

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

**DOTTORATO IN MEDICINA
SPERIMENTALE**

XXXI CICLO

Coordinatore: Prof. Paolo Dionigi

**SVILUPPO DI PIATTAFORME
NANOPARTICELLARI PER LA
DIAGNOSI E IL TRATTAMENTO
DI TUMORI**

Tutor Interno

Prof. Lorenzo Cobianchi

Tutor Esterno

Prof. Paolo Giunchedi

Tesi di dottorato di

Antonella Obinu

a.a. 2017-2018

CONTENUTI

Abstract	1
Introduzione	4
Capitolo I: Metastasi linfonodali: importanza dell'identificazione e strategie per il trattamento	24
Capitolo II: Nanoparticelle per la diagnosi e il trattamento di metastasi linfatiche: una visione dal punto di vista della via di somministrazione	46
Capitolo III: Incremento della stabilità chimica del Verde Indocianina con nanoparticelle di poli (etil 2-cianoacrilato). Una strategia per la diagnosi e il trattamento di tumori	72
Capitolo IV: Sviluppo di nanoparticelle solide lipidiche contenenti Genisteina come agente antitumorale per un target linfatico intestinale	106
Capitolo V: Utilizzo di microsfele come "drug delivery systems"	152
Conclusioni Generali	160

Abstract

Negli ultimi anni lo sviluppo e la somministrazione di farmaci tal quali si sono rivelati essere insufficienti per l'adeguato trattamento di numerose patologie. Molte molecole che hanno mostrato promettenti risultati *in vitro*, si sono poi rivelate fallimentari nei test *in vivo*. Sono molti i fattori responsabili dell'inefficienza terapeutica dei farmaci.

Le caratteristiche chimico-fisiche della molecola giocano un ruolo molto importante poiché da esse dipende la scarsa solubilità del farmaco in acqua, che porta all'esclusione della somministrazione endovenosa di soluzioni acquose e a una ridotta biodisponibilità dopo somministrazione orale. Attraverso la circolazione sistemica, i farmaci raggiungono il loro bersaglio, ma possono essere distribuiti anche in altri tessuti e da ciò deriva la tossicità della molecola e la comparsa degli effetti avversi. Come conseguenza, una concentrazione insufficiente di farmaco potrebbe raggiungere il sito d'azione con diminuzione dell'efficacia terapeutica. Inoltre un'ampia oscillazione dei livelli plasmatici, dovuta a scarso assorbimento o eliminazione possono essere responsabili del fallimento terapeutico.

Una strategia per la risoluzione di questi problemi è data dallo sviluppo di opportuni sistemi per il trasporto dei farmaci, i cosiddetti "drug delivery systems". Un vantaggio nell'uso di questi sistemi risiede nella possibilità di veicolare l'agente terapeutico direttamente al sito bersaglio (cellule/tessuti), evitando il contatto potenzialmente dannoso tra il farmaco e i tessuti non interessati. I "drug delivery systems" permettono inoltre di migliorare l'assorbimento e la stabilità delle molecole e quindi la loro biodisponibilità. Per il trasporto di farmaci sono impiegati vari sistemi come microparticelle, nanoparticelle, liposomi e dendrimeri. Quello del "drug delivery" è un settore sempre più in crescita cui si fa riferimento per migliorare ancora di più l'efficacia degli agenti terapeutici.

L'obiettivo di questo lavoro di ricerca è stato lo sviluppo di "drug delivery systems", principalmente di tipo nanoparticellare, destinati al trattamento e alla diagnosi dei tumori.

Nei primi due capitoli della tesi è stata illustrata l'importanza sempre più rilevante delle nanoparticelle nella visualizzazione e nel trattamento delle metastasi linfatiche.

Nel primo capitolo è stato discusso il ruolo che il sistema linfatico svolge nel processo di diffusione e disseminazione delle metastasi tumorali e la rilevanza dell'utilizzo della via linfatica per la veicolazione di farmaci chemioterapici e/o di agenti diagnostici per il trattamento e l'identificazione di queste lesioni maligne. Sono stati resi evidenti gli svantaggi e le problematiche legati al trasporto linfatico delle sostanze. In particolare, è stato mostrato il grande potenziale che le nanoparticelle hanno come sistemi di "drug delivery" per la veicolazione linfatica, fornendo una visione completa delle principali caratteristiche chimico-fisiche che influenzano la captazione di queste particelle da parte del sistema linfatico.

Nel secondo capitolo è stata fatta una classificazione delle varie tipologie di nanoparticelle per la diagnosi e il trattamento delle metastasi linfatiche, sulla base della via di somministrazione utilizzata. In particolare sono stati discussi la preparazione, la caratterizzazione *in vitro*, le applicazioni *in vivo* e i risultati clinici ottenuti con tali sistemi.

Il terzo capitolo ha riguardato la preparazione di nanoparticelle polimeriche come possibili agenti per la cura dei tumori e capaci di veicolare sostanze per la diagnosi di cellule cancerogene, come il Verde Indocianina. Le nanoparticelle sono state preparate utilizzando le condizioni ottimali individuate durante lo studio. In seguito sono state caratterizzate per identificarne le proprietà chimico-fisiche. L'attività antitumorale delle particelle è stata confermata valutando la citotossicità dei sistemi nei confronti di modelli di sferoidi tumorali 3D. Mentre, la capacità di veicolare sostanze utili per la diagnosi delle cellule tumorali, è stata mostrata attraverso degli studi di "uptake" cellulare.

Nel quarto capitolo è descritto lo sviluppo di nanoparticelle di tipo lipidico come "drug delivery systems" per migliorare la stabilità e la biodisponibilità orale di farmaci antitumorali il cui uso è ostacolato da alcuni svantaggi come la ridotta solubilità in acqua e la degradazione. I numerosi studi effettuati hanno permesso di ottenere delle nanoparticelle che proteggono i farmaci dalla degradazione, ne aumentano la solubilità e hanno caratteristiche idonee per subire un assorbimento attraverso i vasi linfatici associati all'intestino. In questo modo gli agenti terapeutici possono raggiungere

direttamente la circolazione sanguigna senza subire metabolismo di primo passaggio nel fegato.

Nel quinto capitolo è stato preso in considerazione un altro tipo di “drug delivery system”, le microparticelle. Nonostante quella che stiamo vivendo è definita come “l’era delle nanoparticelle”, i sistemi microparticellari hanno ancora importanza nel trasporto dei farmaci. Nella prima parte di questo capitolo è stato descritto l’uso delle microparticelle per la somministrazione di farmaci nel segmento posteriore dell’occhio, una via che consente un accesso diretto al bulbo oculare. Particolare attenzione è stata data ai polimeri utilizzati per la preparazione di questi sistemi. Nella seconda parte del capitolo è riportata la veicolazione dell’idrossipropil- β ciclodestrina in microsferule costituite da polimeri mucoadesivi, attraverso una somministrazione nasale. Questa via, tramite il bulbo olfattorio, consente l’accesso diretto al cervello. L’idrossipropil- β ciclodestrina, sebbene classificata come eccipiente, ha infatti un potenziale come agente neuroprotettivo.

1 Introduzione

1.1 Nanotecnologia e nanomedicina

Le nanoscienze rappresentano un punto d'incontro per differenti discipline che vanno dalla biologia molecolare alla chimica dei materiali per passare attraverso la chimica sopramolecolare e la fisica quantistica e possono essere considerate un'importante area di applicazione nel mondo della ricerca. Inizialmente fu il fisico Richard Feynman a formulare il concetto di nanoscienze nel suo seminario "There is plenty of room at the bottom" nel 1959, nel quale sono stati forniti dei nuovi strumenti per lo studio di oggetti con dimensioni comprese (tipicamente ma non esclusivamente) tra 1 e 100 nm [1, 2].

