: Profilo di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] in tampone acetato di sodio 50 mM pH 4.5 in presenza di β-ciclodestrine (■), Me-β-ciclodestrine (Δ), HP-β-ciclodestrine (●).

Con il metodo di co-solubilizzazione la solubilità di [(ESDT)AuBr₂] aumenta all'aumentare della concentrazione di CD in modo sovrapponibile per i tre derivati oligosaccaridici fino ad una concentrazione di CD di 10 mM in cui [(ESDT)AuBr₂] raggiunge una solubilità di circa 1 mg/ml. A concentrazioni di CD maggiori la solubilità di farmaco rimane costante nel caso di HP-β-CD mentre aumenta fino ad un valore di circa 1.5 mg/ml a 20 mg/ml di Me-β-CD.

I profili di solubilizzazione ottenuti col metodo per contatto diretto di [(ESDT)AuBr₂] riportati in Figura 5.28 mostrano che con questo metodo di preparazione le CD hanno una minore capacità di dissoluzione di farmaco rispetto al precedente metodo di co-solubilizzazione.

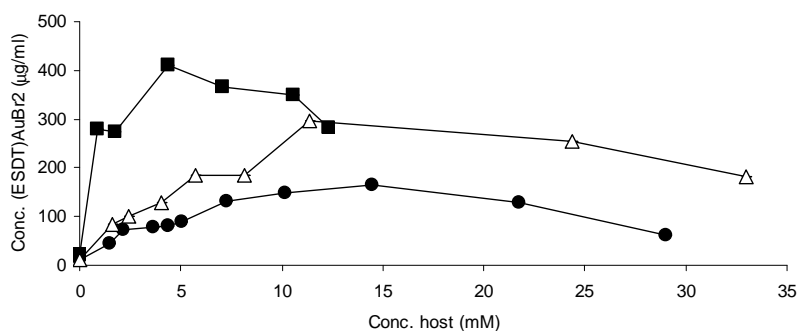


Figura 5.28: Profilo di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂] in tampone acetato di sodio 50 mM pH 4.5 in presenza di β-ciclodestrine (■), Me-β-ciclodestrine (Δ), HP-β-ciclodestrine (●).

Le β -CD sono in questo caso gli oligosaccaridi con maggiori capacità solubilizzanti. La solubilità di farmaco raggiunge un valore massimo di circa 0.4 mg/ml ad una concentrazione di β -CD di 5 mM. All'aumentare della concentrazione di β -CD la solubilità del farmaco diminuisce. Nel caso di Me- β -CD e HP- β -CD la solubilità massima di [(ESDT)AuBr₂] è di circa 0.25 o 0.125 mg/ml rispettivamente ottenute con una concentrazione di oligosaccaridi di 10-15 mM. All'aumentare della concentrazione di CD la solubilità di farmaco diminuisce progressivamente.

Dai profili di dissoluzione si è calcolata la costante apparente di affinità del complesso di inclusione di [(ESDT)AuBr₂], secondo la formula di Higuchi and Connors (Higuchi T., Connors K.A., 1965).

$$K_c = \frac{\text{Slope}}{S_0 (1 - \text{Slope})}$$

Dove S_0 indica la concentrazione a saturazione di CD/[(ESDT)AuBr₂] in tampone senza ciclodestrine e "slope" è la pendenza della retta di solubilizzazione fino al punto di massima dissoluzione ottenuto in presenza di ciclodestrine.

La Tabella XXI riporta le costanti di stabilità dei complessi ottenuti con i due metodi (A) e (B).

Costanti di stabilità del complesso CD/[(ESDT)AuBr₂]		
	K_c(M⁻¹) per "co-solubilizzazione" (A)	K_c(M⁻¹) per contatto diretto col farmaco solido (B)
β -ciclodestrine	1713	1432
HP- β -ciclodestrine	1644	186
Me- β -ciclodestrine	2044	380

Tabella XXI

Si nota come, quando si esegue lo studio di dissoluzione con il metodo per "co-solubilizzazione", le costanti siano essenzialmente simili per le tre ciclodestrine considerate, mentre con il metodo per contatto diretto (B), la costante di inclusione di [(ESDT)AuBr₂] in β -ciclodestrine è confrontabile a quella ottenuta operando col

metodo (A), mentre per le altre due ciclodestrine si ottengono valori sensibilmente inferiori.

5.2.4 Studio di stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in presenza dei derivati di pullulano o ciclodestrine

E' stata valutata la capacità dei derivati (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) di aumentare la stabilità del farmaco antitumorale [(ESDT)AuBr₂] in soluzione acquosa. I profili di stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in tampone fosfato 50 mM pH 7.2 in presenza e assenza dei bioconiugati di pullulano con diverso rapporto di PEG/colanico sono riportati in Figura 5.29. Le soluzioni sono state ottenute attraverso tecnica di "co-solubilizzazione" che permette di ridurre il tempo di contatto di [(ESDT)AuBr₂] col tampone prima dell'analisi.

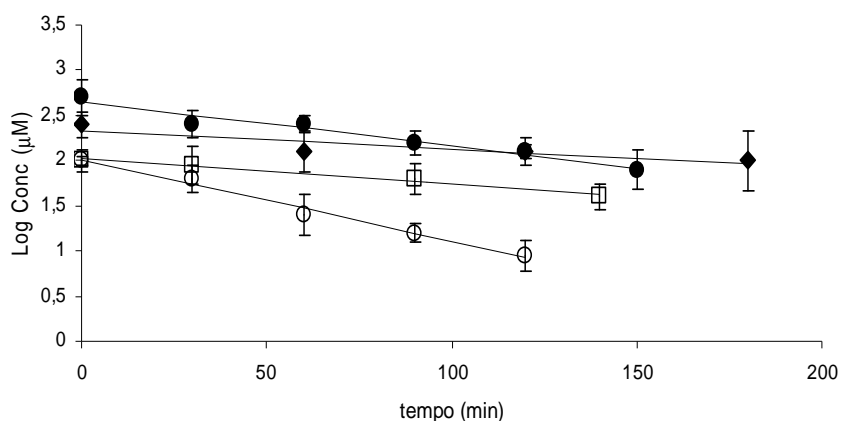


Figura 5.29: Stabilità di [(ESDT)AuBr₂] : in tampone fosfato 50 mM pH 7.2 (○), nello stesso tampone ed in presenza di pullulano-PEG-colanico con rapporti di: PEG/colanico = 27/1 (◆); 6/1 (□); 1.63/1 (●).

Dalle rette di regressione logaritmica è possibile calcolare le costanti cinetiche di degradazione riportate nella Tabella XXII da cui si assume che i tre polimeri studiati riducono la degradazione di [(ESDT)AuBr₂]. La stabilità del farmaco è maggiore nel caso del coniugato con un rapporto PEG/colanico maggiore (27:1) mentre diminuisce al diminuire di tale rapporto.

Costanti cinetiche di degradazione di [(ESDT)AuBr ₂]	
	$K_{obs} \times 10^{-4} (\text{min}^{-1})$
Tampone fosfato 50 mM pH 7.2	9.1
PEG/colanico ~ 27/1 in tampone fosfato 50 mM pH 7.2	2
PEG/colanico ~ 6/1 in tampone fosfato 50 mM pH 7.2	3
PEG/colanico ~ 1.6/1 in tampone fosfato 50 mM pH 7.2	5.3

Tabella XXII

In Figura 5.30 è riportato il profilo di stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in tampone fosfato 50 mM pH 7.2, ed in presenza di β -ciclodestrine o HP- β -ciclodestrine o Me- β -ciclodestrine. Anche in questo caso le soluzioni sono state ottenute per “co-solubilizzazione” che permette di ridurre il tempo di contatto di [(ESDT)AuBr₂] col tampone neutro prima dell’analisi cromatografica.

Come si può osservare le CD hanno diverse capacità stabilizzanti nei confronti del farmaco.

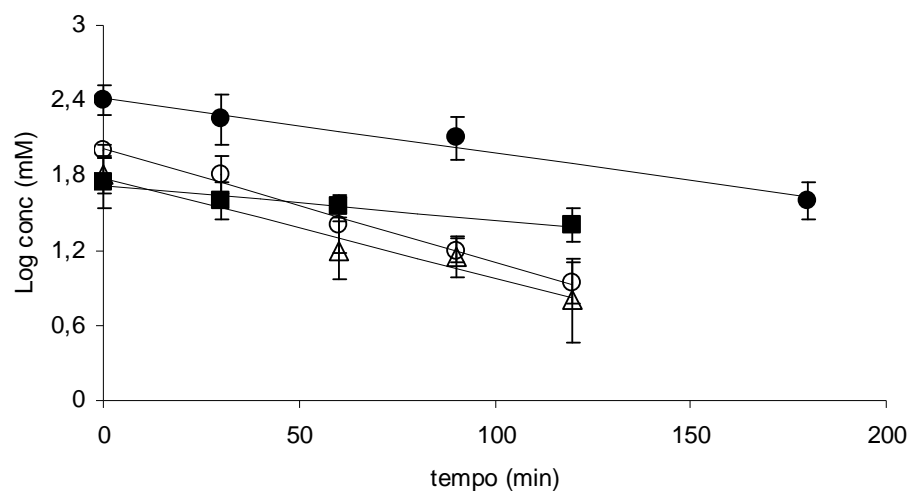


Figura 5.30: Stabilità di [(ESDT)AuBr₂] in tampone fosfato 50 mM pH 7.2 (○) ed in presenza di β -ciclodestrine (■), Me- β -ciclodestrine (△), HP- β -ciclodestrine (●).

Dalla pendenza delle rette si sono calcolate le costanti cinetiche di degradazione riportate in Tabella XXIII. Si nota come le β -ciclodestrine abbiano maggiore capacità di rallentare la degradazione di [(ESDT)AuBr₂] in buon accordo

con la maggiore stabilità del complesso determinata per dissoluzione. Al confronto le Me- β -ciclodestrine hanno un limitato effetto stabilizzante.

Costanti cinetiche di degradazione di [(ESDT)AuBr₂] in tampone fosfato 50 mM pH 7.2	
	K_{obs} x 10⁻⁴ (min⁻¹)
[(ESDT)AuBr ₂]	9.1
[(ESDT)AuBr ₂] / β -ciclodestrine	2.8
[(ESDT)AuBr ₂] / HP- β -ciclodestrine	4
[(ESDT)AuBr ₂] / Me- β -ciclodestrine	8

Tabella XXIII: Costanti cinetiche di degradazione di [(ESDT)AuBr₂].

5.2.5 Studio di citotossicità in vitro mediante MTT test

Studi di citotossicità sono stati condotti su diverse linee cellulari umane (carcinoma della cervice uterina HeLa, carcinoma nasofaringeo KB e carcinoma della mammella MCF-7) mediante test dell'MTT. Studi preliminari hanno dimostrato che i bioconiugati del pullulano come tali non sono tossici. Si sono quindi condotti studi di citotossicità di [(ESDT)AuBr₂] impiegando (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) con rapporto PEG/colanico 1.6/1, e HP- β -CD sulla linee cellulari HeLa (Ronconi L., 2005), KB ed MCF7 incubando le cellule con il farmaco per 24 ore. Le figure 5.31-3.33 mostrano i profili di tossicità del complesso dell'oro da solo e caricato nel bi coniugato di pullulano o nelle HP- β -CD nelle linee diverse linee cellulari .

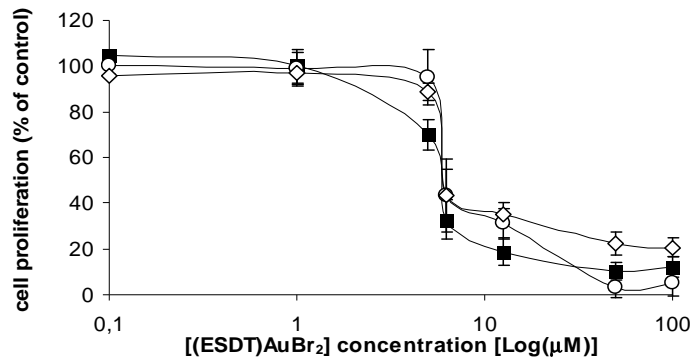


Figura 5.31: Citotossicità di [(ESDT)AuBr₂] (■),(colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) -[(ESDT)AuBr₂] (○), HPβCD-[(ESDT)AuBr₂] (◇), su linea cellulare HeLa mediante test MTT.

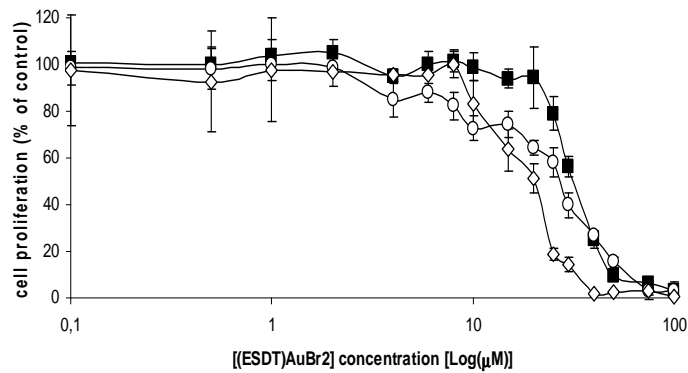


Figura 5.32: Citotossicità di [(ESDT)AuBr₂] (■),(colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) -[(ESDT)AuBr₂] (○), HPβCD-[(ESDT)AuBr₂] (◇), su linea cellulare KB mediante test MTT.

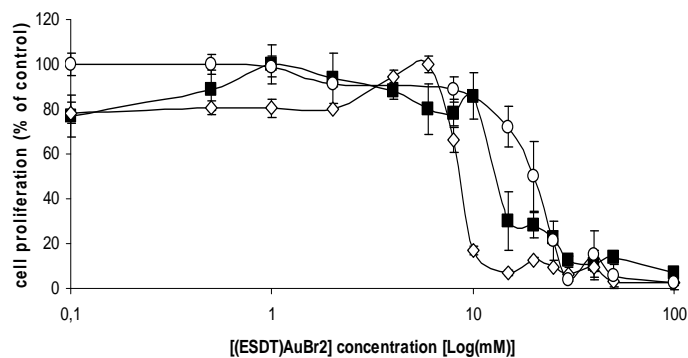


Figura 5.33: Citotossicità di [(ESDT)AuBr₂] (■),(colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) -[(ESDT)AuBr₂] (○), HPβCD-[(ESDT)AuBr₂] (◇), su linea cellulare MCF7 mediante test MTT.

La Tabella XXIV riporta i valori di IC₅₀ ottenuti dalle curve di tossicità.

linea cellulare	[(ESDT)AuBr ₂]	(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) - [(ESDT)AuBr ₂]	HPβCD- [(ESDT)AuBr ₂]
HeLa	~7 μM	~7 μM	~7 μM
KB	~30 μM	~25 μM	~20 μM
MCF7	~12.5 μM	~20 μM	~9 μM

Tabella XXIV: valori di IC₅₀ di [(ESDT)AuBr₂] , micelle-[(ESDT)AuBr₂] e HPβCD-[(ESDT)AuBr₂] sulle linee cellulari testate

Come si può notare dai valori di IC₅₀ e dai profili di tossicità sia l'utilizzo del polimero (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂) sia le HP-β-CD mantengono la citotossicità del farmaco su tutte le linee cellulari valutate, indicando che i sistemi supramolecolari sono in grado di rilasciare il farmaco nella sua forma attiva.

3.2.6 Studio di farmacocinetica

In figura 5.34 sono riportati i profili farmacocinetici di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)-[(ESDT)AuBr₂] (A) e HPβCD-[(ESDT)AuBr₂] (B).