Nel 1986 è stato Eric Drexler a coniare il termine nanotecnologia definendola "una tecnologia a livello molecolare che ci potrà permettere di porre ogni atomo dove vogliamo che esso stia; chiamiamo questa capacità nanotecnologia perché funziona sulla scala del nanometro, ossia un milionesimo di metro" [3]. Una definizione di nanotecnologia accettata a livello internazionale è quella fornita dalla "National Nanotechnology Initiative" statunitense, secondo la quale "la nanotecnologia è la comprensione e il controllo della materia di dimensioni che vanno da circa 1 a 100 nm" [4]. Le nanotecnologie sono pertanto un insieme di tecnologie che, basandosi su un approccio multidisciplinare, permettono lo sviluppo e l'utilizzo di dispositivi, sistemi e materiali aventi dimensioni su scala nanometrica. Recentemente la nanotecnologia ha ricevuto notevole attenzione in ambito medico a causa della facilità con cui i nanosistemi interagiscono con il corpo umano a livello molecolare e alla comprensione dei processi biologici che avvengono a livello di nanoscala [5].

La nanomedicina è la suddivisione della nanotecnologia applicata alla medicina. Essa si occupa di tutte le tecnologie e le applicazioni caratterizzate da un utilizzo medico nell'ordine di grandezza dei nanometri. Negli ultimi anni la "European Science Foundation" (FSE) ha eseguito un esame approfondito della nanomedicina. In particolare, il comitato etico permanente della FSE ha fornito una definizione di nanomedicina secondo la quale essa è "la scienza e la tecnologia per diagnosticare, trattare e prevenire malattie e lesioni traumatiche, per alleviare il dolore e per preservare e migliorare la salute umana, utilizzando strumenti molecolari e la conoscenza a livello

molecolare del corpo umano”. Inoltre, sono state individuate le cinque principali discipline della nanomedicina: strumenti analitici, “nanoimaging”, nanomateriali e nanodispositivi, nuovi sistemi terapeutici e di somministrazione di farmaci e problemi di tipo clinico, normativo e tossicologico [6]. Sono numerose le applicazioni della nanomedicina nel settore biomedico tra cui lo sviluppo di nanomateriali, l’utilizzo di biosensori nanotecnologici nella diagnostica e la formulazione di nuovi “drug delivery systems” per la somministrazione di farmaci. Ma è soprattutto in ambito farmaceutico che la nanomedicina sta assumendo un’importanza sempre maggiore. Attraverso di essa si vogliono ottenere dei nuovi metodi per la produzione di sistemi che consentano un rilascio controllato di farmaci e che permettano il raggiungimento di uno specifico sito d’azione, evitando il contatto potenzialmente nocivo tra il farmaco e organi non interessati. Nuove terapie anticancro basate sulla nanomedicina sono state sviluppate con l’obiettivo di migliorare l’efficienza e la specificità di sistemi per il rilascio di farmaci, raggiungendo così la massima efficacia con effetti collaterali minimi [7]. Le ridotte dimensioni dei nanosistemi possono influenzare le proprietà dei materiali; questo è principalmente dovuto all’incremento dell’area superficiale esposta al diminuire delle dimensioni delle particelle. Inoltre, si ha anche un cambiamento nella disposizione degli atomi sulla superficie, il quale può portare al conferimento di nuove proprietà ottiche, elettroniche, termiche e magnetiche che a loro volta influenzano le interazioni biologiche. Ad esempio, le dimensioni e la carica superficiale delle particelle possono influenzare direttamente l’assorbimento cellulare [8].

1.2 Le nanoparticelle

Le nanoparticelle (NPs) sono definite come dispersioni particolate o particelle solide di dimensioni dell’ordine dei nanometri, generalmente comprese tra 10 e 1000 nm [9]. Esistono varie tipologie di NPs, ognuna delle quali presenta determinate caratteristiche in base alla loro diversa natura (figura 1). Le NPs hanno forma, dimensioni e struttura differenti. Esse possono avere forma sferica, filamentosa o tubulare oppure assumere forma irregolare ed essere costituite da vari materiali. Inoltre, possono essere cristalline o amorfe ed esistere allo stato disperso o in forma fusa, agglomerata e aggregata, mentre la superficie può essere uniforme o irregolare [10, 11]. Una NP può essere zero-

dimensionale (0D) quando lunghezza, larghezza e altezza sono fissate in un unico punto (nano dots), unidimensionale (1D) se possiede un solo parametro (grafene), bidimensionale (2D) se ha lunghezza e larghezza (nanotubi di carbonio) o tridimensionale se tutti i parametri quali lunghezza, larghezza e altezza sono presenti (NPs d'oro) [12, 13].

Negli ultimi decenni c'è stato un notevole interesse nello sviluppo delle NPs come dispositivi di “drug delivery”, in quanto possono essere utilizzate nel rilascio controllato dei farmaci, come trasportatori di DNA nella terapia genica, per indirizzare sostanze attive verso particolari organi/tessuti e per la loro capacità di somministrare proteine, peptidi e geni attraverso la via orale [14]. Le NPs sono preparate con materiali biocompatibili e biodegradabili quali polimeri, sia naturali (gelatina, albumina) che sintetici (polilattidi, policianoacrilati), o lipidi solidi, ma anche con materiali inorganici. Nel corpo umano, il farmaco caricato in questi sistemi viene poi rilasciato dalla matrice per diffusione, rigonfiamento, erosione o degradazione [15].

I sistemi nanoparticellari presentano proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche, se confrontate con le corrispettive particelle di dimensioni superiori. Questo è dovuto a un'area superficiale relativamente più grande rispetto al volume, a una maggiore reattività o stabilità in un processo chimico e a maggiore resistenza meccanica [12]. Queste proprietà delle NPs hanno portato ad un loro utilizzo in numerose applicazioni. Inoltre, grazie alla possibilità di funzionalizzare la superficie o modificare il core di questi sistemi, tali proprietà possono essere modulate per applicazioni multifunzionali. Ad esempio, in medicina, le NPs hanno un ruolo sempre più rilevante in numerosi ambiti quali la chemioterapia, la radioterapia, il “bioimaging”, la termoterapia, la terapia fotodinamica e antigenica.

Le NPs possono essere somministrate attraverso tutte le classiche vie di somministrazione e permettono di migliorare la biodisponibilità e l'efficacia del farmaco trasportato incrementandone la solubilità in acqua. Grazie alla loro particolare struttura, esse sono in grado di proteggere il farmaco dalla degradazione enzimatica aumentandone il tempo di permanenza nell'organismo, di modificare la distribuzione nei tessuti aumentando la penetrazione intracellulare e di veicolare i farmaci verso uno specifico sito d'azione. Ciò si traduce in una riduzione della quantità di farmaco

necessaria e in una maggiore protezione dei tessuti non bersaglio da gravi effetti collaterali [16]. Le dimensioni delle NPs hanno un ruolo fondamentale per garantire la loro diffusione attraverso le barriere biologiche. In uno studio pubblicato da Sonavane et al., sono state preparate NPs d'oro di differenti dimensioni (15, 50, 100 e 200 nm) ed è stata valutata la loro biodistribuzione in organi e tessuti. I risultati hanno dimostrato che le NPs con diametro di 15 nm avevano una maggiore distribuzione nei tessuti rispetto a quelle con dimensioni maggiori [17]. In altri studi è stato dimostrato che, in seguito ad una somministrazione mucosale, le possibilità che le NPs riescano ad attraversare la mucosa stessa sono maggiori quanto più sono piccole le dimensioni delle particelle [18, 19].