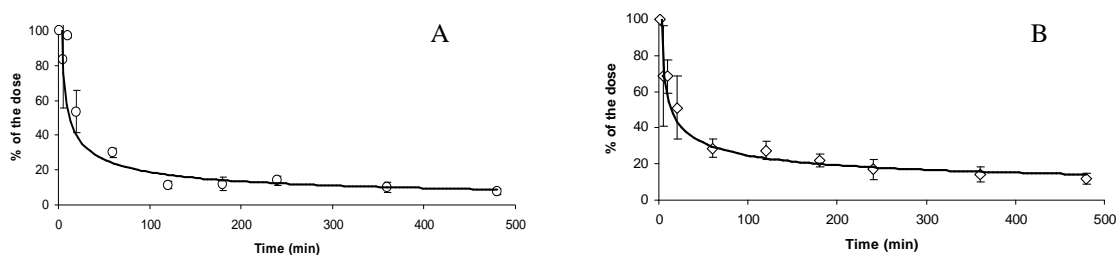


Figura 5.34: Profilo farmacocinetico di (colanico)-(PULL₂)-(PEG-NH₂)-[(ESDT)AuBr₂] (A) e HPβCD-[(ESDT)AuBr₂] (B).

La tabella XXV riporta i principali parametri farmacocinetici calcolati a partire dai dati sperimentali.

	(colanico)-(PULL ₂)-(PEG-NH ₂) -[(ESDT)AuBr ₂]	HPβCD-[(ESDT)AuBr ₂]
V _c (ml)	1.48	2.074
AUC (μg ml ⁻¹ h)	148.4	178.9
t _{1/2α} (h)	0.22	0.12
t _{1/2β} (h)	16.82	14.28
V _{ss} (ml)	8.81	6.77
Cl (ml/h)	0.00673	0.005597
Ke	0.006	0.00269
K ₁₂	0.416	0.06319
K ₂₁	0.00599	0.02791

Tabella XXV

Entrambi i sistemi hanno un andamento bifasico, con una prima fase che prevede una rapida distribuzione ai tessuti (t_{1/2α}), seguita da una fase più lenta (t_{1/2β}), che garantisce una prolungata permanenza in circolo. Tali valori sono in linea coi ridotti valori di *clearance* (Cl) e della costante di eliminazione (Ke).

Il complesso con le ciclodestrine e il sistema di micelle hanno capacità paragonabile di mantenere [(ESDT)AuBr₂] nel circolo sanguigno, come dimostrato dai valori dell'area sotto la curva (AUC) e del volume di distribuzione (V_{ss}) risultano simili per i 2 sistemi.

5.3 Sintesi e caratterizzazione del profarmaco polimerico polimero (PEG-AF)-PULL₂-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL₂-(Cyst-DOX)

5.3.1 Sintesi di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst)

Il protocollo di sintesi di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst) è riportato nello schema di Figura 5.35. Nel primo step è stata eseguita la coniugazione mediante amminazione riduttiva di cisteamina e PEG-(NH₂)₂ al derivato polialdeidico del pullulano (PULL₂) ottenuto come riportato in precedenza.

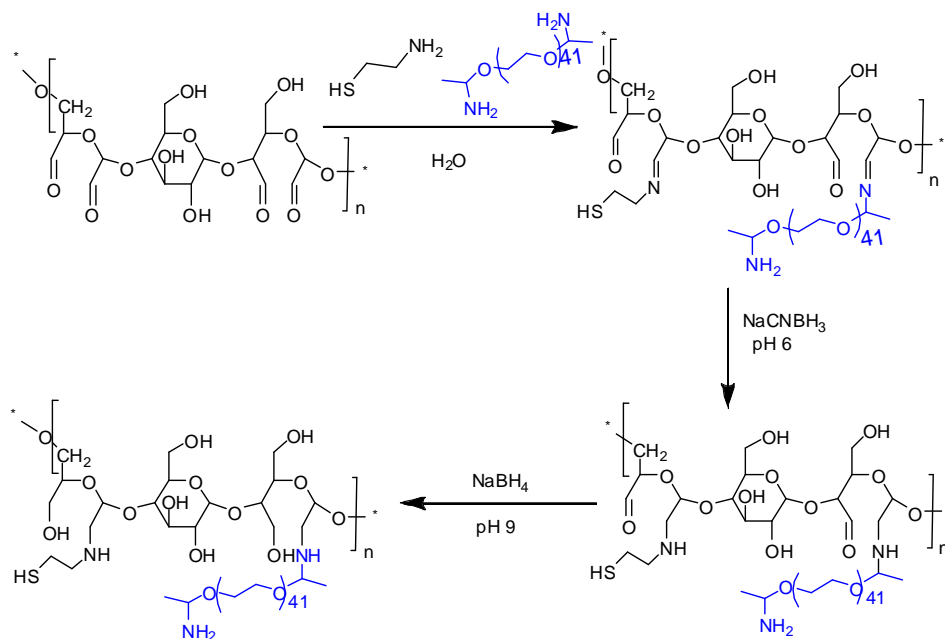


Figura 5.35: schema di reazione per la sintesi del polimero (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst)

La reazione di amminazione riduttiva attraverso cui è possibile legare la cisteamina e il PEG(NH₂)₂ avviene con un meccanismo a due step, l'equilibrio iniziale, che prevede la formazione dell'immina (base di Schiff), non risulta particolarmente favorito, ma viene efficacemente spostato dalla riduzione dell'immina ad ammina secondaria con sodiocianoboroidruro (NaCNBH₃).

Nel primo passaggio il pullulano contenente il 22% di aldeidi reattive è stato fatto reagire con un eccesso di cisteamina, secondo un rapporto molare cisteamina/aldeidi reattive di 5:1. Tale legame viene quindi stabilizzato ad ammina secondaria tramite aggiunta di sodiocianoboroidruro, riducente selettivo per le immine attivo a pH 6.

Nello *step* successivo viene aggiunto il PEG₁₉₀₀(NH₂)₂ in rapporto molare PEG₁₉₀₀(NH₂)₂ /aldeidi reattive di 2:1. Infine le aldeidi che non hanno reagito e le basi di Schiff che legano il PEG₁₉₀₀(NH₂)₂ al polimero vengono ridotte con un secondo riducente, il sodioboroidruro, attivo su gruppi aldeidici, oltre che su quelli imminici. La reazione di riduzione in questo caso viene condotta a pH 9.0 in quanto tale riducente è inattivo a pH acido. Al termine si acidifica nuovamente per neutralizzare l'eventuale NaBH₄ che non reagito. Il pH viene sempre mantenuto acido anche nelle fasi di lavorazione successive per evitare l'ossidazione dei gruppi tiolici con formazione di ponti S-S intra e inter-catena.

Il PEG₁₉₀₀(NH₂)₂ in eccesso viene rimosso con diclorometano, in cui tale polimero è insolubile. Il processo di ultrafiltrazione finale viene condotto per eliminare i sali e l'eccesso di cisteamina, ottenendo così il derivato del pullulano puro.

Sul prodotto finale, (PEG-NH₂)- pullulano-(Cyst), sono stati eseguiti il test di Snyder per la determinazione dei gruppi amminici ed il test di Elmann per la quantificazione dei gruppi tiolici. Secondo il test di Snyder, considerando la retta di taratura riportata in Figura 4.2, la sostituzione con PEG è del 11% del totale di aldeidi reattive, mentre per quanto riguarda il test di Elmann, secondo la retta di taratura riportata in Figura 4.4, risulta che il 29% delle aldeidi reattive totali sono state sostituite con cisteamina.

5.3.2 sintesi di (PEG-AF)- pullulano-(Cyst)

Per la sintesi di (PEG-AF)- pullulano-(Cyst) coniugato al pullulano si è attivato l'acido folico ad succinimidilestere dell'AF. È stato fatto reagire con dicicloesilcarbodiimmide (DCCI) e N-idrossisuccinimide (NHS) in un rapporto

FA/DCCI/NHS 1:1:1 in modo di attivare uno solo dei due gruppi carbossilici dell'AF ed evitare reticolazioni col polimero polisaccaridico.

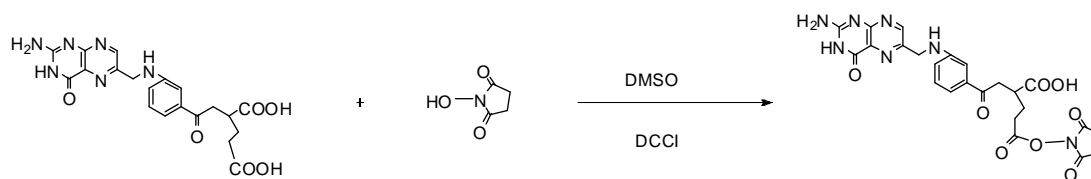


Figura 5.36: schema di sintesi di AF.NHS

La reazione di attivazione descritta in Figura 5.36 prevede l'aggiunta simultanea dei due reattivi, NHS e DCCI e due *step* di reazione: il gruppo carbossilico reagisce prima con la DCCI formando un intermedio isoureico, che risulta essere un ottimo gruppo uscente. Tale prodotto subisce quindi facilmente l'attacco nucleofilo dell'idrossisuccinimide con formazione del prodotto finale.

Il prodotto risulta poco solubile in etere dietilico, per cui è stato agevolmente purificato per precipitazione in tale solvente, in cui gli altri reattivi risultano invece solubili.

L'attivazione del gruppo carbossilico mediante esterificazione con N-idrossisuccinimide (NHS), permette il legame della molecola direzionante al gruppo amminico del PEG legato al *backbone* polimerico. La sintesi del prodotto (PEG-AF)- pullulano-(Cyst) avviene secondo lo schema di sintesi riportato in Figura 5.37.

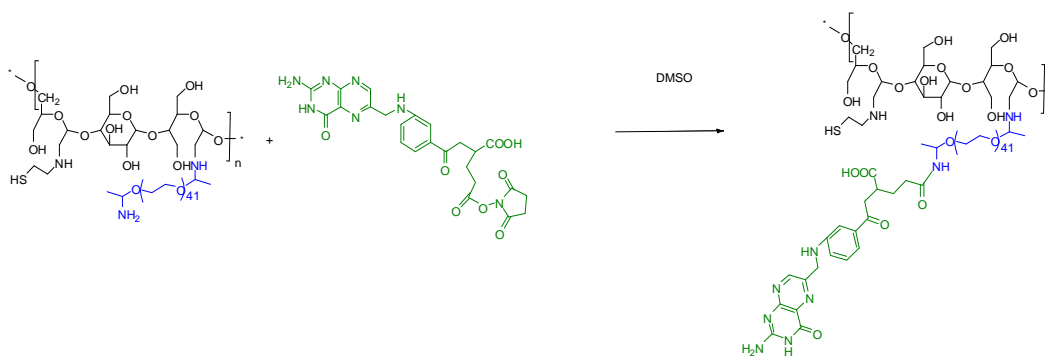


Figura 5.37: schema di sintesi del prodotto (PEG-AF)-PULL-(Cyst)

Il processo di purificazione con etere dietilico adottato successivamente consente di eliminare l’NHS che è solubile in questo solvente, a differenza del polimero derivatizzato con acido folico e dell’AF stesso. Il residuo ottenuto viene disciolto in acqua in cui il polimero va in soluzione mentre l’AF non legato rimane indisciolto. La successiva filtrazione con membrana con cut off 10 kDa per la completa eliminazione di eventuali impurezze di reazione.

Per via spettrofotometrica si calcola il contenuto di acido folico coniugato, da cui si ricava che la percentuale w/w di molecola direzionante nel polimero è di 4.3%.

5.3.3 Sintesi di (PEG-AF)-PULL-(Cyst) e (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst)

Per la coniugazione di doxorubicina ai derivati del pullulano si è sintetizzato un derivato del farmaco denominato DOX-EMCH secondo lo schema di reazione descritto in Figura 5.38. Adriblastina è stata sospesa in metanolo e filtrata per eliminare gli eccipienti non solubili (lattosio):

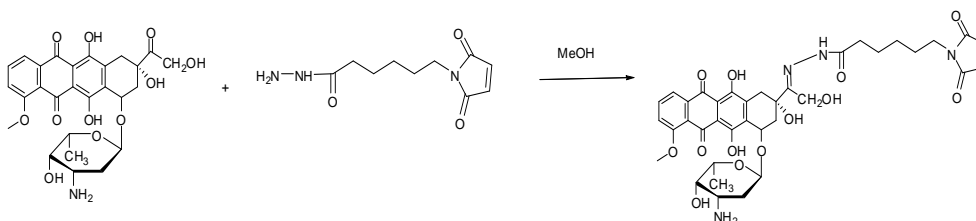


Figura 5.38: schema di reazione per la sintesi del derivato EMCH-DOX

DOX-EMCH è stata quindi ottenuto per reazione tra doxorubicina con ϵ -maleimidocaproil acido idrazide e precipitazione in acetonitrile a 4° C per 48 ore al riparo dalla luce, permette di ottenere la cristallizzazione del prodotto doxo-EMCH, con formazione di un precipitato rosso.

Sul precipitato è stata eseguita l’analisi ESI-TOF per verificare la presenza del prodotto. Lo spettro di massa riportato in Figura 5.39 mostra un picco con m/Z pari a 751, corrispondente alla massa molecolare del prodotto DOX-EMCH monoprotonato (Willner D., 1993).

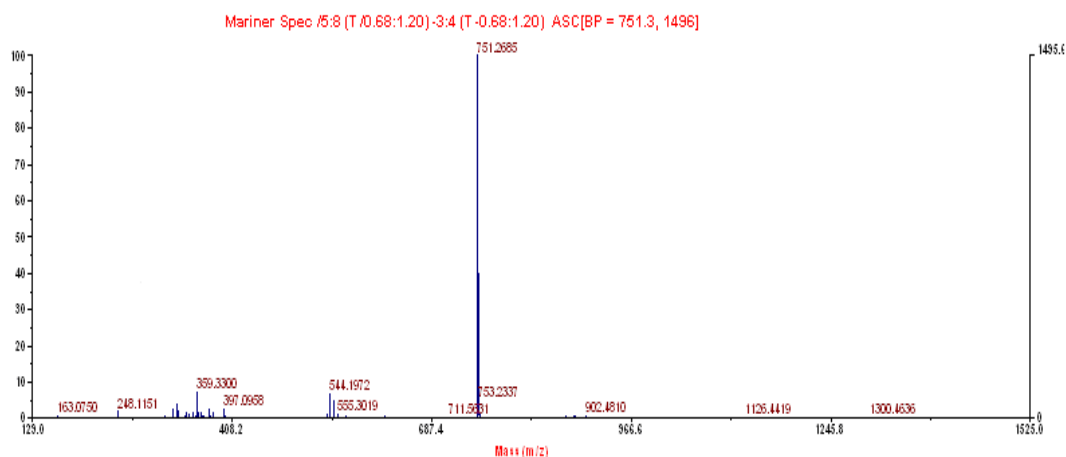


Figura 5.39: analisi ESI-TOF che evidenzia la presenza del picco M+H 751.26, rappresentativo del prodotto desiderato

I prodotti finali (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) sono stati ottenuti secondo lo schema di reazione riportati rispettivamente in Figura 5.40 e 5.41.

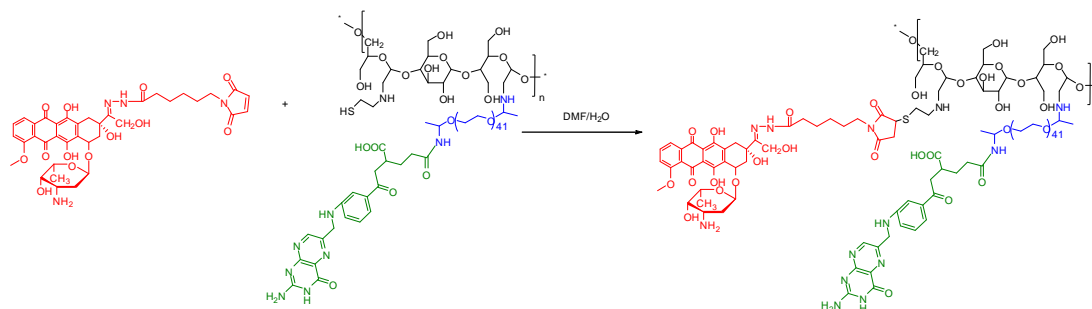


Figura 5.40: schema di reazione per la sintesi del prodotto finale (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX)

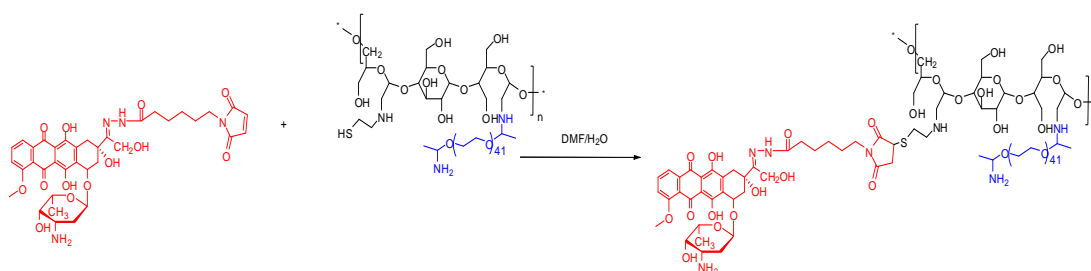


Figura 5.41: schema di reazione per la sintesi del prodotto finale (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX)

La reazione è stata condotta in presenza di tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP), riducente specifico per i ponti disolfuro che si formano in DMSO rendendo il polimero insolubile. La scelta di questo riducente è dovuta al fatto che non possiede gruppi tiolici che altrimenti competerebbero con quelli della cisteamina per il gruppo maleimmidico del *linker* EMCH (Di Stefano, G., 2004).

La soluzione di DOX-EMCH in DMF viene aggiunta lentamente alla soluzione acquosa dei bioconiugati del pullulano e durante la reazione viene mantenuto il pH neutro per evitare la precipitazione di DOX-EMCH e per prevenire l'idrolisi del legame idrazonico.

L'ultrafiltrazione permette quindi l'eliminazione della TCEP e dell'eventuale doxorubicina che non ha reagito o che ha subito processi di degradazione. Infine il prodotto filtrato viene trattato più volte con metanolo, solvente organico in cui la TCEP e, la doxorubicina libera sono solubili, mentre i polimeri (PEG-AF)-PULL-(Cyst) o (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst) sono insolubili.

Sul prodotto finale (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) o (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) è stata eseguita l'analisi spettrofotometrica per determinare la quantità di doxorubicina legata. Dalla misura effettuata risulta che il caricamento di farmaco è del 6 % w/w per il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) e del 6.3% per il polimero (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX), a cui corrisponde una funzionalizzazione del 19% dei gruppi tiolici.

In tabella XXVI sono riassunte le composizioni dei due bioconiugati ottenuti .

SOSTITUENTE	(PEG- NH ₂)-pullulano-(Cyst-DOX) % w/w	(PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) % w/w
Monomeri di glucosio	59.7	57.1
PEG	30.7	29.3
acido folico	-	4.3
Cisteamina	3.4	3.2
Doxorubicina	6.3	6

Tabella XXVI: schema riassuntivo delle caratteristiche dei polimeri (PEG- NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) e (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX)

Sulla base dei valori di peso molecolare del pullulano ossidato calcolati per gel filtrazione e sul grado di funzionalizzazione del pullulano con i diversi componenti (PEG, Cyst; DOX-EMCH) il PM di (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) è 156 kDa e quello di (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX) è 162 kDa.

5.3.4 Determinazione delle dimensioni del polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX)

La dimensione del bioconiugato (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) solubilizzato in PBS è stata determinata mediante light-scattering dinamico (DLS). I valori sono stati elaborati mediante analisi NICOMP con $3 < \chi^2 < 30$, *fit error* < 10, *baseline adjustment* < 0.3 e *residuals* < 30.0.

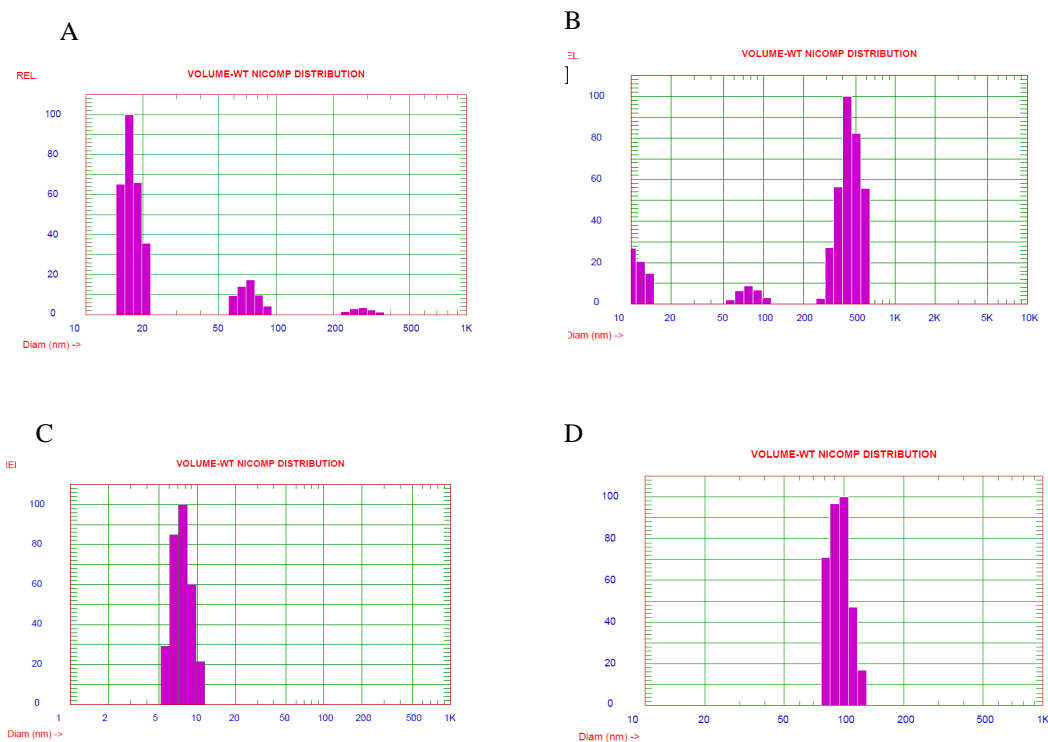


Figura 5.42: Volume idrodinamico di (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) 0.2 mg/ml in PBS (A) 20 mg/mL (B), (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) 0.2 mg/mL (C) e di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) 20 mg/mL (D).

L'analisi mostra che anche a basse concentrazioni (0.2 mg/mL) il derivato di (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) presenta una distribuzione trimodale del volume

idrodinamico (diametro medio $17.5 \text{ nm} \pm 1.19 \text{ nm}$, $71.6 \text{ nm} \pm 7.7 \text{ nm}$, $284.8 \text{ nm} \pm 41.4 \text{ nm}$). La percentuale della popolazione a dimensioni maggiori aumenta con l'aumento della concentrazione del polimero. Questo è probabilmente dovuto alla tendenza delle singole catene di polimero di auto assemblarsi in sistemi di tipo micellare. A basse concentrazioni il polimero privo di molecola direzionante [(PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX)] presenta invece una popolazione principale a $7.6 \text{ nm} \pm 1.1 \text{ nm}$ e una seconda popolazione trascurabile a $139.4 \text{ nm} \pm 20.7 \text{ nm}$. All'aumentare della concentrazione del polimero la popolazione a dimensioni maggiori aumenta, indicando anche in questo caso la formazione di un unico assemblato fisico.

5.3.5 Cinetica di rilascio di doxorubicina

Gli studi di rilascio di doxorubicina da (PEG-AF)- PULL -(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)- PULL-(Cysts-DOX) sono stati condotti in tampone 20 mM fosfato di sodio e 0.15 M NaCl (pH 7.4), in tampone acetato di sodio 200 mM (pH 5.5), oppure in plasma a 37°C.

In Figura 5.43 è riportata la cinetica di rilascio in tampone ai due diversi pH e in plasma per il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX), e il rilascio di doxorubicina a pH 5.5 per il polimero (PEG-NH₂)- PULL-(Cyst-DOX).

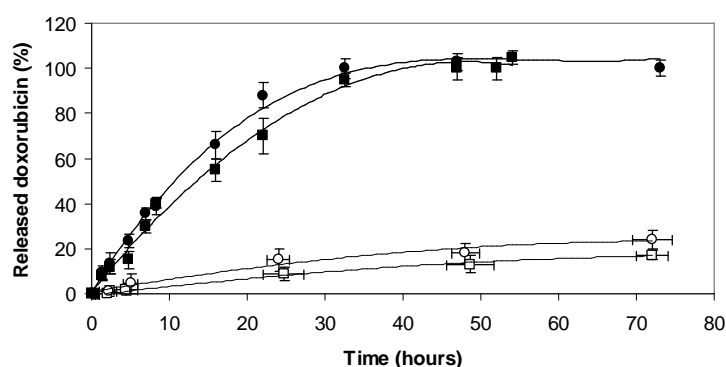


Figura 5.43: cinetica di idrolisi del polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) in tampone fosfato pH 7.4 (□), in plasma (○) e in tampone acetato pH 5.5 (●) e del polimero (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) in tampone fosfato pH 7.4 (■).

Entrambi i bioconiugati mostrano un simile profilo di rilascio della doxorubicina. I profarmaci sono sufficientemente stabili in plasma, rilasciando in 3 giorni solo il 20% della doxorubicina legata. Inoltre il profilo di rilascio del farmaco in plasma è paragonabile a quello a pH 7.4, indicando che non sono coinvolti meccanismi enzimatici nel rilascio del farmaco. A pH 5.5 invece l'idrolisi è più rapida, raggiungendo un 50% di rilascio in circa 12 ore, ed un rilascio completo di doxorubicina in circa 30 ore per entrambi i bioconiugati.

5.3.6 Studi di attività su culture cellulari

La tossicità dei coniugati è stata valutata su linee cellulari tumorali umane, carcinoma della cervice uterina (HeLa), carcinoma nasofaringeo (KB) e carcinoma della mammella (MCF-7). Le prime 2 linee cellulari sono state scelte perché come riportato in letteratura sono in grado di sovraesprimere il recettore per l'acido folico se coltivate in terreno *foli free*, e vengono quindi indicate come KB HiFR ed HeLa HiFR (Gabizon A., 1999; Holm J., 2000) mentre la linea MCF-7 è stata scelta come controllo, poiché non è in grado di sovraesprimere il FR (Salmaso S., 2004).

Il trattamento è stato condotto per 72 ore sulle linee KB HiFR ed MCF-7, mentre sulla linea HeLa HiFR il trattamento è stato condotto per 24 ore oppure per 30 minuti seguiti da una incubazione di 72 ore. I profili di tossicità ottenuti con doxorubicina, (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) e (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) con le linee cellulari sono riportati in Figura 5.44-5.47

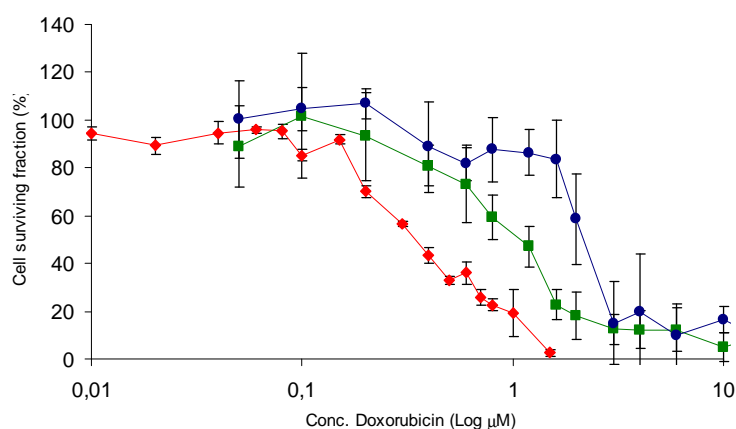


Figura 5.44: Citotossicità di DOX (◆), (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) (●) and (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX) (■) su linea cellulare MCF-7 mediante test MTT dopo 72 h di trattamento.

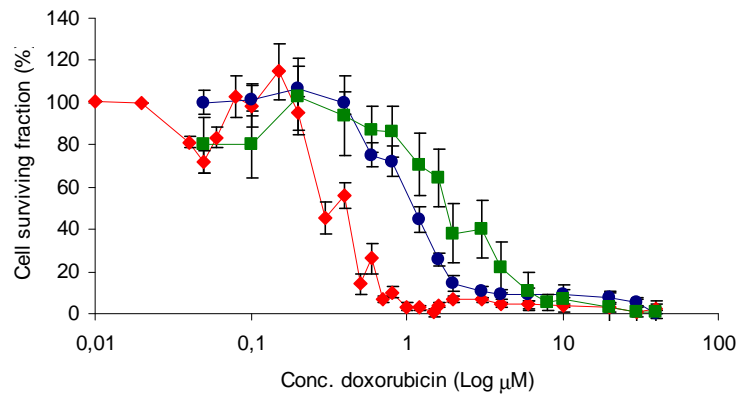


Figura 5.45: Citotossicità di DOX (♦),(PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) (●) and (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX) (■) su linea cellulare KB HiFR mediante test MTT dopo 72 h di trattamento.

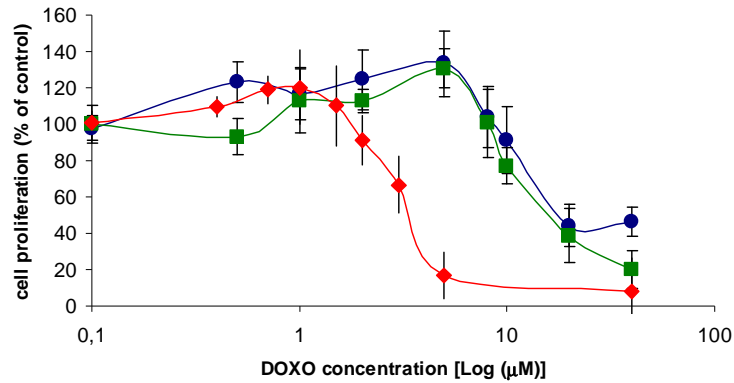


Figura 5.46: Citotossicità di DOX (♦),(PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) (●) and (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX) (■) su linea cellulare HeLa HiFR mediante test MTT dopo 24 h di trattamento.

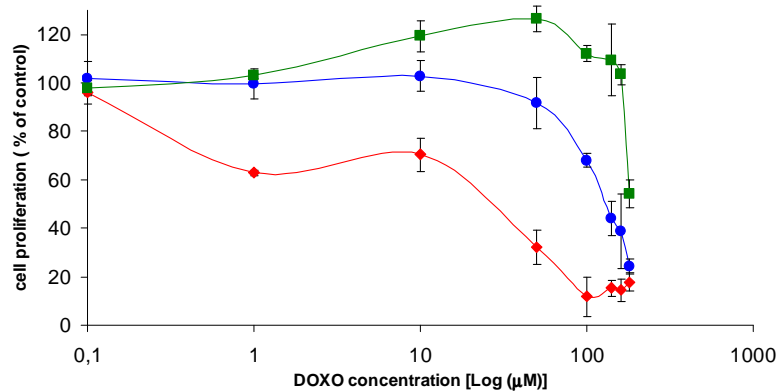


Figura 5.47: Citotossicità di DOX (♦), (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) (●) and (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX) (■) su linea cellulare HeLa HiFR mediante test MTT dopo 30 min di trattamento + 72 h di incubazione.