In letteratura sono riportati numerosi lavori riguardanti l'utilizzo di NPs sia come sistemi per il rilascio di farmaci [20, 21] sia come agenti per svariate applicazioni quali sensori chimici e biologici [22], sensori per i gas [23] e agenti catturanti CO₂ [24].

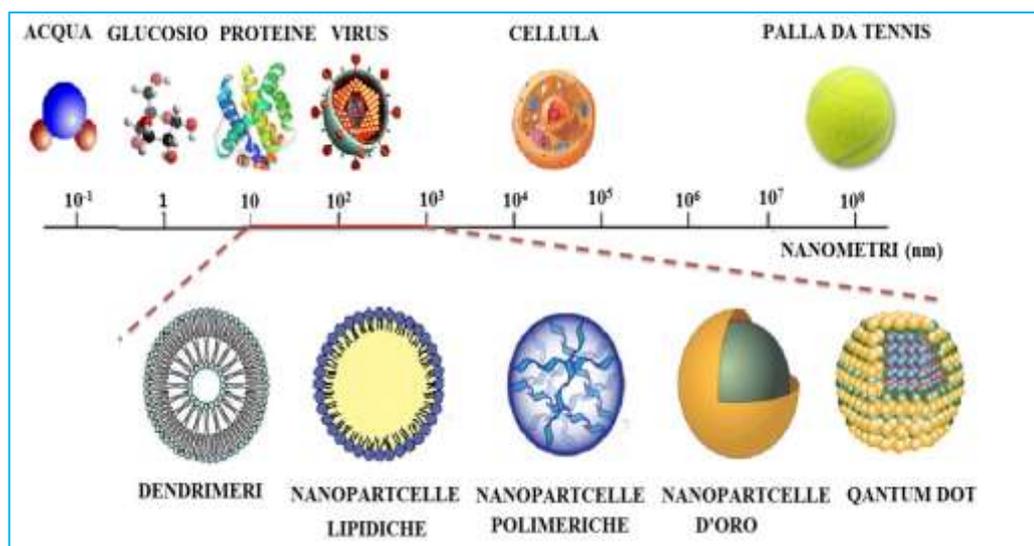


Figura 1. Differenti tipologie di NPs.

1.2.1 Le NPs polimeriche

L'introduzione delle NPs polimeriche in ambito farmaceutico risale alla seconda metà degli anni settanta e negli ultimi decenni esse sono state protagoniste di un notevole sviluppo come sistemi per la veicolazione dei farmaci.

Le NPs polimeriche sono costituite da una matrice polimerica solida e possono incorporare farmaci idrofili o idrofobi e macromolecole come acidi nucleici e proteine

[25]. Il farmaco può essere disciolto, intrappolato, incapsulato o legato alla matrice polimerica e, a seconda del metodo di preparazione, si possono ottenere delle nanosfere o delle nanocapsule. Le nanosfere sono dei sistemi matriciali in cui il farmaco è fisicamente e uniformemente disperso, invece le nanocapsule, sono delle vescicole in cui il principio attivo si trova in una cavità delimitata da una membrana polimerica [26, 27]. I meccanismi che regolano il rilascio del farmaco incorporato nella matrice polimerica sono principalmente due: (a) erosione della superficie delle NPs e diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica; (b) idratazione del polimero e conseguente diffusione del farmaco.

I sistemi nanoparticellari polimerici possono essere ottenuti da polimeri naturali o sintetici. A differenza di altri materiali, i polimeri hanno la migliore combinazione di caratteristiche: sono stabili, consentono di caricare molte sostanze farmaceutiche, possono essere facilmente modificati per poter “esporre” differenti ligandi superficiali, permettono di controllare la cinetica di rilascio del farmaco e inoltre non sono tossici per l’uomo [28]. Il polimero, generalmente biocompatibile, viene scelto in base alle sue caratteristiche chimico-fisiche, le quali devono essere adeguate sia per il farmaco da incapsulare che per le proprietà dell’emulsione, attraverso la quale, generalmente, le NPs vengono preparate. Tra i polimeri maggiormente utilizzati vi sono alcuni poliesteri idrolizzabili e biodegradabili quali il poli(D,L)-lattide (PLA), il poli(glicolide) (PLG) ed i loro copolimeri poli(D,L)-lattide-co-glicolide (PLGA). Anche il glicole polietilenico (PEG) e i policianoacrilati vengono ampiamente utilizzati. Le NPs polimeriche possono essere costituite anche da polisaccaridi come le ciclodestrine, il chitosano e i destrani [29].

Le NPs polimeriche hanno molti vantaggi poiché proteggono i farmaci dalla degradazione e ne favoriscono l’interazione con l’ambiente biologico, incrementano l’assorbimento tissutale, la biodisponibilità, il tempo di ritenzione e migliorano la penetrazione intracellulare. In questo modo l’efficacia, la specificità, la tollerabilità e l’indice terapeutico dei farmaci sono aumentati [30].

L’utilizzo di questi sistemi consente inoltre di ridurre gli effetti collaterali, sia per la loro capacità di veicolare i farmaci selettivamente verso tessuti selezionati, grazie all’inserimento sulla superficie di specifici ligandi, sia per la possibilità di rilasciare la

sostanza terapeutica direttamente all'interno delle cellule, dalle quali è captata mediante endocitosi. L'inserimento di ligandi specifici sulla superficie nanoparticellare ha rappresentato un'importante area di ricerca e le NPs polimeriche hanno caratteristiche uniche per la loro capacità di essere funzionalizzate prima della formazione delle particelle stesse [31]. La capacità delle NPs di raggiungere il bersaglio desiderato dipende da alcuni parametri come le dimensioni, la carica superficiale, le modifiche introdotte sulla superficie e l'idrofobia. Le ridotte dimensioni sono fondamentali per le interazioni con le membrane cellulari e per l'attraversamento delle barriere biologiche. Le dimensioni necessarie per attraversare le barriere biologiche dipendono dal tessuto, dal sito bersaglio e dalla circolazione [32]. Dalla carica superficiale dipenderà l'adesione delle NPs alle cellule e l'interazione con cariche opposte presenti nelle membrane cellulari. Affinché il farmaco possa raggiungere il suo bersaglio, è necessaria la permanenza dei sistemi nanoparticellari nel circolo sistemico. Tuttavia le convenzionali NPs con superfici idrofobe vengono facilmente opsonizzate ed eliminate dai macrofagi del sistema fagocitario mononucleare. È possibile aumentare il tempo di circolazione e la permanenza nel sangue mediante un rivestimento superficiale con polimeri idrofili i quali inibiscono l'interazione con le proteine plasmatiche [33]. L'efficacia delle NPs polimeriche *in vivo* è inoltre influenzata dalle caratteristiche morfologiche, dalla chimica superficiale e dal peso molecolare. La presenza di modifiche superficiali crea una barriera sterica attorno alle particelle con effetto protettivo nei confronti dei macrofagi circolanti e miglioramento del processo di permeazione. Il meccanismo di rilascio dei farmaci può essere modulato dal peso molecolare del polimero utilizzato. Maggiore è il peso molecolare del polimero e più lento sarà il rilascio [34]. Una progettazione accurata delle NPs, tenendo in considerazione tutti i parametri precedentemente riportati, può facilitare il raggiungimento dell'obiettivo stabilito.

1.2.2 I policianoacrilati

I policianoacrilati sono una famiglia di polimeri ampiamente utilizzati nella biomedicina per le loro molteplici applicazioni, che vanno dall'uso come materiali embolizzanti e colle chirurgiche a quello come adesivi tissutali per ferite della pelle [35]. Essi hanno ricevuto particolare attenzione per la forte reattività dei corrispondenti

monomeri (cianoacrilati), i quali polimerizzano facilmente in numerosi mezzi tra cui l'acqua. I cianoacrilati sono stati sintetizzati per la prima volta da Ardis nel 1949 e nel 1959 Coover et al. ne hanno scoperto le proprietà adesive e ipotizzato un loro uso come collanti [36].

I monomeri cianoacrilici si presentano generalmente come liquidi trasparenti a bassa viscosità, difficili da maneggiare per la loro elevata reattività dovuta all'effetto elettron-attrattore del gruppo estereo e del gruppo nitrile (figura 2) che rendono il doppio legame adatto all'attacco da parte di nucleofili anche deboli [37].

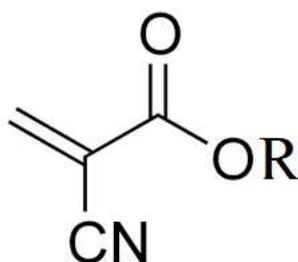


Figura 2. Struttura chimica dei cianoacrilati.

I monomeri tendono a polimerizzare rapidamente in presenza di umidità o di tracce di composti leggermente basici come il sangue. I cianoacrilati polimerizzano seguendo due vie, la polimerizzazione radicalica e quella anionica, ma quest'ultima ha ricevuto maggiore attenzione sia per la facilità con cui il meccanismo prende avvio, che per l'elevato tasso di polimerizzazione. La presenza di un nucleofilo rende molto negativi i gruppi nitrile ed estereo, causando la polarizzazione del doppio legame e rendendo il monomero adatto all'attacco da parte del nucleofilo stesso. La polimerizzazione anionica si distingue in due fasi principali: (a) la reazione d'iniziazione nella quale si ha l'attacco da parte del nucleofilo al monomero, con conseguente formazione di un carbanione sullo stesso; (b) la reazione di propagazione durante la quale il carbanione formatosi sul monomero prosegue la reazione con conseguente formazione della catena polimerica [38].

Grazie alle eccellenti caratteristiche adesive, i policianoacrilati costituiscono oggi una valida alternativa ai dispositivi di sutura classici. Gli adesivi basati su policianoacrilati sono diventati molto popolari in ambito medico per suturare i tessuti, come agenti emostatici, nella guarigione delle ferite e per sigillare le fistole. Sono inoltre utilizzati

negli ambulatori di microchirurgia per chiudere le perforazioni corneali. L'azione adesiva di questi materiali è dovuta principalmente a due meccanismi indipendenti: la formazione di legami covalenti con i gruppi funzionali delle proteine e la penetrazione dell'adesivo nelle fenditure dei tessuti [39].

A oggi, i policianoacrilati vengono ampiamente utilizzati per la veicolazione di numerosi farmaci e importanti risultati sono stati ottenuti nel loro uso come substrati polimerici per la realizzazione di sistemi nanoparticellari. Questo è dovuto ad importanti caratteristiche come biodegradabilità, elevata biocompatibilità e permeabilità [40]. In effetti, le NPs di policianoacrilati hanno trovato una vasta gamma di applicazioni come sistemi per la veicolazione di farmaci sia con obiettivi che con vie di somministrazione differenti [35]. In particolare, l'uso di queste NPs ha portato a rilevanti risultati terapeutici nel trattamento di tumori su numerose linee cellulari. È stato proposto che l'effetto antitumorale sia dovuto alla combinazione di vari fattori: (a) tossicità del farmaco veicolato dalle NPs; (b) tossicità indotta da elevate concentrazioni di prodotti di degradazione del polimero a livello della membrana cellulare, che causano inibizione della crescita o morte cellulare; (c) riduzione della resistenza alla chemioterapia dovuta sia all'assorbimento sulla superficie cellulare delle particelle, che alla formazione di coppie ioniche farmaco-polimero capaci di attraversare le membrane cellulari senza essere riconosciute dalla glicoproteina-P [41].

1.2.3 Le NPs solide lipidiche

Le NPs lipidiche comprendono le NPs solide lipidiche (SLN) e i "carrier" lipidici nanostrutturati (NLC). Fin dai primi anni '90 le SLN sono state identificate come una valida alternativa ai "carrier" colloidali quali liposomi, microemulsioni, nanoemulsioni e nanocapsule. Sia le SLN sia i NLC presentano molti vantaggi rispetto agli altri sistemi colloidali, inclusi il rilascio controllato, la maggiore stabilità chimica dei farmaci veicolati e la possibilità di caricare farmaci lipofili in dosi superiori.

Le SLN costituiscono una forma farmaceutica alternativa alle NPs polimeriche da cui derivano. Esse sono sistemi colloidali con un diametro medio compreso tra 10 e 1000 nm; sono costituite da una matrice lipidica solida dispersa in una soluzione acquosa stabilizzata da un tensioattivo. I lipidi comunemente utilizzati per la preparazione delle SLN sono acidi grassi, cere, monogliceridi, digliceridi e trigliceridi; tra i tensioattivi più

utilizzati vi sono il Pluronic e il Tween 80. Le SLN combinano diversi vantaggi: (a) utilizzo di lipidi ben tollerati dall'organismo e ridotta tossicità cellulare e sistemica; (b) protezione del principio attivo dalla degradazione chimica ed enzimatica; (c) ottenimento di un rilascio prolungato del farmaco [42].

All'interno di questi sistemi il farmaco può essere disciolto, disperso o racchiuso nella matrice lipidica, la quale consente di modularne la velocità e il profilo di rilascio. Essendo costituite di un nucleo rigido formato da lipidi solidi a temperatura ambiente, le SLN possono garantire la stabilità e il rilascio controllato e mirato dei farmaci. Sulla base delle loro proprietà chimiche, le molecole di farmaco tendono a distribuirsi diversamente nelle SLN: i farmaci lipofili, per la loro elevata miscibilità nella matrice lipidica si disperdono bene, mentre i farmaci idrofili sono termodinamicamente immiscibili e si distribuiscono fuori dalla matrice lipidica.

Inizialmente, le SNL sono state formulate esclusivamente per una applicazione topica cutanea [43], successivamente anche le somministrazioni parenterale, oculare e orale sono state studiate. In particolare, la somministrazione orale è stata approfondita in quanto le piccole dimensioni di queste formulazioni garantiscono un efficiente assorbimento intestinale dei farmaci [44]. Le SLN rappresentano inoltre una valida strategia formulativa per l'incorporazione di farmaci caratterizzati da una scarsa solubilità in acqua e conseguente bassa biodisponibilità orale, o da un ampio metabolismo di primo passaggio a livello epatico [45]. Queste particelle, in seguito alla veicolazione di opportuni vaccini, possono svolgere una potenziale funzione antigenica, in quanto vengono facilmente fagocitate dai macrofagi presenti all'interno delle placche di Peyer [46].