In tabelle XXVII sono riassunti i valori di IC₅₀ calcolati dalle curve di tossicità riportate sopra.

linea cellulare	DOX	(PEG-AF)-pull-(Cyst-DOX)	(PEG-NH ₂)-pull-(Cyst-DOX)
MCF7 (72 h)	~ 0.3 µM	~ 2.2 µM	~ 1.2 µM
KB HiFR (72 h)	~ 0.3 µM	~ 1.1 µM	~ 2 µM
HeLa HiFR (24 h)	~ 4 µM	~15 µM	~15 µM
HeLa HiFR (30min+72h)	~ 40 µM	~ 140 µM	> 180 µM

Tabella XXVII: valori di IC₅₀ di DOX, (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) (PEG-NH₂)- PULL-(Cyst-DOX) sulle linee cellulari testate

Entrambi i polimeri, con molecola direzionante e non, sono risultati in grado di mantenere la citotossicità della DOX, dimostrando di venire internalizzati e di rilasciare il farmaco nella forma attiva.

Sulla linea MCF7 ci sono piccole differenze sui valori di IC₅₀ di (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) e di (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX), e la citotossicità è il risultato di una internalizzazione aspecifica per endocitosi con conseguente rilascio intracellulare di DOX.

Sulla linea KB HiFR il polimero (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) dimostra valori di IC₅₀ di poco inferiore a quelli del polimero senza molecola direzionante. Tuttavia i valori ottenuti sono paragonabili, e anche su questa linea cellulare entrambi i bioconiugati sono in grado di venire internalizzati.

Nel caso della linea cellulare HeLa HiFR non si sono registrate differenze tra i valori di IC₅₀ dei due polimeri dopo un trattamento di 24h, sebbene le cellule sovraesprimano il FR. Si è cercato quindi di diminuire i tempi di contatto del trattamento con le cellule (30 min), poiché è noto che l'internalizzazione mediata da recettori avviene in tempi piuttosto brevi (Paulos C.M., 2004). In questo modo si è

evidenziata una lieve differenza di IC_{50} tra il polimero con acido folico, rispetto a quello senza molecola direzionante.

5.3.7 Studio di internalizzazione mediante citofluorimetro

La cinetica di internalizzazione della doxorubicina, del polimero (PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX) e di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) è stata seguita sulla linea cellulare HeLa HiFR con citofluorimetro.

La figura 5.48 riporta alcune immagini dicellule HeLa HiFR incubate con i bioconiugati (PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX) o (PEG-NH₂)- PULL-(Cyst-DOX) per 5 e 60 minuti. Si può notare che l'intensità di fluorescenza nelle cellule trattate con il polimero con AF risulta maggiore rispetto a quelle trattate col polimero (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX).

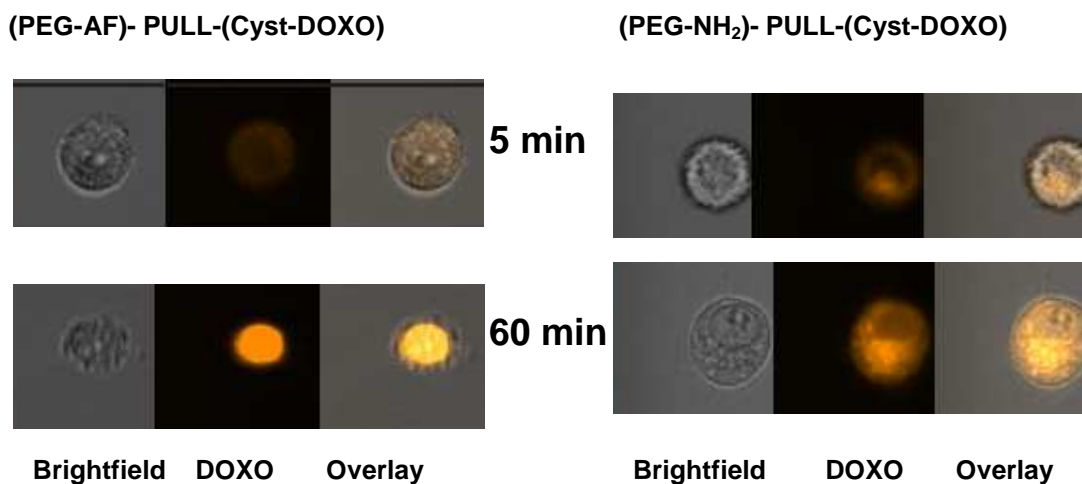


Figura 5.48: HeLa-HiFR trattate con (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) dopo 5 min e 60 min.

Lo strumento utilizzato per l'analisi (ImageStream® multispectral imaging flow cytometer) fornisce immagini di singole cellule come i tradizionali citofluorimetri, ma analizzando un campione statisticamente significativo (1000 cellule per gruppo). In questo modo è stato possibile determinare quantitativamente l'internalizzazione dei bioconiugati in funzione del tempo. In figura 5.49 è esemplificato il metodo di

analisi utilizzato per valutare quantitativamente l'internalizzazione della doxorubicina: sulle immagini delle cellule ottenute dallo strumento si definisce la membrana cellulare (A) e l'interno della cellula (B). L'internalizzazione viene definita come il rapporto fra l'intensità di fluorescenza della doxorubicina all'interno della cellula (A) e l'intensità di fluorescenza di doxorubicina adsorbita sulla membrana cellulare (B).

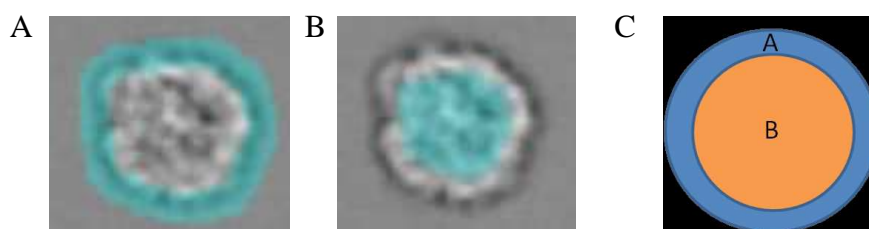


Figura 5.49: metodo di analisi utilizzato per valutare l'internalizzazione di DOX. Sono state definite la membrane cellulare (A) e l'interno della cellula (B) e l'internalizzazione di doxorubicina è stata valutata dividendo l'intensità di fluorescenza della regione B per l'intensità di fluorescenza della regione A (C).

In figura 5.50 vengono riportati i valori di internalizzazione in funzione del tempo.

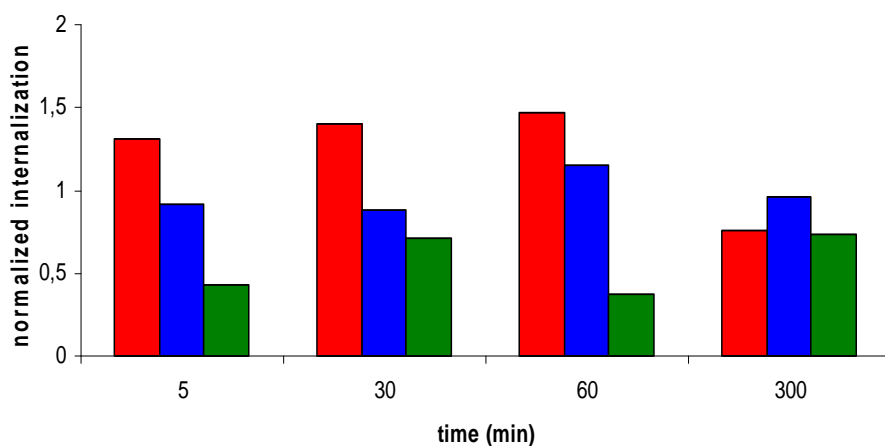


Figura 5.50: Internalizzazione di DOX (■), (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) (■) e di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) (■) su linea cellulare HeLa-HiFR.

La DOX libera è immediatamente internalizzata (5 min) per semplice diffusione; anche il polimero (PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX) ha una rapida internalizzazione (5 min) e mostra un *uptake* tempo-dipendente (fino a 60 min) in accordo con le cinetiche riportate per l'endocitosi mediata dal recettore per il folato. Il polimero

(PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) mostra sempre un minor grado di internalizzazione rispetto al derivato con il folato.

5.3.8 Studi di citotossicità in vitro su linee cellulari endoteliali

La citotossicità dei coniugati è stata valutata su due linee endoteliali umane, HUVEC (*human umbelical vein endothelial cells*) ed HBMEC (*Human Bone Marrow Endothelial cells*).

Le cellule sono state trattate con soluzioni a concentrazione crescente di DOX, (PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX) e di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX). Il trattamento è stato condotto per 72 ore, quindi le cellule sono state trattate con tripsina, e la sospensione analizzata con Coulter Counter. In figura 5.51 sono riportati i profili di tossicità della doxorubicina e dei bioconiugati di pullulano. La percentuale di cellule viene valutata in riferimento al controllo non trattato.

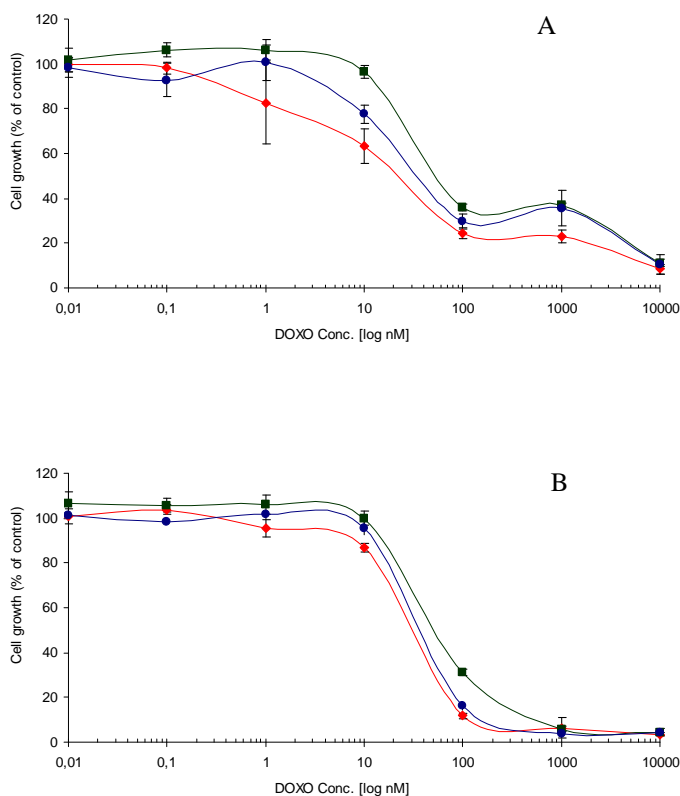


Figura 5.51: Proliferazione di HUVEC (A) e HBMEC (B) dopo 72 h di incubazione con DOX (◆), (PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX) (●) e di (PEG-NH₂)- PULL-(Cyst-DOX) (■).

La tabella XXVIII riassume i valori di IC₅₀ del farmaco e dei bioconiugati ricavati dalle curve di tossicità

linea cellulare	DOX	(PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX)	(PEG-NH ₂)- PULL -(Cyst-DOX)
HUVEC	~ 0.01 µM	~ 0.025 µM	~ 0.04 µM
HBMEC	~ 0.02 µM	~ 0.03 µM	~ 0.035 µM

Tabella XXVIII: valori di IC₅₀ di DOX, (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) e di (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX) su HUVEC ed HBMEC.

I valori di IC₅₀ ottenuti su entrambe le linee cellulari endoteliali non mostrano significative differenze di citotossicità tra il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX), indicando che il processo di internalizzazione non sia mediato dai recettori per il folato. Inoltre il profilo di tossicità dei profarmaci di DOX-EMCH è paragonabile a quello della doxorubicina libera, indicando che il rilascio è efficace e completo in 72 ore.

5.3.9 Studio di formazione di capillari su Matrigel

Il potenziale anti-angiogenico della doxorubicina e dei polimeri (PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX) e di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) è stato studiato valutando la capacità delle cellule HUVEC di formare strutture tubulari (*capillary-like tube formation*) su Matrigel (Kleinman H.K., 2005). Il saggio è stato condotto su piastra a 24 pozzetti, trattata con Matrigel (matrice da membrana basale). L'analisi viene fatta attraverso microscopio ottico, che permette di ottenere un'indicazione visiva della tendenza a formare strutture tubulari. Le singole immagini ottenute dal microscopio possono venire analizzate con un apposito *software*: la conta dei pixel dell'immagine viene trasformata in un valore di superficie occupata dai capillari. In questo modo è possibile dare una quantificazione percentuale del potenziale anti-angiogenico di una molecola (il 100% è dato dalle cellule seminate su matrigel e trattate con solo terreno). La figura 5.52 mostra le immagini raccolte al microscopio dei campioni di

cellule endoteliali trattate con doxorubicina e coi bioconiugati di pullulano con e senza acido folico.

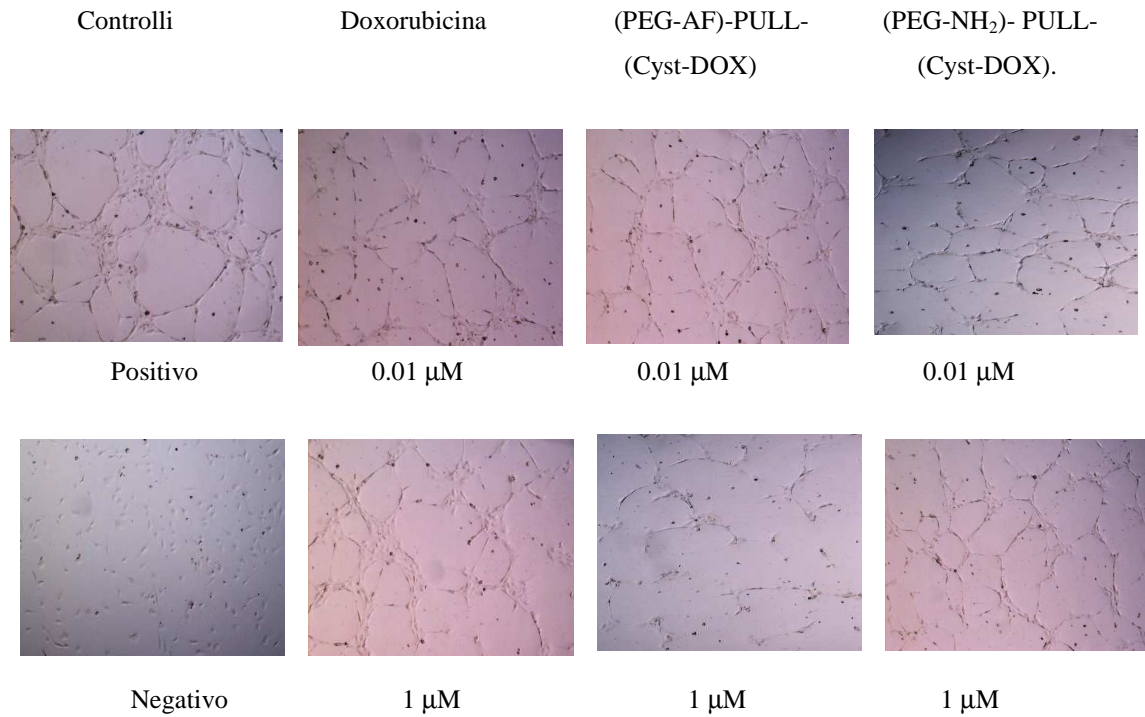


Figura 5.52: *Capillary-like tube formation*: immagini di HUVEC trattate a con DOX o (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) o (PEG-NH₂)-pullulano-(Cyst-DOX)

In figura 5.53 vengono riportati i valori percentuali di lunghezza dei capillari, calcolati rispetto al controllo positivo, dato dalle cellule HUVEC seminate su matrigel e trattate con terreno completo.