Le tecniche più usate per la preparazione delle SLN sono l'omogeneizzazione a caldo e l'omogeneizzazione a freddo. In entrambe le tecniche, il farmaco viene solubilizzato o disperso all'interno del lipide precedentemente fuso. Nell'omogeneizzazione a caldo il lipide è disperso nella fase acquosa anch'essa calda e contenente il surfactante, così da ottenere una pre-emulsione olio in acqua (O/A). Nell'omogeneizzazione a freddo invece il lipide, in seguito alla fusione e all'incorporazione del farmaco, è fatto raffreddare e versato all'interno della soluzione acquosa sotto agitazione magnetica. Durante questa fase il lipide tende a precipitare sotto forma di microparticelle che sono sospese

all'interno della soluzione acquosa fredda contenente il surfactante. La sospensione ottenuta viene quindi omogeneizzata a temperatura ambiente o inferiore per ottenere le SLN. Altre tecniche di preparazione comprendono l'omogeneizzazione ad alto stress di taglio, l'emulsificazione e successiva evaporazione del solvente e la dispersione mediante ultrasuoni, microemulsioni e doppia emulsione [47]. È possibile inoltre ridurre la biotossicità di tali sistemi utilizzando metodi di preparazione che non richiedono solventi, come ad esempio l'omogeneizzazione ad alta pressione.

1.2.4 Compritol ATO 888

Il Compritol è una miscela lipidica di origine vegetale costituita da mono-, di- e trigliceridi dell'acido bebenico [48]. È usato sia per stabilizzare e strutturare le emulsioni, aumentandone la viscosità e la stabilità al calore, che per formulare gel anidri dalla "texture" soffice o per altre applicazioni in campo chimico e farmaceutico. Esso ha proprietà leganti e lubrificanti che lo rendono un valido agente compattante per le formulazioni in polvere, è perfettamente compatibile con qualsiasi tipo di olio e consente di ottenere gel anidri ultra morbidi, di ispessire la fase grassa di un'emulsione e di regolare la consistenza degli oli.

Il Compritol è caratterizzato da un punto di fusione relativamente alto e da una struttura specifica che gli conferiscono numerosi vantaggi tra cui l'aumento della viscosità e della stabilità delle emulsioni alla temperatura e il miglioramento della consistenza e della morbidezza delle creme [49]. In campo farmaceutico il Compritol può essere usato sia come lubrificante sia come eccipiente all'interno di forme farmaceutiche a rilascio controllato. Paliwal et al. hanno riportato come questa miscela lipidica migliora la biodisponibilità orale del metotrexato dopo somministrazione duodenale, rispetto ad altre matrici lipidiche [50].

1.3 Veicolazione mirata di farmaci (drug targeting) ai tumori.

I tumori possono essere classificati in due grossi gruppi, benigni e maligni. I tumori benigni sono caratterizzati da alcune cellule che si sviluppano eccessivamente dando vita a delle masse che possono assumere anche dimensioni considerevoli. Queste masse rimangono però ben delimitate e possono essere rimosse chirurgicamente. I tumori maligni hanno invece la capacità di migrare dall'organo di appartenenza e di andare a

invadere i tessuti vicini. Nel caso in cui le cellule tumorali raggiungano degli organi vitali, la patologia può essere fatale. Non sempre è possibile rimuovere questa tipologia di tumori con la chirurgia, e in alcuni casi si può avere la ricomparsa della malattia anche in seguito alla rimozione del tumore stesso [51].

I metodi terapeutici convenzionali comprendono la chemioterapia e la radioterapia. La chemioterapia consiste nella somministrazione di agenti anti-neoplastici i quali uccidono indiscriminatamente sia le cellule tumorali che quelle sane, pertanto essa può non essere specifica. Di conseguenza si hanno delle basse concentrazioni di farmaco a livello tumorale (inefficacia) e la comparsa di numerosi effetti collaterali (tossicità). I principali effetti collaterali provocati dai farmaci chemioterapici comprendono ulcere gastriche e sanguinamento, anemia, alopecia e distruzione di cellule rigenerate di polmoni e fegato. Nel caso della radioterapia, la radiazione viene indirizzata selettivamente nel sito tumorale; in questo modo viene danneggiato direttamente il DNA delle cellule tumorali. Anche in questo caso però, l'esposizione alla radiazione può interessare anche alcuni tessuti non cancerogeni [52].

Nella somministrazione di agenti terapeutici *in vivo* è necessario prendere in considerazione anche i seguenti problemi: (a) la resistenza ai farmaci a livello tumorale dovuta alle barriere fisiologiche; (b) la resistenza ai chemioterapici a livello cellulare, (c) la biodistribuzione, la biotrasformazione e la clearance degli agenti anti-neoplastici nell'organismo.

Oggi, una delle maggiori sfide della medicina è lo sviluppo di terapie antitumorali efficaci, basate su nuove strategie per veicolare i chemioterapici. Queste tecniche dovrebbero consentire l'incremento della concentrazione del farmaco nel sito tumorale, aumentandone l'efficacia anticancro, e la contemporanea riduzione degli effetti avversi [53]. Il "drug targeting", definito come la capacità di trasportare in modo selettivo e quantitativo un farmaco nel sito d'azione, indipendentemente dal compartimento e dal metodo di somministrazione, permette di raggiungere questi obiettivi.

Una strategia da adottare potrebbe essere quella di associare i chemioterapici con nanosistemi colloidali, con lo scopo di superare la resistenza ai farmaci e di aumentare la selettività degli agenti terapeutici nei confronti delle cellule cancerogene [33]. La

chemioterapia basata sulle nanotecnologie può inoltre essere adattata per fornire una maggiore quantità di farmaco ai tessuti bersaglio, modificandone la biodistribuzione [54]. In campo oncologico gli effetti della nanomedicina sono stati particolarmente rilevanti poiché essa permette di sfruttare alcune caratteristiche tipiche dei tessuti tumorali tra cui la ritenzione tissutale e la permeabilità dei vasi.

1.4 La nanomedicina, un'arma contro il tumore

I sistemi di “drug delivery” possono essere progettati in modo da ottenere dei “nanocarriers” multifunzionali altamente specifici per il tessuto/organo bersaglio. In questo modo, i nanosistemi caricati con uno o più farmaci chemioterapici possono circolare per tempi sufficientemente lunghi, accumulandosi nei siti target, e rispondere a stimoli (applicati dall'esterno o microambientali) che causano il rilascio dei farmaci. Le NPs si sono rivelate essere particolarmente appropriate per il “drug delivery” alle cellule maligne in quanto i tessuti tumorali solidi sono caratterizzati da alcune peculiarità che li rendono idonei per la veicolazione ed il rilascio selettivo dei farmaci.

I tumori solidi spesso presentano una vascolarizzazione irregolare, se confrontati con i tessuti sani. Nel rivestimento interno dei vasi le cellule endoteliali non sono unite da giunzioni per formare la normale struttura monostrato, di conseguenza viene compromessa la funzione di barriera [33]. Attraverso la microscopia a scansione è stato dimostrato che le aperture tra le cellule endoteliali dei vasi tumorali possono avere diametri superiori ai 2 μm , di conseguenza è possibile l'ingresso di piccole sostanze e molecole, incluse le NPs [55]. Le dimensioni delle NPs giocano un ruolo fondamentale nel processo di raggiungimento di un target tumorale, pertanto durante la fase di progettazione di un nanosistema devono essere attentamente controllate. Se le NPs sono abbastanza grandi da essere riconosciute dal sistema immunitario possono essere facilmente catturate da cellule fagocitarie, d'altra parte se sono troppo piccole, possono invece essere eliminate dal sistema renale. In entrambi i casi non raggiungeranno il loro bersaglio [56]. NPs con dimensioni inferiori a 200 nm sono scarsamente catturate dal sistema fagocitario mononucleare, rimanendo in circolo per più tempo [57]. Pertanto, ottimizzando le dimensioni dei “carriers” è possibile favorire la penetrazione nei tessuti tumorali ed aumentare il tempo di circolazione.