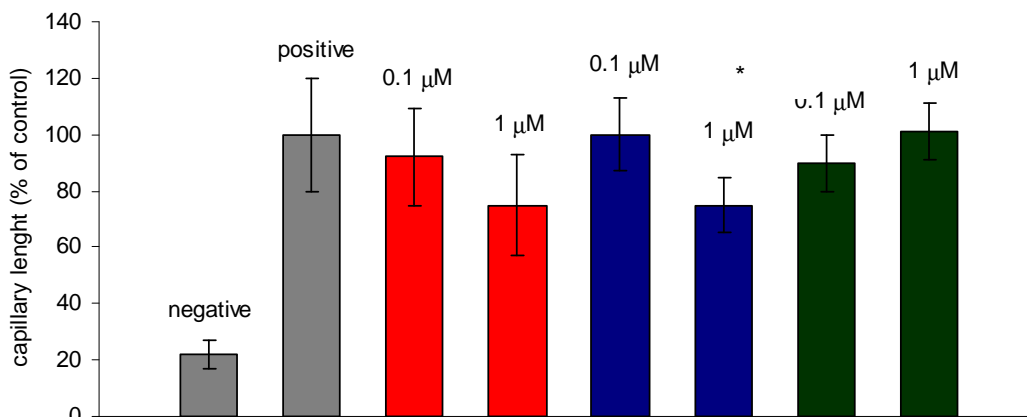


Figura 5.53: Lunghezza dei capillari (in % rispetto al controllo non trattato) di cellule HUVEC su matrigel, a diverse concentrazioni di DOX (■), (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) (■) e di (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) (■), (controlli positivo e negativo (■))

Sia dalle immagini che dai valori percentuali si può osservare che la doxorubicina e (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) non presentano significativa attività antiangiogenica, mentre il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) (0.1 μM doxo equivalente) è in grado di ridurre del 25% la formazione dei capillari.

5.3.3.10 Studi farmacocinetici

200 μL di una soluzione di (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) o di doxorubicina sono stati iniettati a 5 topi, attraverso la vena caudale. Le concentrazioni di doxorubicina delle due soluzioni sono state determinate con una misura spettrofotometrica a 495 nm. A tempi prestabiliti, sugli animali anestetizzati si eseguono prelievi di sangue di 50 μL. Il sangue viene opportunamente centrifugato per separare il plasma e trattato in metanolo per precipitare le proteine plasmatiche. I campioni vengono quindi trattati in ambiente acido per permettere l'idrolisi del legame idrazonico della DOX legata al polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX). La DOX così estratta dal campione di sangue viene analizzata in RP-HPLC equipaggiato con rivelatore a fluorescenza. La figura 5.54 mostra il profilo di rilascio ottenuto con doxorubicina libera e come bioconiugato (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX).

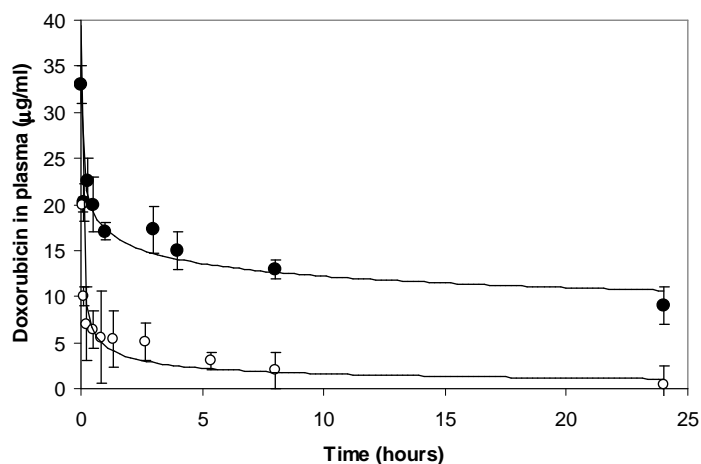


Figura 5.54: Profilo di farmacocinetica di DOX (○) e (PEG-AF)-pullulano-(Cyst-DOX) (●).

Come si può osservare il bioconjugato mostra un profilo farmacocinetico bi compartmentale. I valori di (PEG-AF)- PULL-(Cyst-DOX) nel plasma sono maggiori di quelli della doxorubicina libera.

I parametri farmacocinetici riportati in Tabella XXIX sono stati calcolati elaborando i valori sperimentali con il software Kinetica.

	Doxorubicin	(FA-PEG)-Pull-(Cyst-Doxo)
Vc (ml)	1.3	1.3
AUC ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}$)	58	554
t1/2 α (h)	0.03	0.03
t1/2 β (h)	6.5	19.9
Vss (ml)	7.7	2.6
Cl (ml/h)	0.8	0.09
Ke	0.7	0.07
K12	15.9	11.8
K21	3.0	11.4

Tabella XXIX. schema riassuntivo dei parametri farmacocinetici calcolati per mezzo del software Kinetica

Il valore del volume del compartimento centrale (V_c) ottenuto sia con doxorubicina libera che col bioconiugato (FA-PEG)-Pull-(Cyst-Doxo) è in linea col volume plasmatico (1.3 mL). Il volume di distribuzione (V_{ss}) risulta minore per il bioconiugato, indicando che il polimero si distribuisce in minor grado rispetto al farmaco libero. Tuttavia i valori delle costanti cinetiche K_{12} e K_{21} dimostrano che c'è libero passaggio del bioconiugato tra il compartimento centrale e quello periferico. I valori di *clearance* (Cl) e della costante di eliminazione (K_e) mostrano che la bioconiugazione al polimero diminuisce drasticamente l'eliminazione del farmaco, prolungando la permanenza nel circolo sanguigno, come si può notare anche dal valore di emivita della fase β ($t_{1/2\beta}$), che è maggiore per il bioconiugato che per la doxorubicina libera. I valori dell'area sotto la curva (AUC) confermano che la ridotta eliminazione e distribuzione al compartimento periferico aumentano di circa 10 volte la permanenza del bioconiugato nel circolo sanguigno.

DISCUSSIONE

Scopo di questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo di nuovi sistemi supramolecolari di *drug delivery* per di rilascio controllato e selettivo di farmaci antitumorali.

Nella prima parte di questo progetto di ricerca sono stati sintetizzati nuovi copolimeri anfifilici in grado di formare micelle per la veicolazione di farmaci. In questo lavoro è stato sintetizzato un *graft-copolymer* di natura polisaccaridica, partendo dal pullulano, zucchero naturale reso anfifilico tramite derivatizzazione con polietilenglicole e acido 5 β -colanico. Queste due molecole sono state scelte in quanto il PEG è un polimero idrofilico mentre l'acido colanico è una molecola idrofobica. Pertanto, la simultanea presenza di queste due specie molecolari lungo il *backbone* polisaccaridico sono in grado di indurre autoassemblamento del derivato supramolecolare con formazione di struttura di tipo micellare.

Per ottenere questo derivato macromolecolare il pullulano è stato attivato attraverso una reazione di ossidazione in modo da ottenere gruppi aldeidici lungo le catene polisaccaridiche che possono essere siti di ancoraggio per il PEG e l'acido colanico.

Nella prima parte del lavoro è stata quindi ottimizzata l'ossidazione del pullulano tramite periodato di sodio, un reattivo che consente di ossidare in modo selettivo gruppi diolici vicinali ad aldeidi. Sfruttando la determinazione delle aldeidi mediante idrossilamina cloridrato si sono studiate le condizioni di ossidazione la cinetica di reazione.

Sulla base dello studio preliminare sono stati ottenuti polimeri a diverso grado di ossidazione impiegando diversi rapporti molari ossidante/unità glicosidiche. In particolare è stato preparato un polimero con grado di ossidazione del 65% corrispondente alla completa ossidazione del *backbone* polimerico e un derivato ossidato al 22% corrispondente all'ossidazione del 30% delle unità glicosidiche.

Come descritto in letteratura l'ossidazione ha portato alla riduzione del peso molecolare del pullulano e i due derivati sono risultati avere PM di 20 kDa nel caso del polimeri ossidato al 65%, e 93 kDa per il polimero ossidato al 22%. Al fine di ottenere derivati con caratteristiche diverse si sono utilizzati diverse condizioni di

reazione quali: diversi rapporti colanico-dodecilammina/aldeidi e PEG/aldeidi e PEG mono o diammino terminale.

Nel caso del derivato con monoammino PEG si sono ottenuti due colloidi supramolecolari, (colanico)-PULL₁-(PEG) e (colanico)-PULL₂-(PEG), a partire dal *backbone* di pullulano ossidato al 65% e al 22% rispettivamente.

Per la coniugazione di PEG è stato utilizzato il derivato monoamminico (PEG-NH₂) mentre per coniugare l'acido colanico si è sintetizzato il derivato colanico-dodecilammina ottenuto per coniugazione del cloruro dell'acido colanico con dodecilammina. La scelta della dodecildiammina deriva dalla necessità di introdurre una funzione amminica per la coniugazione ai gruppi aldeidici del pullulano ossidato e di aumentare la dimensione della porzione idrofobica e di garantire flessibilità ai domini idrofobici favorendone il *self-assembly* del coniugato finale. La reazione di sintesi di colanico-dodecilammina è stata condotta in cloruro di metilene dove sia il cloruro dell'acido colanico che la dodecildiammina sono solubili. L'attacco nucleofilo da parte di quest'ultima risulta favorito dall'elevata reattività del colanico attivato. L'impiego di un elevato rapporto dodecildiammina:colanico (5:1) consente di ottenere il derivato di dodecilammina monofunzionalizzato con acido colanico mentre l'eccesso di dodecildiammina che non ha reagito è stato estesamente eliminato mediante dissoluzione in acqua acida dove è solubile.

Per coniugare PEG e acido colanico al pullulano si è proceduto in due fasi. Nella prima si è legato il colanico dodecilammina e nella seconda il PEG mono o diammino terminale. Le reazioni di coniugazione sono state condotte in una miscela di solventi sulla base delle diverse solubilità del pullulano ossidato al 65% o al 22%. La miscela DMF/cloroformio in rapporto 70/30 è risultata la più adatta per la reazione con il pullulano a maggiore grado di ossidazione, mentre la miscela DMSO/cloroformio 70/30 è maggiormente idonea per la reazione col derivato meno attivato.

La base di Schiff che si forma tra il gruppo amminico del colanico-dodecilammina e le aldeidi del polisaccaride ossidato è stata stabilizzata con sodiotriacetossiboroidrurio. Tale reattivo consente la riduzione della base di Schiff a gruppi amminici secondari in solvente organico senza però ridurre le aldeidi che non

hanno reagito. Si è quindi potuto procedere alla coniugazione di PEG sempre attraverso la formazione di una base di Schiff e riduzione. In questo caso è stato impiegato il sodioboroidruro, un reattivo che consente anche la completa riduzione anche delle aldeidi che non sono state modificate con PEG. La completa eliminazione dei gruppi aldeidici è necessaria per ottenere prodotti per uso farmaceutico in quanto numerosi studi hanno dimostrato che molecole con gruppi funzionali aldeidici presentano una marcata tossicità cellulare.

Una serie di derivati è stata preparata partendo dal pullulano a minimo grado di ossidazione con colanico-dodecilammina e PEG-diammino. Il pullulano a più basso stato di ossidazione è stato scelto per avere un derivato che mantiene un elevato grado di struttura iniziale del polisaccaride e che quindi ha una maggiore solubilità e possibilmente una maggiore biocompatibilità e biodegradabilità. Il diammino PEG invece è stato impiegato per ottenere derivati con funzioni amminiche libere che possono essere successivamente modificate con funzioni direzionanti o altre molecole con specifiche caratteristiche chimico-fisiche o biologiche. Per l'ottenimento di questi derivati si è dovuto considerare, in fase di sintesi, la natura bifunzionale del PEG che può portare a reticolazione. Per ovviare a questo problema si è utilizzato un elevato rapporto PEG/aldeidi (7.5:1). Utilizzando diversi rapporti colanico-dodecilammina/aldeidi si sono ottenuti derivati con diverso grado di funzionalizzazione con colanico-dodecilammina e PEG. Dall'analisi della composizione finale dei derivati risulta che sia la reazione con colanico-dodecilammina che con PEG non è completa. Nonostante l'elevato rapporto colanico-dodecilammina/aldeidi e PEG/aldeidi la modifica delle aldeidi è infatti molto bassa. Questo può essere dovuto a motivi di ingombro sterico soprattutto in considerazione della vicinanza dei gruppi aldeidici nell'anello glicosidico ossidato.

La capacità dei derivati anfificili del pullulano di formare micelle è stata valutata sia mediante determinazione della concentrazione micellare critica, che mediante analisi di light scattering.

Nel caso dei derivati ottenuti con pullulano ad alto e a basso grado di ossidazione e monoammino PEG è risultato che il derivato ottenuto con pullulano a minor grado di ossidazione ha un minor CMC molare (μM) e quindi presenta maggiore capacità di autoassemblamento. Tuttavia, visto il suo elevato peso

molecolare (230 kDa) il valore di CMC espresso in termini ponderali ($\mu\text{g/ml}$) è maggiore rispetto al derivato ottenuto con pullulano a maggiore grado di ossidazione che presenta un minore PM (99.5 kDa). Poiché la composizione dei due derivati è simile (grado di sostituzione con PEG e colanico-dodecilammina), questo risultato mostra che molecole grandi tendono ad autoassemblarsi più facilmente forse perché hanno una maggiore flessibilità.

Nel caso invece dei derivati ottenuti con pullulano a minor grado di ossidazione e diammino PEG si osserva una diminuzione della CMC sia in termini μM che $\mu\text{g/ml}$ all'aumentare del rapporto colanico/PEG. Questo risultato indica che un maggiore rapporto di unità idrofobiche rispetto a quelle idrofiliche induce l'organizzazione in sistemi autoassemblanti in cui la componente idrofobica si struttura in un *core* compatto.

La valutazione dimensionale delle micelle è stata condotta con *light-scattering* dinamico in modalità Nicomp, funzionalità che permette di valutare eventuali distribuzioni multimodali. I diagrammi dimensionali, espressi in relazione al volume occupato dalle micelle nel *bulk*, mostrano per i polimeri (colanico)-PULL-(PEG) ottenuti con monoammino PEG la presenza di un'unica specie in soluzione, avente diametro medio compreso fra i 20 ed i 25 nm. L'influenza del grado di derivatizzazione sulle dimensioni micellari è minore di quanto atteso, dato che i risultati per i due derivati a diverso grado di ossidazione sono comparabili.

I diagrammi dimensionali per i polimeri (colanico)-PULL₂-(PEG-NH₂), mostrano che i tre co-polimeri sono caratterizzati da più specie anche se la popolazione che occupa il maggior volume è quella a circa 300-500 nm. È possibile notare una correlazione tra le dimensioni dei nanosistemi, i valori di CMC e il rapporto di unità idrofobiche legate al polimero. I dati quindi sembrano indicare che un maggiore rapporto di colanico legato al *backbone* polimerico favorisce la micellizzazione e la formazione di strutture più compatte e quindi con volume inferiore rispetto ai co-polimeri in cui il rapporto PEG colanico è elevato e che più probabilmente potrebbero micellare solo in *clusters* intermolecolari. Inoltre, paragonando i risultati ottenuti con pullulano a basso grado di ossidazione con monoammino PEG e con diammino PEG a maggior rapporto colanico/PEG si assume che più che il rapporto colanico/PEG è la quantità di colanico nella molecola

e il PM del polimero a giocare un ruolo importante nella formazione di strutture con caratteristiche dimensionali diverse.

Un primo studio mirato a valutare le capacità di veicolazione di farmaci dei sistemi supramolecolari è stato condotto utilizzando i derivati ottenuti con monoammino PEG e paclitaxel. Questo farmaco è stato scelto in quanto è un agente antitumorale quasi totalmente insolubile in acqua, attualmente formulato in Cremophor EL, veicolo responsabile di tossicità e reazioni di ipersensibilità. Le solubilizzazioni sono state condotte con il metodo per “co-solubilizzazione”, essendo il procedimento che, secondo quanto riportato in letteratura, garantisce la maggiore riproducibilità di “*drug loading*”. Ciò potrebbe essere legato al fatto che la diminuzione graduale della concentrazione del solvente organico dalla miscela porta ad un miglioramento dell’interazione fra i blocchi idrofobici del copolimero e il farmaco, e solo successivamente si determina la formazione delle micelle. Con tale metodo si ottiene oltretutto un prodotto solido che può essere conservato a lungo e che porta, per aggiunta di acqua, alla formazione di micelle in pochi istanti.

I profili di solubilizzazione dei derivati (colanico)-PULL-(PEG) ottenuti con monoammino PEG sono risultati praticamente sovrapponibili e caratterizzati da una capacità di caricamento di circa il 5% in peso farmaco/carrier. Lo studio di stabilità del sistema ha mostrato tuttavia una instabilità fisica in quanto il farmaco tende a sedimentare rapidamente. E’ possibile considerare pressochè costante il contenuto di principio attivo entro le 3 ore dalla dissoluzione del polimero in ambiente acquoso ma poi si ha la completa precipitazione del farmaco in 18 ore. Il derivato a minor grado di ossidazione che presenta un minor valore di CMC μM dimostra una stabilità leggermente superiore, suggerendo che una maggior tendenza a formare micelle garantisce anche una maggiore stabilità del sistema farmaco/carrier.

I profili di solubilizzazione di paclitaxel con derivati (colanico)-PULL₂-(PEG-NH₂) ottenuti con PEG diammino mostrano che la capacità di veicolare farmaci idrofobici è strettamente correlata alla composizione del carrier. All’aumentare della frazione idrofila diminuisce sia la capacità di caricamento del farmaco che la stabilità del sistema. Il polimero avente rapporto PEG:colanico pari a

~27:1, si è dimostrato inefficace alla solubilizzazione del paclitaxel, con una capacità di caricamento inferiore allo 0.1% p/p. Con il polimero avente rapporto PEG/colanico pari a ~6:1 si è raggiunta una capacità di caricamento dell'1.2% p/p ma lo studio di stabilità del sistema mostra tuttavia la tendenza a rilasciare il farmaco piuttosto rapidamente con conseguente precipitazione. I migliori risultati si sono ottenuti con il derivato polimerico avente rapporto PEG:colanico pari a ~1.6:1, il quale mostra una capacità di *loading* (4% p/p) paragonabile a quella dei polimeri di (colanico)-PULL-(PEG), e una prolungata stabilità nel tempo. Come si è osservato con i derivati ottenuti con monoammino PEG, risulta evidente che nei carrier con maggiore rapporto di unità idrofobiche, la capacità autoassemblante risulta più spiccata e questo garantisce una maggiore compattezza del core idrofobico, che assicura un *loading* efficiente di farmaci idrofobici e una maggiore stabilità del sistema colloidale.

Vista la buona potenzialità dei carrier (colanico)-PULL₂-(PEG-NH₂) di solubilizzare molecole idrofobiche, tali derivati sono stati studiati per valutare la loro capacità di solubilizzare e prolungare la stabilità di un farmaco a base di Oro (III) con attività antitumorale, [(ESDT)AuBr₂]. Studi preliminari hanno evidenziato che tale farmaco, è poco solubile in acqua e degrada rapidamente a pH fisiologico. Gli studi di solubilità sono stati condotti in condizioni acide in cui il farmaco risulta stabile, utilizzando due metodi di dissoluzione, per co-solubilizzazione e per contatto. La dissoluzione di [(ESDT)AuBr₂] all'aumentare della concentrazione di ciascun dei tre co-polimeri è risultata fortemente influenzata dal protocollo di dissoluzione impiegato oltre che dal tipo di carrier.

Il metodo per “co-solubilizzazione” è risultato poco efficace in quanto consente solo un lieve incremento della solubilità del farmaco. La capacità di dissoluzione di [(ESDT)AuBr₂] aumenta all'aumentare del rapporto PEG/colanico. Come si è osservato dai valori di CMC e delle dimensioni particellari, i polimeri a minor rapporto PEG/colanico tendono a formare micelle con un *core* idrofobico più compatto, in cui probabilmente il farmaco non è in grado di inserirsi. Non è stato possibile calcolare il Log P per [(ESDT)AuBr₂], ma dai dati sperimentali di solubilità il complesso sembra avere limitato carattere idrofobico, e quindi inserirsi più facilmente in micelle con un *core* “rilassato” contenente molecole di acqua (polimero

con un alto rapporto PEG/colanico), piuttosto che in strutture micellari compatte, adatte invece a solubilizzare molecole molto idrofobiche, come ad esempio il paclitaxel. Come si nota dai profili di dissoluzione, inoltre, all'aumentare della concentrazione di polimero, non corrisponde un incremento della solubilità di [(ESDT)AuBr₂] oltre una certa quota, piuttosto una diminuzione della solubilità. Questo può essere dovuto alla procedura di caricamento in quanto la “co-solubilizzazione”, ha mostrato come il caricamento nelle micelle induca la degradazione del farmaco. [(ESDT)AuBr₂] infatti è suscettibile a riduzione di Au³⁺ a Au¹⁺ con formazione del complesso [Au(ESDT)₂] (Ronconi L. *et al.*, 2006). Le analisi spettrofotometriche, ESI-MS e HPLC hanno evidenziato la presenza di sottoprodotti di degradazione presenti appena le micelle vengono costituite in acqua.

La dissoluzione per contatto diretto del farmaco con i co-polimeri è risultata invece molto più efficiente rispetto alla metodica per “co-solubilizzazione”. Anche in questo caso i polimeri con rapporto molare PEG/colanico maggiore sono risultati più efficienti nell'aumentare la solubilità di [(ESDT)AuBr₂] ottenendo l' 1.7% w/w di caricamento e un aumento della solubilità di 8 volte. Il polimero con un rapporto PEG/colanico pari a 1.6:1 è risultato meno efficiente nel processo, indicando che con questo farmaco la componente idrofilica del sistema polimerico gioca un ruolo rilevante nel determinare interazioni fisiche. Inoltre il processo adottato non induce alcuna degradazione di [(ESDT)AuBr₂]. L'assenza di sottoprodotti è stata confermata mediante tecniche cromatografie e strumentali.

È stata determinata la capacità dei tre polimeri di stabilizzare [(ESDT)AuBr₂] in soluzione fisiologica. Tale studio ha evidenziato che tutti i polimeri sono in grado di rallentare la cinetica di degradazione del complesso dell'oro con efficienza decrescente passando dal derivato con maggior rapporto di PEG/colanico a quello con più basso rapporto di PEG/colanico. Questo dato è in linea con i risultati ottenuti nello studio di solubilità confermando la rilevanza della componente idrofilica del polimero nella formazione di complessi con il farmaco studiato.

Al fine di valutare l'efficacia dei derivati del pullulano come carrier di farmaci è stato condotto uno studio parallelo in cui è stata valutata la capacità di dissoluzione e di stabilizzazione del derivato [(ESDT)AuBr₂] con ciclodestrine. Le ciclodestrine sono derivati molecolati oligosaccaridici ciclici di grande interesse per

la veicolazione di farmaci idrofobici in quanto possono includerli nella loro cavità portandoli in soluzione e rallentando la loro degradazione. Nello studio sono state considerate tre ciclodestrine (β -CD, Me- β -CD e HP- β -CD). Anche in questo caso, risultati diversi sono stati ottenuti in relazione al metodo di dissoluzione impiegato. Contrariamente a quanto ottenuto con i derivati del pullulano il metodo per “co-solubilizzazione” è risultato essere più efficace in termini di solubilità e di stabilità del derivato [(ESDT)AuBr₂]. Si è infatti visto un aumento lineare della solubilità del farmaco all’aumentare delle ciclodestrine e il raggiungimento di un plateau oltre il quale un incremento della concentrazione di ciclodestrine non aumenta la solubilità del farmaco. Pur avendo i complessi con le ciclodestrine una costante di stabilità molto simile, è stato trovato che le Me- β -CD consentono di ottenere una maggiore solubilità di [(ESDT)AuBr₂] in soluzione rispetto alle altre due ciclodestrine.

Il metodo di “co-solubilizzazione” non ha portato a prodotti di degradazione di [(ESDT)AuBr₂] a differenza di quanto riscontrato coi polimeri a base di pullulano. Questo sembra indicare che il farmaco penetra nella cavità anche in soluzione di DMF, dove viene protetto da reazioni di degradazione e successivamente il complesso vada in soluzione per aggiunta di tampone. Inoltre il processo di formazione del complesso, che può avvenire già in DMF, non discrimina tra le varie ciclodestrine in termini di ingombro sterico. Il farmaco penetra in profondità nella cavità delle ciclodestrine per cui ha affinità e dove permane anche dopo dissoluzione del complesso in acqua.

Con il metodo per contatto diretto la solubilità del farmaco è risultata inferiore per tutte e tre le ciclodestrine rispetto ai dati ottenuti per “co-solubilizzazione”. Inoltre la capacità dissolutiva delle ciclodestrine e la costante di inclusione risulta significativamente diversa a seconda della ciclodestrina considerata. Il complesso di [(ESDT)AuBr₂] con le β -ciclodestrine ha una costante di stabilità simile a quella riscontrata nel metodo per “co-solubilizzazione”, mentre i complessi con Me- β -ciclodestrine e le HP- β -ciclodestrine risultano meno stabili. In questo caso, il processo di solubilizzazione per contatto consente di discriminare la diversa propensione delle varie ciclodestrine ad includere il farmaco poiché, pur avendo quest’ultimo una certa affinità per la cavità profonda delle ciclodestrine, come dimostrato nello studio per “co-solubilizzazione”, la penetrazione del farmaco

nelle ciclodestrine in fase acquosa può essere ostacolata dalla presenza dei gruppi idrossilpropilici e metilici delle HP- β -CD e Me- β -CD rispettivamente, mentre l'effetto dell'ingombro è assente nelle β -CD. Ne consegue che la cinetica con cui [(ESDT)AuBr₂] penetra la cavità della ciclodestrina è sfavorita dalla presenza di gruppi idrossilpropilici o metilici attorno alla cavità stessa.

Infine è stato eseguito uno studio per determinare la capacità delle ciclodestrine di ridurre la cinetica di degradazione di [(ESDT)AuBr₂] in soluzione a pH fisiologico. Poiché il farmaco viene incluso nella cavità delle ciclodestrine come dimostrato dagli studi di dissoluzione, i dati ottenuti evidenziano una diversa propensione delle ciclodestrine a rallentare la cinetica di degradazione di [(ESDT)AuBr₂] con una maggiore efficienza da parte delle β -CD rispetto ad HP- β -CD e Me- β -CD. Questi risultati sembrano indicare che il farmaco forma complessi strutturalmente diversi con le tre ciclodestrine responsabili di una diversa protezione dall'ambiente circostante.

Al fine di valutare la potenziale efficacia terapeutica delle formulazioni (colanico)-PULL₂-(PEG-NH₂)-[(ESDT)AuBr₂] e HP- β -CD-[(ESDT)AuBr₂] sono stati condotti alcuni studi di citotossicità su tre linee tumorali umane, le MCF-7, le KB e le HeLa. I risultati ottenuti hanno mostrato che le formulazioni con i derivati del pullulano e con CD hanno la stessa attività citotossica di [(ESDT)AuBr₂] come tale, indicando che il farmaco viene facilmente rilasciato sia dai sistemi micellari sia dai corpi di inclusione.

Studi farmacocinetici sono stati condotti sui due candidati formulativi più interessanti. Infatti (colanico)-PULL₂-(PEG-NH₂) con un rapporto PEG/colanico 27:1 è il derivato con migliori caratteristiche di solubilizzazione di [(ESDT)AuBr₂], mentre le HP- β -CD sono le ciclodestrine approvate per uso sistemico. Come atteso la veicolazione del complesso dell'oro sia con i bioconiugati di pullulano sia con le ciclodestrine permette di ottenere una lunga permanenza in circolo del farmaco. I profili farmacocinetici mostrano in entrambi i casi un andamento bifasico, con una rapida diminuzione della concentrazione plasmatica di farmaco iniziale e una successiva stabilizzazione. Questo indica che il farmaco tende a distribuirsi rapidamente nel compartimento centrale. Il maggiore t_{1/2} α ottenuto con il derivato del pullulano rispetto a quello ottenuto con HP- β -CD indica che il primo si

distribuisce più lentamente della formulazione a base di ciclodestrine. Tuttavia i valori di volume di distribuzione (V_{ss}) sembrano indicare che la formulazione di pullulano si distribuisca più massivamente delle ciclodestrine. Comunque le due formulazioni non presentano significative differenze e i valori di biodisponibilità sistemica (AUC mediato per la dose) sono risultati molto simili.

Nella seconda parte del lavoro di tesi si è sfruttata l'esperienza ottenuta nella modifica del pullulano per sviluppare un bioconiugato polimerico derivatizzato con doxorubicina, un antibiotico antineoplastico utilizzato, da solo o in associazione con altri farmaci, nel trattamento di leucemie, linfomi, sarcomi e numerosi tumori solidi, come il cancro al seno. La doxorubicina ha carattere anfipatico, in grado di diffondere rapidamente attraverso le membrane biologiche, distribuendosi ubiquitariamente nell'organismo dando così numerosi effetti collaterali, in particolare cardiopatie sia acute che croniche.

Al fine di migliorare le caratteristiche biofarmaceutiche di doxorubicina è stata messa a punto la sintesi di un sistema in cui il farmaco è covalentemente legato ad uno spaziatore contenente un legame idrazonico pH sensibile, in grado di rilasciare il farmaco selettivamente nel tessuto tumorale. Questo sistema può essere ulteriormente funzionalizzato con una molecola direzionante che permette di combinare le due strategie di *targetting* passivo (effetto EPR) e direzionamento attivo.

Il polimero scelto per il *backbone* è il pullulano, modificato secondo la metodica di ossidazione messa a punto in precedenza per introdurre funzioni aldeidiche disponibili per il legame delle varie funzioni. Si è utilizzato il pullulano a minor grado di ossidazione, 22%, che rappresenta un adeguato compromesso tra grado di attivazione, peso molecolare del *backbone* e mantenimento di struttura polisaccaridica. Al fine di ottenere una struttura base macromolecolare a cui legare sia il farmaco che l'agente direzionante, si sono inserite nella struttura polisaccaridica funzioni tioliche e amminiche.

Il derivato polialdeidico è stato quindi utilizzato come *backbone* polimerico per la successiva coniugazione delle diverse funzioni. Dapprima, mediante amminazione riduttiva, il polisaccaride è stato modificato con cisteamina e poi con diammino-

PEG. Il PEG(NH₂)₂ è stato infatti scelto perché, essendo omobifunzionale, consente di essere coniugato da un lato al *backbone* polisaccaridico e dall'altro ad unità direzionanti. Inoltre essendo un polimero idrofilico e flessibile consente da un lato di ovviare alla diminuzione di solubilità dovuta alla coniugazione di molecole idrofobiche quali acido folico e doxorubicina, e dall'altra mantiene la possibilità di interazione dell'acido folico con i recettori di membrana.