Oltre che da una vascolarizzazione alterata, i tumori solidi sono caratterizzati anche da un ridotto drenaggio linfatico che facilita l'accumulo delle NPs all'interno del tumore. Questo fenomeno è stato descritto per la prima volta circa trenta anni fa ed è conosciuto come "enhanced permeability and retention (EPR) effect" [58]. Il fenotipo tumorale può influenzare l'efficienza dell'effetto EPR. I tumori piccoli e vascolarizzati, a differenza di quelli di grosse dimensioni, sono maggiormente soggetti a questo fenomeno. Inoltre Daruwalla et al. hanno dimostrato come l'accumulo di nanosistemi dovuto all'effetto EPR sia maggiore in tumori metastatici [59]. Al fine di migliorare la captazione delle NPs nei tessuti tumorali, in caso di ridotto effetto EPR, possono essere utilizzate alcune strategie. Alcuni mediatori vascolari come l'ossido nitrico, la bradichinina e il fattore di crescita endoteliale svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo dei tumori e delle loro metastasi e possono influenzare l'effetto EPR nei tumori solidi. Perciò la modulazione di questi fattori può incrementare l'effetto EPR e l'accumulo tumorale delle NPs [60].

Le cellule tumorali presentano delle caratteristiche particolari come un corredo enzimatico alterato o l'espressione di specifici recettori di membrana. Inoltre, i tumori solidi hanno spesso le peculiarità tipiche di un tessuto infiammato come un pH inferiore e una temperatura superiore rispetto ai tessuti sani. Tutte queste caratteristiche possono essere sfruttate per veicolare selettivamente i "carriers" nel tumore. Ad esempio, i sistemi sensibili agli acidi sfruttano il ridotto pH dei tumori per il rilascio selettivo dei farmaci. Tra questi si annoverano i bioconiugati chimici che rilasciano il farmaco per idrolisi acida e alcuni sistemi colloidali come i liposomi e le micelle nei quali le dimensioni, la struttura e le caratteristiche superficiali sono influenzate dalle variazioni di pH [61].

Le NPs si possono accumulare all'interno dei tessuti tumorali attraverso dei meccanismi di "targeting" passivo e attivo. Il "targeting" passivo si basa su due fenomeni fisiologici che avvengono a livello della circolazione sanguigna, la diffusione e la convezione. La diffusione è responsabile del trasporto, attraverso le membrane cellulari, di sostanze molto lipofile e con basso peso molecolare, secondo gradiente di concentrazione. La convezione è un processo risultante dal moto del sangue ed è responsabile del trasporto di grosse molecole attraverso le ampie fenestrature presenti tra le cellule endoteliali dei

vasi tumorali. L'effetto EPR consente alle NPs di accumularsi passivamente nei vasi tumorali senza alcuna modifica superficiale [62]. Nel "targeting" attivo le NPs vengono modificate con ligandi specifici per recettori ed altre molecole espresse sulla superficie delle cellule tumorali. La coniugazione con questi legandi evita l'interazione dei nanocarriers con tessuti diversi da quello tumorale. Questi legandi includono la transferrina, l'acido folico, enzimi, anticorpi e macromolecole come proteine e carboidrati [63].

La probabilità di raggiungere il target tumorale è aumentata quanto più è elevato il tempo di circolazione delle NPs nel sistema circolatorio. Per raggiungere questo obiettivo la superficie delle particelle può essere modificata con l'inserimento di polimeri idrofili. In questo modo le NPs non vengono riconosciute dal sistema fagocitario mononucleare e non vengono eliminate. Il glicole polietilenico (PEG) è il polimero maggiormente utilizzato per questo scopo. È stato dimostrato che l'accumulo tumorale di NPs rivestite con PEG era più del doppio, rispetto a quello di NPs non modificate, il tutto accompagnato da una ridotta clearance particellare [64]. Anche altri polimeri idrofili come il destrano e l'eparina possono essere utilizzati per ottenere lo stesso effetto.

2 Bibliografia

1. Feynman RP. There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics. In Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology, Third Edition. CRC Press. 2012. pp. 26-35.
2. Seigneuric R, Markey L, Nuyten DSA, et al. From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. *Curr Mol Med*. 2010; 10(7):640-652.
3. Drexler EK. Engines of creation: the coming era of nanotechnology. Anchor Book. 1986.
4. Muthu MS and Singh S. Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine*. 2009; 4(1):105-118.
5. Whitesides GM. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol*. 2003; 21(10):1161-1165.

6. [ESF] European Science Foundation. 2004. Nanomedicine – An ESF– European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look Report. Strasbourg cedex, France ESF.
7. Moghimi SM, Hunter AC, and Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005; 19(3):311-330.
8. He C, Hu Y, Yin L, et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010; 31(13):3657-3666.
9. Sahoo SK, Parveen S, and Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: NBM.* 2007; 3(1):20-31.
10. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology.* 2004; 2(1):3.
11. Sanvicens N, and Marco MP. Multifunctional nanoparticles–properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.* 2008; 26(8):425-433.
12. Ealias AM, and Saravanakumar MP. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* 2017; 263(3):032019.
13. Tiwari JN, Tiwari RN, and Kim KS. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progr Mater Sci.* 2012; 57(4):724-803.
14. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001; 70(1-2):1-20.
15. Gelperina S, Kisich, K, Iseman, MD, et al. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care.* 2005; 172(12):1487-1490.
16. Mudshinge SR, Deore AB, Patil S, et al. Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J.* 2011; 19(3):129-141.
17. Sonavane G, Tomoda K, and Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2008; 66(2):274-280.
18. Cheng G, An F, Zou MJ, et al. Time-and pH-dependent colon-specific drug delivery for orally administered diclofenac sodium and 5-aminosalicylic acid. *World J Gastroenterol: WJG.* 2004; 10(12):1769.
19. Couvreur P, and Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res.* 2006; 23(7):1417-1450.

20. Zhu D, Tao W, Zhang H, et al. Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Acta Biomater.* 2016; 30:144-154.
21. Mei L, Liu Y, Xia C, et al. Polymer–Drug Nanoparticles Combine Doxorubicin Carrier and Heparin Bioactivity Functionalities for Primary and Metastatic Cancer Treatment. *Mol Pharm.* 2017; 14(2):513-522.
22. Barrak H, Saied T, Chevallier P, et al. Synthesis, characterization, and functionalization of ZnO nanoparticles by N-(trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid (TMS EDTA): Investigation of the interactions between Phloroglucinol and ZnO@ TMS EDTA. *Arab J Chem.* 2016. ARTICLE IN PRESS
23. Khan I, Yamani ZH, and Qurashi, A. Sonochemical-driven ultrafast facile synthesis of SnO₂ nanoparticles: Growth mechanism structural electrical and hydrogen gas sensing properties. *Ultrason Sonochem.* 2017; 34:484-490.
24. Ramacharyulu PVRK, Muhammad R, Kumar JP, et al. Iron phthalocyanine modified mesoporous titania nanoparticles for photocatalytic activity and CO₂ capture applications. *Phys Chem.* 2015; 17(39):26456-26462.
25. Wang AZ, Gu F, Zhang L, et al. Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8(8):1063-1070.
26. Nikam AP, Mukesh PR, and Haudhary SP. Nanoparticles-An overview. *J Drug Deliv Ther.* 2014; 3:1121-1127.
27. Khan I, Saeed K, and Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem.* (2017). ARTICLE IN PRESS.
28. Patel T, Zhou J, Piepmeier JM, et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(7):701-705.
29. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(15):1650-1662.
30. Kumari A, Yadav SK, and Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2010; 75(1):1-18.
31. Wang EC, and Wang, AZ. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrat Biol.* 2014; 6(1):9-26.
32. Brannon-Peppas L, and Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 64:206-212.
33. Brigger I, Dubernet C, and Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 64:24-36.

34. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, et al. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *J Control Release*. 1999; 60(2-3):179-188.
35. Arias JL, Ruiz MA, López-Viota, M, et al. Poly (alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2008; 62(1):64-70.
36. Vinodh R, Babu CM, Abidov A, et al. Synthesis and Characterization of 1-octyl 2-cyano Acrylate for Wound Healing Applications. *Int J Biosci Biotechn*. 2016; 8(1):339-350.
37. Nicolas J, and Couvreur P. Synthesis of poly (alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009; 1(1):111-127.
38. Han MG, Kim S, and Liu SX. Synthesis and degradation behavior of poly (ethyl cyanoacrylate). *Polym Degrad Stab*. 2008; 93(7):1243-1251.
39. Katti D, and Krishnamurti N. Anionic polymerization of alkyl cyanoacrylates: in vitro model studies for in vivo applications. *J Appl Polym Sci*. 1999; 74(2):336-344.
40. Arias JL, Gallardo V, Gomez-Lopera SA, et al. Synthesis and characterization of poly (ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J Control Release*. 2001; 77(3):309-321.
41. Arias, J L, Gallardo V, Ruiz MA, et al. Ftorafur loading and controlled release from poly (ethyl-2-cyanoacrylate) and poly (butylcyanoacrylate) nanospheres. *Int J Pharm*. 2007; 337(1-2):282-290.
42. Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000; 50:161-177.
43. Lombardi Borgia S, Regehly M, Sivaramakrishnan R, et al. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement–correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. *J. Control. Release* 2005; 110(1):151–163.
44. Khan AA, Mudassir J, Mohtar N, et al. Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8:2733.
45. Singh I, Swami, R, Khan W, et al. Lymphatic system: a prospective area for advanced targeting of particulate drug carriers. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014; 11(2):211-229.
46. Muller RH, and Olbrich C. Solid Lipid Nanoparticles: Phagocytic uptake, in vitro cytotoxicity and in vitro biodegradation. *Drugs Made Ger*. 1999; 42, 49-53.
47. Mehnert W, and Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012; 64:83-101.

48. Aburahma MH, and Badr-Eldin, SM. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11(12):1865-1883.
49. www.gattefosseitalia.it
50. Paliwal R, Rai S, Vaidya B, et al. Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. *Nanomedicine: NBM.* 2009; 5(2):184-191.
51. Bae YH, and Park K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J Control Release.* 2011; 153(3):198.
52. Ratnam GV, Haritha K, and Rao AL. Drug Targeting in Neoplastic Disorders. *Int J Res Pharm Chem.* 2016; 6(3):623-630.
53. Arias, JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. *Mini-Rev Med Chem.* 2011; 11(1):1-17.
54. Hu CMJ, Aryal S, and Zhang L. Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment. *Ther Deliv.* 2010; 1(2):323-334.
55. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol.* 2000; 156(4):1363-1380.
56. Kobayashi H, Watanabe R, and Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics.* 2014; 4(1):81.
57. Owens DE, and Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006; 307(1):93-102.
58. Matsumura Y, and Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986; 6(12 Part 1):6387-6392.
59. Daruwalla J, Nikfarjam M, Greish, K, et al. In vitro and in vivo evaluation of tumor targeting styrene-maleic acid copolymer-pirarubicin micelles: Survival improvement and inhibition of liver metastases. *Cancer Sci.* 2010; 101(8):1866-1874.
60. Iyer AK, Khaled G, Fang J, et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today.* 2006; 11(17-18):812-818.
61. Liu Y, Wang W, Yang J, et al. pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery. *Asian J Pharm Sci.* 2013; 8(3):159-167.

62. Noble CO, Krauze MT, Drummond DC, et al. Novel nanoliposomal CPT-11 infused by convection-enhanced delivery in intracranial tumors: pharmacology and efficacy. *Cancer Res.* 2006; 66(5):2801-2806.
63. Tran, S, DeGiovanni PJ, Piel B, et al. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clin Transl Med.* 2017; 6(1):44.
64. Kommareddy S, and Amiji, M. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of long-circulating thiolated gelatin nanoparticles following systemic administration in breast cancer-bearing mice. *J Pharm Sci.* 2007; 96(2):397-407.

Le rassegne bibliografiche trattate di seguito (Capitoli I e II) sono frutto di un mirato approfondimento di parte della letteratura raccolta e impiegata durante la parte sperimentale del lavoro (Capitoli III e IV).

CAPITOLO I

Metastasi linfonodali: importanza dell'identificazione e strategie per il trattamento

Abstract

I vasi linfatici rappresentano una via preferenziale attraverso la quale la maggior parte dei tumori solidi diffondono le loro metastasi nell'organismo. La presenza di metastasi all'interno dei linfonodi drenanti è un indice della progressione della malattia e un segno del peggioramento della prognosi, perciò l'individuazione e l'eliminazione delle cellule tumorali presenti nel sistema linfatico è un importante traguardo. Tuttavia il raggiungimento del sistema linfatico con i tradizionali mezzi di contrasto e/o con i chemioterapici è ostacolato dalla particolare struttura anatomica di tale sistema. Per questa ragione, sono stati condotti numerosi studi con l'obiettivo di individuare nuovi sistemi di trasporto, sia per migliorare le tecniche di "imaging" delle strutture linfatico-linfonodali, sia per veicolare selettivamente i farmaci chemioterapici all'interno di tali strutture al fine di ridurre il contatto tra tessuti sani e sostanze citotossiche. Questa "review" passa in rassegna l'attuale situazione relativa all'individuazione e al trattamento delle metastasi linfonodali. In particolare è stato mostrato come i nanosistemi, grazie alle loro ridotte dimensioni e ad altre particolari caratteristiche chimico-fisiche rappresentino dei veicoli ideali per il raggiungimento del sistema linfatico.

1 Introduzione

Il cancro e il suo impatto sul benessere e sull'economia rappresentano un serio problema sia nei Paesi occidentali che in quelli emergenti. Secondo il database GLOBOCAN dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel 2012 sono stati diagnosticati circa 14,1 nuovi casi e 8,2 milioni di decessi causati da tumori [1]. A causa del progressivo aumento e al contemporaneo invecchiamento della popolazione, questo numero è destinato ad aumentare a 20 milioni nel 2025. Inoltre, l'incidenza di questa patologia sta aumentando in quei Paesi che adottano comportamenti di vita tipici delle società occidentali e che subiscono rapidi cambiamenti economici [2].

Il cancro al polmone è il più frequente: ogni anno al mondo vengono effettuate circa 1,8 milioni di nuove diagnosi (13% del totale). In seconda posizione vi è il tumore al seno con 1,7 milioni di nuovi pazienti (12%), seguito dal cancro al colon con più di 1,4 milioni di casi (10%) [3].

Attualmente, i principali trattamenti per il cancro comprendono la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia; l'ormonoterapia e l'immunoterapia sono delle ulteriori strategie. Per alcuni pazienti è sufficiente una singola tipologia di trattamento ma, spesso, è necessaria la combinazione di più tecniche. Quando è possibile, la prima scelta è la resezione chirurgica, che rimane la principale strategia volta al miglioramento della prognosi. Tuttavia, le procedure chirurgiche non sempre portano alla totale eliminazione delle cellule tumorali, con conseguente presenza di depositi che possono causare una ricomparsa della malattia [4, 5]. Al fine di migliorare la chirurgia vengono utilizzate varie terapie adiuvanti, ad esempio, l'uso combinato di chirurgia e chemioterapia ha portato ad importanti risultati in ambito clinico [6]. Nonostante i numerosi progressi ottenuti con la chemioterapia, questo trattamento causa importanti effetti collaterali dovuti alla ridotta capacità dei farmaci antitumorali di raggiungere selettivamente le cellule cancerogene. Pertanto è spesso necessario ridurre le dosi e i cicli di trattamento con conseguente rischio di ricadute. Per quanto riguarda la radioterapia, essa richiede l'utilizzo di alte dosi di radiazioni ionizzanti che portano a gravi danni ai tessuti che circondano i tumori [7, 8].