La cisteamina è stata scelta perché a differenza della cisteina non ha un gruppo carbossilico e quindi non dà reazioni collaterali e permette di funzionalizzare il *backbone* con gruppi tiolici. La derivatizzazione del pullulano è stata condotta nelle stesse condizioni impiegate per la preparazione dei derivati (colanico)-PULL-(PEG) descritti precedentemente.

Dall'analisi condotta per calcolare il grado di funzionalizzazione del *backbone* polisaccaridico con PEG e cisteamina è risultato che l'11% delle aldeidi reattive è stato modificato con PEG mentre il 29% sono state sostituite con cisteamina. Come si è osservato nella preparazione dei composti (colanico)-PULL-(PEG) anche impiegando un eccesso di reattivi, cisteamina e PEG, non si ha la completa derivatizzazione dei gruppi aldeidici.

Ai gruppi amminici liberi è stato legato l'acido folico, una vitamina a basso peso molecolare, in grado di legare il recettore per l'acido folico (FR) espresso in pochi tessuti sani, ma sovraespresso in diversi tipi di tumore. Bioconiugati macromolecolari legati all'acido folico vengono efficacemente riconosciuti dai recettori per la vitamina (FR) e internalizzati dalla cellula con un processo di endocitosi mediato da questo sistema recettoriale. Una volta che il ligando viene riconosciuto dai recettori per l'acido folico (FR), situati in caveolae sulla superficie delle cellule, le membrane cellulari si invaginano a formare un endosoma contenente il coniugato. Un'acidificazione intravesicolare porta alla dissociazione dal recettore (FR) e l'elevata concentrazione locale di folato nel lume delle caveolae ne favorisce il trasporto nel citoplasma per mezzo di una proteina *carrier*. Al termine di questo processo, definito come potocitosi, il recettore viene riportato sulla superficie cellulare per essere riciclato.

Per permettere la coniugazione dell'acido folico all'ammina terminale del PEG è stato dapprima necessario esterificare l'acido folico (AF) con N-

idrossisuccinimmide (NHS). In letteratura è riportato che nelle condizioni di sintesi impiegate si modifica per il 70% il gruppo carbossilico in γ e solo per il 30 % quello in α (Atkinson, S.F., 2001).

La possibilità di attivare uno solo dei due gruppi carbossilici permette di evitare reticolazioni col polimero. Inoltre la precedente attivazione dell'acido folico in posizione γ consente il mantenimento dell'attività biologica. Infatti la formazione di un coniugato tra l'acido folico e altre molecole attraverso il carbossile in γ non altera la capacità di riconoscimento da parte dei recettori per il folato (Leamon, C.P. 1991). Inoltre il diammino-PEG₁₉₀₀ a cui è legato l'acido folico funge da spaziatore tra la catena polisaccaridica e l'agente direzionante, conferendo flessibilità e sufficiente libertà di movimento al direzionante per interagire col recettore. Il grado di derivatizzazione del derivato del pullulano con acido folico è risultato essere il 4.3 % w/w.

Ai gruppi tiolici dei residui di cisteamina è stata invece legata la doxorubicina tramite un legame idrazonico che si idrolizza a pH debolmente acido e permette quindi il rilascio selettivo di doxorubicina nella massa tumorale e in particolare all'interno degli endosomi cellulari, dove il pH è di 5.5. Per avere questo legame è stato scelto un *linker* eterobifunzionale, idrazide dell'acido [N- ϵ -maleimido-caproico] trifluoroacetilato (EMCH), funzionalizzato ad un'estremità con un gruppo maleimmidico che lega la cisteamina introdotta nel *backbone* e all'altra con un gruppo idrazinico in grado di reagire con il carbonile in posizione 13 della Doxorubicina, portando alla formazione dell'idrazone. Dall'analisi spettrofotometrica sul prodotto finale (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) è risultato che il caricamento di farmaco è del 6 % w/w, mentre per il polimero (PEG-NH₂)- PULL-(Cys-DOX) non funzionalizzato con acido folico il caricamento risulta essere del 6.3 % w/w.

Sulla base dell'analisi dei pesi molecolari determinati mediante cromatografia di esclusione e attraverso il calcolo delle varie funzioni coniugate al *backbone* polimerico il derivato (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) è risultato avere un peso molecolare di 153 kDa, mentre (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOX) ha un PM di 162 kDa.

È stato valutato il volume idrodinamico del bioconiugato con *light scattering* dinamico. L'analisi è stata condotta su entrambi i polimeri in soluzioni a diverse concentrazioni, per valutare l'effetto sia dei sostituenti sia della concentrazione. I risultati per il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOX) mostrano la presenza di 3 diverse popolazioni (~ 10-20 nm; ~ 50-70 nm; ~ 280-360 nm) sia in soluzioni diluite che in soluzioni concentrate. All'aumentare della concentrazione di polimero si osserva un aumento della percentuale della popolazione a dimensioni maggiori. Il polimero (PEG-NH₂)-PULL-(Cyts-DOX), privo di acido folico, forma in soluzione due popolazioni (~ 10 nm; ~ 100-140 nm;). Anche in questo caso l'aumento della concentrazione di polimero porta ad una aggregazione del polimero stesso, con formazione di vescicole a dimensioni maggiori. La presenza di due popolazioni, una di grandi ed una di piccole dimensioni, indica che anche ad alte concentrazioni sono presenti singole catene di coniugato anche se la presenza di aggregati diventa dominante. È interessante osservare come le dimensioni dei derivati assemblati non superi i 600 nm, considerato il limite massimo per l'accumulo in masse tumorali.

Ad ogni modo i profili DLS ottenuti col polimero privo di acido folico mostrano sempre la formazione di sistemi vescicolari a dimensioni minori rispetto a quelli del polimero con acido folico. Probabilmente questo è dovuto a fenomeni di aggregazione favoriti dai residui idrofobici di acido folico.

Gli studi di rilascio di doxorubicina da (PEG-AF)- PULL -(Cyst-DOX) e (PEG-NH₂)- PULL-(Cyts-DOXO) sono stati condotti a pH 7.4 e a pH 5.5, e in plasma murino a 37°C per simulare le condizioni in cui il polimero si trova nel sangue (pH 7.4) e negli endosomi (pH 5.5). Entrambi i coniugati sono risultati stabili a pH 7.4, sia in plasma che in tampone fosfato, rilasciando solo il 20% del farmaco in 3 giorni. A pH 5.5 la cinetica di rilascio è decisamente più rapida rispetto al plasma, con un rilascio del 50 % di farmaco nell'arco di 12 ore. Dallo studio della cinetica di rilascio si può concludere che il bioconiugato studiato possiede una stabilità in plasma e a pH 7.4 sufficiente a garantirne l'accumulo nel tumore per effetto EPR, mentre l'analisi a pH 5.5 sembra accreditare l'ipotesi che il profarmaco sia in grado di rilasciare l'agente terapeutico selettivamente nelle cellule, a seguito di idrolisi del legame idrazonico negli endosomi.

L'attività biologica del coniugato è stato studiato *in vitro* su colture cellulari di MCF-7, KB ed HeLa mediante il test colorimetrico MTT. Le linee cellulari sono state scelte in quanto permettono di valutare la capacità del coniugato di discriminare tra cellule che esprimono o meno il recettore per l'acido folico. Le MCF-7 sono infatti cellule di carcinoma mammario umano non esprimenti il recettore, mentre le KB (tumore nasofaringeo) ed HeLa (tumore della cervice uterina) sono cellule umane che sovraesprimono tale recettore. La citotossicità di Doxorubicina e dei bioconiugati (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOXO) e (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOXO) è stata valutata con due protocolli, in uno erano previste 24 o 72 ore di contatto con il farmaco, nell'altro 30 minuti seguiti da una incubazione di 72 ore. Il primo protocollo permette di avere un'idea più completa di quanto avviene a livello cellulare, in quanto l'*uptake* per endocitosi dei polimeri e il conseguente rilascio di farmaco all'interno degli endosomi richiedono tempi più lunghi di quelli richiesti per la semplice diffusione di farmaci a basso peso molecolare (Yoo, HS, 2000). Dai risultati emerge che i bioconiugati hanno valori di IC₅₀ maggiori rispetto al farmaco libero su tutte le linee cellulari in esame. Tuttavia non sono state riscontrate significative differenze tra i profili di tossicità del polimero con l'acido folico e quello privo di molecola direzionante, anche in linee cellulari che sovra esprimono il recettore per il folato, come le KB e le HeLa. Questo dato indica che l'endocitosi non mediata da recettore risulta il principale meccanismo di internalizzazione dei bioconiugati, almeno per tempi di incubazione prolungati (24-72 ore).

Poiché in letteratura è riportato che l'internalizzazione mediata da recettori è un processo che avviene rapidamente, è stato messo a punto un protocollo che prevede un breve tempo di contatto (30 minuti) tra l'agente terapeutico e le cellule, seguito da una incubazione prolungata (72 ore) in terreno completo. In queste condizioni per il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOXO) si sono registrati valori di IC₅₀ inferiori rispetto al polimero privo di molecola direzionante. Questo risultato sembra in accordo con l'ipotesi che la funzionalizzazione del carrier con AF favorisca l'accumulo attraverso un meccanismo attivo di riconoscimento recettoriale e uptake di tipo caveolare mediato dall'acido folico stesso.

Il meccanismo di internalizzazione è stato ulteriormente indagato sulla linea cellulare HeLa, attraverso analisi con citofluorimetro. Lo studio ha confermato che

L'interazione ligando-recettore avviene in breve tempo (5 minuti), mentre il polimero privo di acido folico viene scarsamente internalizzato in così breve tempo. Tuttavia dopo 30 minuti i valori di internalizzazione per il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOXO) sono simili a quelli per il polimero (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOXO).

Allo scopo di indagare diversi meccanismi di azione antitumorale sono stati condotti studi di citotossicità anche su linee cellulari endoteliali umane, HUVEC ed HBMEC, per valutare possibili effetti della doxorubicina e dei bioconiugati sull'angiogenesi.

I saggi di citotossicità sono stati condotti secondo il protocollo che prevede 72 ore di incubazione, e le cellule endoteliali si sono dimostrate particolarmente sensibili sia alla doxorubicina, che ai due bioconiugati, registrando valori di IC₅₀ dell'ordine nanomolare, senza registrare particolari differenze tra farmaco libero e coniugato ai polimeri.

Il potenziale antiangiogenico è stato indagato attraverso uno studio di formazione di capillari su Matrigel con la linea cellulare HUVEC. Si è visto che la doxorubicina e il polimero (PEG-NH₂)-PULL-(Cyst-DOXO) non riducono in modo significativo la formazione di tubuli, mentre il polimero (PEG-AF)-PULL-(Cyst-DOXO) alla concentrazione 1 µM è in grado di diminuire la lunghezza dei capillari del 25% rispetto al controllo trattato con terreno completo.

Infine sono stati condotti studi farmacocinetici sul bioconiugato e sulla doxorubicina non legata, per valutare il comportamento *in vivo* del polimero. La farmacocinetica di doxorubicina è ampiamente riportata in letteratura e presenta due diverse fasi di *clearance*, la prima delle quali prevede la rapida uscita del farmaco dalla circolazione sanguigna per distribuirsi rapidamente ai tessuti, con un'emivita dell'ordine di 5 minuti (Park, J., 2009). Come atteso la macromolecolarizzazione del farmaco ne modifica drasticamente la farmacocinetica, e permette di aumentarne la permanenza in circolo del farmaco. Le curve ottenute mostrano entrambe un andamento bifasico, con una rapida diminuzione della concentrazione plasmatica di farmaco inizialmente e una successiva stabilizzazione, tuttavia l'emivita plasmatica ($t_{1/2\beta}$) del bioconiugato risulta superiore. Questo comportamento è attribuibile all'aumentata stabilità del farmaco dovuta alla coniugazione con il polimero e all'elevato peso molecolare del coniugato che ne previene l'eliminazione attraverso

la via renale, ne limita la diffusione aspecifica attraverso le membrane e ne evita l'*uptake* da parte del sistema reticoloendoteliale (RES). Come conseguenza si hanno un aumento della biodisponibilità del farmaco e una maggior probabilità di direzionamento per effetto EPR.

7.CONCLUSIONI

Lo sviluppo di nuovi *carrier* per il *delivery* di farmaci rappresenta una fase importante per l'ottenimento di nuovi sistemi terapeutici efficienti e selettivi. Tali sistemi consentono, infatti, di migliorare le caratteristiche farmacologiche e chimico-fisiche di questa classe di molecole aumentando la solubilità e stabilità e conferendo nuove proprietà biofarmaceutiche di biodegradabilità e biocompatibilità. Il pullulano si è dimostrato *scaffold* versatile per la realizzazione di promettenti *polymer therapeutics*, sia per l'intrappolamento fisico che per la bioconiugazione chimica del farmaco della struttura supramolecolare.

Il pullulano è stato efficacemente idrofilizzato ed idrofobizzato ottenendo sistemi sovramolecolari in grado di autoassemblare e di dimensioni adeguate per la somministrazione parenterale. I derivati anfifilici (colanico)-(PULL)-(PEG) ottenuti hanno proprietà chimico-fisiche e biofarmaceutiche diverse, in dipendenza dal rapporto tra i componenti idrofilici e idrofobici. Sebbene siano in grado di autoassemblarsi in ambiente acquoso hanno capacità di solubilizzare farmaci, come il paclitaxel e [(ESDT)AuBr₂] in modo diverso così come diversa è risultata la stabilità fisica e chimica del sistema. Per confronto, il derivato dell'oro (III) è stato formulato in complessi di inclusione in ciclodestrine naturali e semisintetiche, valutando i profili di dissoluzione e la stabilità del farmaco. Studi di attività biologica e di farmacocinetica hanno dimostrato che i sistemi ottenuti con i polimeri sono simili a quelli ottenuti con ciclodestrine.

Il *backbone* di pullulano si è dimostrato adatto anche allo sviluppo di profarmaci polimerici per il rilascio controllato della molecola attiva. La doxorubicina è stata coniugata al polimero con un legame idrazonico, che garantisce adeguata stabilità in plasma (pH 7.4), mentre permette un rilascio del farmaco esclusivamente intracellulare, a seguito di idrolisi del legame idrazonico negli endosomi (pH 5.5). La coniugazione dell'acido folico, attraverso uno *spacer* flessibile, permette di ottenere un *targeting* attivo sfruttando un processo di endocitosi mediato da recettore. Il peso molecolare e il volume idrodinamico determinati sono adeguati per sfruttare l'effetto EPR e diminuire la *clearance* renale del farmaco. Gli studi di farmacocinetica hanno dimostrato che la bioconiugazione permette di aumentare l'emivita di doxorubicina a livello plasmatico.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Magid A., Carson K., Harris B., Maryanoff C., Shah R. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *Journal of Organic Chemistry*, **61**: 3849-3862, 1996.
- Ahmad S., Tester R., Corbett A., Karkalas J., Dextran and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) conjugates: synthesis, characterization and enzymatic hydrolysis, *Carbohydrate Research*, **341**:2694-2701, 2006
- Anderson R.G., Kamen B.A., Rothberg K.G., Lacey S.W., Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae, *Science*, **255**: 410-411, 1992
- Antony A.C., Folate receptors. *Annu. Rev. Nutr.*, **16**: 501-521, 1996
- Antony A.C., The biological chemistry of folate receptors, *Blood*, **79**: 2807-2820, 1992
- Attwood D. and Florence A. T. (eds.), *Surfactant Systems*, Chapman & Hall, London, UK, **1983**.
- Bender M.L., Komiyama M., *Cyclodextrin chemistry* Springer-Verlag Berlin, **1978**.
- Bordoni A., Biagi P.G., Hrelia S., The impairment of essential fatty acid metabolism as a key factor in doxorubicin-induced damage in cultured rat cardiomyocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1440**:100-106, 1999

- Bottero F., Tomassetti A., Canevari S., Miotti S., Menard S., Colnaghi M.I., Gene transfection and expression of the ovarian carcinoma marker folate binding protein on NIH/3T3 cells increases cell growth in vitro and in vivo, *Cancer Res.*, **53**: 5791-5796, 1993
- Bouhadir K., Yong Lee., Alsberg E., Damm K., Anderson K., Mooney D., Degradation of partial oxidized alginate and its potential application for tissue engineering, *Biotechnology Progress*, **17**, 945-950, 2001
- Brewster M.E., Estes K.S., Bodor N., An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a useful drug solubilizer in rats and monkeys. *Int. J. Pharm.* **59**: 231-243, 1999.
- Bruneel D., Schacht E., Chemical modification of pullulan: periodate oxidation, *Polymer*, **34**(12):2628-2632, 1993
- Bruneel D., Schacht E., End group modification of Pullulan, *Polymer*, **36**(01):169-172, 2001
- Campbell I.G., Jones T.A., Foulkes W.D., Trowsdale J., Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer, *Cancer Res.*, **51**: 5329-5338, 1991
- Di Stefano G., Lanza M., Kratz F., Merina L., Fiume L., A novel method for coupling doxorubicin to lactosaminated human albumin by an acid sensitive hidrazone bond: sintesi, characterization and preliminary biological properties of the conjugate, *European Journal of Pharmaceutical sciences*, **23**:393-397, 2004
- Duncan R., Connors T.A., Meada H., Drug targeting in cancer therapy: the magic bullet, what next?, *J Drug Target*, **3**:317-319, 1996

- Duncan R., Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. Review, *Nature Publishing Group*, **6**:688-701, Sept.2006
- Duncan R., The dawning era of polymer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**:347-360, 2003
- Eastman A., The Mechanism of Action of Cisplatin: from Adducts to Apoptosis. In *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; pp111-134, 1999.
- Ellman GL, Tissue Sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys*, **82**:70-77, 1959
- Folkman J., The role of angiogenesis in tumor growth, *Semin Cancer Biol.*, **3**:65-71, 1992.
- Fornari F.A., Randolph J.K., Yalowich J.C., Ritke M.K., Gewirtz D.A, Interference by Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast Tumor Cells, *Molecular Pharmacology*, **45**:649–656, 1994
- Francis M. F., Cristea M., Winnik F. M., Polymeric micelles for oral drug delivery: why and how, *Pure Appl. Chem*, **76**: 1321-1335, 2004.
- Fromming K.H., Szejtli J. (1993), *Cyclodextrins in Pharmacy*, vol. 5, Ed. J.E.D. DAVIES, Kluwer Academics Publishers, The Netherlands.
- 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 *Bioconjugate Chem.*, **10**, 289-298, 1999
- Garin-Chesa P., Campbell I., Saigo P.E., Lewis J.L. Jr., Old L.J., Rettig W.J., Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in

- immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein, *Am J Pathol*, **142**: 557-567, 1993
- Gralla R, de Wit R, Herrstedt J, Carides A, Ianus J, Guoguang-Ma J, Evans J, Horgan K., Antiemetic efficacy of the neurokinin-1 antagonist, aprepitant, plus a 5HT3 antagonist and a corticosteroid in patients receiving anthracyclines or cyclophosphamide in addition to high-dose cisplatin: analysis of combined data from two Phase III randomized clinical trials, *Cancer*, **104**: 864–8, 2005
 - Grimm A, Madduri K, Ali A, Hutchinson CR, Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase, *Gene*, **151**:1–10, 1994
 - Gupta M. e Gupta A.K., In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by AOT/N-hexane micellar system, *J Pharm Pharm Sci.*; **7**:38-46, 2004.
 - Habeeb A.F.S.A., “Determination of free amino groups in proteins by trinitro benzensulphonic acid”, *Anal. Biochem.*, **14**:328-336, 1966.
 - Han S.K., Na K., Bae Y.H., Sulfonamide based pH-sensitive polymeric micelles: physicochemical characterization and pH-dependent aggregation, *Colloids Surf. A*, **214**: 49-59, 2003.
 - Higuchi T., Connors K.A., Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **4**:117-212, 1965
 - Hill, B. T., *Anti-Cancer Drugs*, **7**:1-185, 1996.
 - Holm J. Steen, Hansen I., Hoier-Madsen M., Korsæk L., Beckmann H., Josefsen K., Ligand Binding Characteristics of a Glycosylphosphatidyl

Inositol Membrane-Anchored HeLa Cell Folate Receptor Epitope-Related to Human Milk Folate Binding Protein *Bioscience Reports*, **20**: 109-118, 2000.

- Huiru Z., Heindel N.D., Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. *Pharmaceutical Research*, **8**: 400-402,1991.
- Israelachvili, J. N. Intermolecular and Surface Forces, 2nd ed.; Academic: London; pp 366–393,1991
- Jeong Y., Na H., Oh J., Choi K., Song C., Lee H., Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(DL-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan. *International Journal of Pharmaceutics*, **322**: 154-160,2006.
- Johansson S, Goldenberg D, Griffiths G, Wahren B, Hinkula J., Elimination of HIV-1 infection by treatment with a doxorubicin-conjugated anti-envelope antibody, *AIDS*, **20**(15):1911–1915, 2006
- Jung S., Jeong Y., Kim S., Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities, *International Journal of Pharmaceutics*, **254**:109-121, 2003
- Kamen B.A., Capdevila A., Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**:5983-5987, 1986
- Kim J., Kim Y., Kim S., Park J., Choi K., Chung H., Jeong S., Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel. *Journal of controlled Release*, **111**:228-234,2006.
- Kleinman H. K., Martin G.R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*, **15**: 378-386, 2005.

- Kun Naa, Tae Bum Leea, Keun-Hong Parka, Eun-Kyung Shina, Yong-Bok Leeb, Hoo-Kyun Choia S., elf-assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 18:165–173, 2003.
- Kwon G., Naito M., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., and Kataoka K., Micelles based on AB block copolymers of Poly(ethyleneoxide) and Poly(β -benzyl L-aspartate), *Langmuir* , **9**:945-949, 1993.
- Leamon C.P., Low P.S., Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 5572-5576, 1991
- Lee E. S., Na K., Bea Y. H., Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting, *J. Control. Release*, **91**:103-113, 2003
- Lee RJ, Low PS, Delivery of liposome into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis, *J. Biol. Chem.*, **296**:3198-3204, 1994
- Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V., Ferrara N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science*, **246**:1306-1309, 1989.
- Liggins R., Hunter W.L., Burt H., Solid-State Characterization of Paclitaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **86**:1458-1463, 1997
- Loadman PM, Bibby MC, Double JA, Al-Shakhaa WM, Duncan R. Pharmacokinetics of PK1 and Doxorubicin in experimental colon tumor models with differing responses to PK1, *Clin.Cancer.Res.*, **5**:3682-3688, 1999

- Lown JW, Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments, *Pharmacol. Ther.*, **60**(2):185–214, 1993
- Lundberg, A.S., and Weinberg, R. A., *Eur. J. Cancer*, **35**:531-539, 1999.
- Maeda H., Bharate G.Y., Daruwalla J., Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect, *Eur.J. of Pharmaceutics and biopharmaceutics*, **71**:409-419, 2009
- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. of controlled release*, **65**:271-284, 2000
- Meada H., Ueda M., Morinaga T., and Matsumoto T., Conjugation of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives to antitumor protein neocarzinostatin: pronounced improvements in pharmacological, *J. Med. Chem.*, **28**: 455-461, 1985
- Marcon Giordana, Carotti Stefania, Coronello Marcella, Messori Luigi, Mini Enrico, Orioli Pierluigi, Mazzei Teresita, Cinellu Maria Agostina and Minghetti Giovanni Gold(III) Complexes with Bipyridyl Ligands: Solution Chemistry, Cytotoxicity, and DNA Binding Properties. *J. Med. Chem.*, **45**, 1672-1677, 2002.
- Matsumura Y., Maruo K., Kimura M., Yamamoto T., Konno T., Maeda H. Kinin-generating cascade in advanced cancer patients and in vitro study. *Jpn J Cancer Res.* **82**:732-741, 1991
- Matsunaga K. *et al.*, Technetium labeling of dextran incorporating cysteamine as a ligand, *Nuclear Medicine and Biology*, **32**:279-285, 2004

- Meyer O., Papahadjopoulos D., Leroux J.C., Copolymers of Nisopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes *FEBS Lett.* **42**:61-64, 1998
- Miller K. and Satchi-Fainaro R., Polymer Therapeutics, *Wiley encyclopedia of chemical biology*, 1-17, 2008
- Miwa A, Ishibe A, Nakano M, Yamahira T, Itai S., Jinno S, Kawahara H., Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm Res.* **15**:1844-50, 1998.
- Momparler R.L., Karon M., Siegel S.E., Avila F, Effect of Adriamycin on DNA, RNA and Protein Synthesis in Cell-Free Systems and Intact Cells, *Cancer Research*, **36**:2891–2895, 1976
- Moreno J.J., Pryor W.A., Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxyxynitrite, *Chem Res Toxicol.*, **5**:425-431, 1992
- Nishiyama N, Kataoka K., Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology and Therapeutics*, **112**:630-648, 2006.
- [Nogales](#) Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5312-6, 2001
- Nogusa H, Yano T, Kashima N, Yamamoto K, Okuno S, Hamana H., Structure-activity relationships of carboxymethylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates--systematic modification of peptide spacers. *Bioorg Med Chem Lett.* **10**:227-30, 2000.

- Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J., Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem.* **186**: 17-22, 1989
- Okamoto T., Akaike T., Nagano T., Miyajima S., Suga M., Ando M., Ichimori K., Maeda H., Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**:261-274, 1997
- Paulos C. M., Reddy J.A., Leamon C.P., Turk M.J., Low P.S., Ligand Binding and Kinetics of Folate Receptor Recycling in Vivo: Impact on Receptor-Mediated Drug Delivery, *Mol Pharmacol* 66:1406–1414, 2004.
- Park J. et al., PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin, *Nanomedicine:NBM*, :1-9, 2009
- Pigram, W.J.; Fuller, W.; Hamilton, L.D. Stereochemistry of Intercalation: Interaction of Daunomycin with DNA., *Nature New Biology*, **235**:17–19, 1972
- Pitha J., Milecki J., Fales H., Pannell L., Uekama K., () Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *Int J Pharm* **29**: 73-82, 1986.
- Rihova B., Receptor-mediated targeted drug or toxin delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, **29**:273-289, 1998
- Ringsdorf H., Structure and properties of pharmacologically active polymers, *J. Polymer Sci.*, **51**:135-153, 1975
- Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M., Chemistry for peptide and protein pegylation. *Advanced drug delivery Reviews*, **54**:459-476, 2002.

- Ronconi Luca, Giovagnini Lorena, Marzano Christina, Bettio Frazia, Graziani Rodolfo, Pilloni Giuseppe, and Fregona Dolores. Gold Dithiocarbamate Derivatives as Potential Antineoplastic Agents: Design, Spectroscopic Properties, and in Vitro Antitumor Activity. *Inorganic chemistry.*, **44**:1867-1881, 2005
- Robinson M.S., The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis, *Curr Opin Cell Biol.*, **6**: 538-544, 1994
- Salmaso S., Semenzato A., Caliceti P., Hoebeke J., Sonvico F., Dubernet C., Couvreur P., Specific Antitumor Targetable β -Cyclodextrin–Poly(ethylene Glycol)–Folic Acid Drug Delivery Bioconjugate, *Bioconjugate Chem.*, **15**: 997–1004, 2004
- Sandu, J.S., Keating, A. and Hozuni, N., *Crit. Rev Biotechnol.*, **17**:307-326, 1997.
- Schwartz A.L, Receptor cell biology: receptor-mediated endocytosis, *Pediatr. Res.*, **38**:835, 1995
- Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, **219**:983-985, 1983
- Seymour L.W., Miyamoto Y., Maeda H., Brereton M., Strohalm J., Ulbrich K., Duncan R., Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier, *Eur J Cancer*, **31A**:766-770, 1995
- Simunek T., Sterba M., Popelova O., Adamcova M., Hrdina R., Gersl V., Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron, *Pharmacological Reports*, **61**:154-171, 2009

- Skinner S.A., Tutton P.J., O'Brien P.E., Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res.*, **50**:2411-2417, 1991
- Snyder, S.L., Sobocinsky, P.Z., An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.* **64**: 284-288, 1975.
- Sokolsky-Papkov M, Domb AJ, Golenser J, Impact of aldehyde content on amphotericin B-dextran imine conjugate toxicity. *Biomacromolecules.* **7**(5):1529-35, 2006.
- Stoorvogel W., Strous G.J., Geuze H.J., Oorschot V., Schwartz A.L., Late endosomes derive from early endosomes by maturation, *Cell.*, **65**: 417-27. 1991
- Szejtli J., (), Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.*, **98**:1734-1754, 1998.
- Tannock IF, Rotin D., Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation, *Cancer Res* , **49**: 4373-84, 1989.
- Toffoli G., Cernigoi C., Russo A., Gallo A., Bagnoli M., Boiocchi M., Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers, *Int J Cancer*, **74**:193-198, 1997
- Torchiling V.P., *Structure and desing of polymer surfactant-based drug delivery systems*, *J. Control. Release*, **73**:137-172, 2001.
- Torchilin V.P, Trubetskoy V.S., Use of polyoxyethylene-lipid conjugates as long-circulating carriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **16**: 331-320, 1995.

- Torchiling V.P., Structure and desing of polymer surfactant-based drug delivery systems, *J. Control. Release*, **73**:137-172, 2001
- Venkatraman S.S., Jie P., Min F., Freddy B.Y, Leong-Huat G., Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier., *Int J Pharm.* 298:219-32, 2005
- Veronese, F.M., Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* **22**, 405-417, 2001.
- Wang X., Shen F., Freisheim J.H., Gentry L.E., Ratnam M., Differential stereospecificities and affinities of folate receptor isoforms for folate compounds and antifolates, *Biochem Pharmacol.* **44**:1898-1901, 1992
- 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**:3396-401, 1992
- Willner D., Trail P.A., Hofstead S.J., King H.D., Lasch S.J., Braslawsky G.R., Greenfield R.S., Kaneko T., Firestone R.A., (6-Maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin-a new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin, *Bioconjugate Chem.*, **4**:521–527, 1993
- Wu J., Akaike T., Maeda H., Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res.* **58**:159-165, 1998
- Wu J., Li H., Kang L, Li L, Wang W., Shan B., Activated matrix metalloproteinase-2. A potential marker of prognosis for epithelial ovarian cancer, *Gynecol Oncol.*, **84**:126-134, 2002

- Yang L., Hofer K. Reductive amination of nitroimidazole aldehyde with diamines using sodium triacetoxyborohydride. *Tetrahedron Letters*, **37**: 6081-6084, 1996.
- Yoo HS, Lee KH, Oh JE, Park TG, In vitro and in vivo antitumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates, *J Controlled Release*, **68**:419-431, 2000
- Zang Y., Hess E.V.; Pryhuber, K.G.; Dorsey, J.G.; Tepperman, K.; Elder R.C., Gold binding in red blood cells. *Inorg. Chim. Acta* **1995**, 229, 2
- Zhang C, Qu G, Sun Y, Wu X, Yao Z, Guo Q, Ding Q, Yuan S, Shen Z, Ping Q, Zhou H., Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of N-octyl-O-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel. *Biomaterials*. **29**:1233-41, 2007