La diagnosi precoce è fondamentale per trattare efficacemente il cancro, riducendone così la mortalità e i costi di gestione [9]. Le tecniche di "imaging" sono un elemento

cardine nello screening tumorale. Oltre che per la diagnosi, queste tecniche sono utilizzate per valutare la localizzazione e la stadiazione del cancro, per guidare il medico nelle procedure chirurgiche e per monitorare un'eventuale ricomparsa del tumore. Le tecniche di "imaging" dovrebbero essere in grado di identificare tutti i depositi tumorali, anche i più piccoli [10], tuttavia, in alcuni casi rilevare la presenza di cellule cancerogene è molto difficile, pertanto sono necessari ulteriori miglioramenti nell'identificazione dei tumori umani.

Recentemente sono stati individuati nuovi veicoli capaci di trasportare selettivamente agenti di "imaging" e/o farmaci antitumorali a tessuti e cellule cancerogene e il sistema linfatico (SL), grazie alla sua organizzazione all'interno del corpo umano, è stato ampiamente studiato come bersaglio per tali sistemi di trasporto [11]. Nonostante il suo importante ruolo nell'aiutare il sistema immunitario, i vasi linfatici rappresentano una via primaria per la diffusione di metastasi e di agenti infettivi. Pertanto farmaci per il trattamento di patologie che diffondono attraverso il SL, come il cancro, possono essere trasportati tramite i vasi linfatici.

2 Il sistema linfatico

Il SL è un sistema di drenaggio ad una via costituito da vasi linfatici, organi linfoidei e linfa, la cui funzione è quella di regolare la concentrazione delle proteine, il volume e la pressione del liquido interstiziale e di adjuvare l'attività del sistema immunitario [12]. I vasi linfatici sono vasi di drenaggio che raccolgono proteine plasmatiche e liquidi dal fluido interstiziale e restituiscono queste sostanze al circolo sanguigno [13]. Una volta che il liquido interstiziale entra nei vasi linfatici, viene chiamato linfa [14]. La composizione proteica della linfa è quasi equivalente a quella del liquido interstiziale, che a sua volta è simile, ma meno concentrata, a quella del plasma sanguigno. Essa contiene inoltre un'elevata quantità di grasso assorbita a livello intestinale, pertanto si presenta come un'emulsione torbida e lattiginosa. Altri organi come tonsille, midollo osseo, adenoidi, timo e milza fanno parte di tale sistema [15]. I vasi linfatici, rappresentati da capillari, collettori e dotti, creano una fitta rete in tutto il corpo umano tranne che nella cornea e nella cartilagine. La linfa contenuta nei vasi non circola per mezzo di una pompa come il cuore del sistema circolatorio. I vasi linfatici sono infatti

organizzati per formare una struttura unidirezionale nella quale la linfa, una volta drenata dalle estremità per mezzo dei capillari, viene fatta passare attraverso i linfonodi, grazie all'azione di pompaggio dei vasi collettori e infine riversata nella circolazione sanguigna [16,17]. La portata è 100-500 volte inferiore rispetto alla velocità di flusso del sangue e la propulsione della linfa è garantita dall'azione dei muscoli scheletrici, dai movimenti respiratori e dalla contrazione della muscolatura liscia dei vasi linfatici di raccolta.

I capillari linfatici, caratterizzati da un diametro che varia da 10 a 60 μm , sono dei vasi costituiti da un singolo strato di cellule endoteliali disposto sopra una lamina basale discontinua. Fra le cellule sono presenti giunzioni intercellulari serrate responsabili dell'integrità della parete. Le giunzioni cellulari possono sovrapporsi formando delle valvole unidirezionali che permettono al liquido interstiziale di entrare nel lume dei capillari e prevengono la fuoriuscita della linfa. Quando la pressione all'interno dei capillari è inferiore a quella del fluido interstiziale, le valvole si aprono e il liquido può entrare all'interno dei vasi formando la linfa [18]. Una volta che linfa è entrata all'interno dei capillari, è drenata verso i collettori linfatici.

I vasi collettori non sono legati a cellule del tessuto connettivo e presentano cellule muscolari lisce che controllano il flusso della linfa per mezzo di contrazioni peristaltiche [19]. Sono pertanto dei vasi contrattili e, come i capillari, sono dotati di valvole per impedire la fuoriuscita della linfa [20]. La contrazione delle cellule muscolari è causata da delle cellule pacemaker [21] ma vari stimoli, sia fisici (distensione delle pareti dei vasi, temperatura, flusso della linfa) che chimici (neurotrasmettitori, ormoni circolanti) possono attivare queste cellule [22].

I linfonodi sono delle strutture di tessuto linfoide disseminate lungo la fitta rete di vasi linfatici. Nell'uomo adulto sono presenti circa 500-600 linfonodi; essi hanno un diametro che varia da 1 a 10 mm e sono costituiti da tre zone che dall'esterno all'interno sono: zona corticale, zona paracorticale e zona midollare. I linfonodi si trovano raggruppati tra di loro nell'addome, nel collo, nell'inguine, nelle ascelle e nel torace, in prossimità dei vasi sanguigni. All'interno dei linfonodi vi sono varie tipologie di cellule emopoietiche e immunitarie, tra cui linfociti T e B e cellule dendritiche [23, 24]. Le principali funzioni dei linfonodi sono la filtrazione della linfa e il supporto al sistema

immunitario. In seguito all'attivazione dei linfociti B da parte di un antigene, i linfonodi producono anticorpi specifici per tale antigene, il quale viene "etichettato" per essere distrutto. La linfa, trasportata da un vaso afferente, diffonde nei linfonodi all'interno dei quali viene filtrata da virus e batteri. Al termine di questo percorso viene drenata da un vaso efferente e lascia il linfonodo [25]. I vasi efferenti convergono nei collettori post-linfonodali e da essi la linfa diffonde attraverso i tronchi linfatici nei due dotti linfatici (dotto linfatico tracico e destro), i vasi terminali del sistema linfatico [26].

3 Metastasi linfonodali e strategie di trattamento

Le metastasi sono una delle principali cause di mortalità associate al cancro. I linfonodi regionali rappresentano una delle sedi più comuni per lo sviluppo di metastasi (figura 1). Un tumore può diffondere sia per diffusione locale, sia perché si propaga a distanza. La propagazione a distanza, in altre parole la formazione di focolai metastatici, può avvenire per diverse vie tra le quali le più comuni sono la via ematica attraverso il torrente circolatorio e la via linfatica tramite i vasi linfatici [27-29]. Numerose caratteristiche tra cui una membrana basale discontinua, una portata di flusso minore e un'elevata concentrazione di acido ialuronico, una sostanza con proprietà di sopravvivenza e protezione cellulare, rendono i vasi linfatici maggiormente idonei alla disseminazione di metastasi, rispetto a quelli sanguigni [30, 31]. Perciò, il sistema linfatico rappresenta una via primaria per la diffusione di tumori solidi, in particolare quelli di origine epiteliale come quelli al seno, colon, polmone e prostata [32].

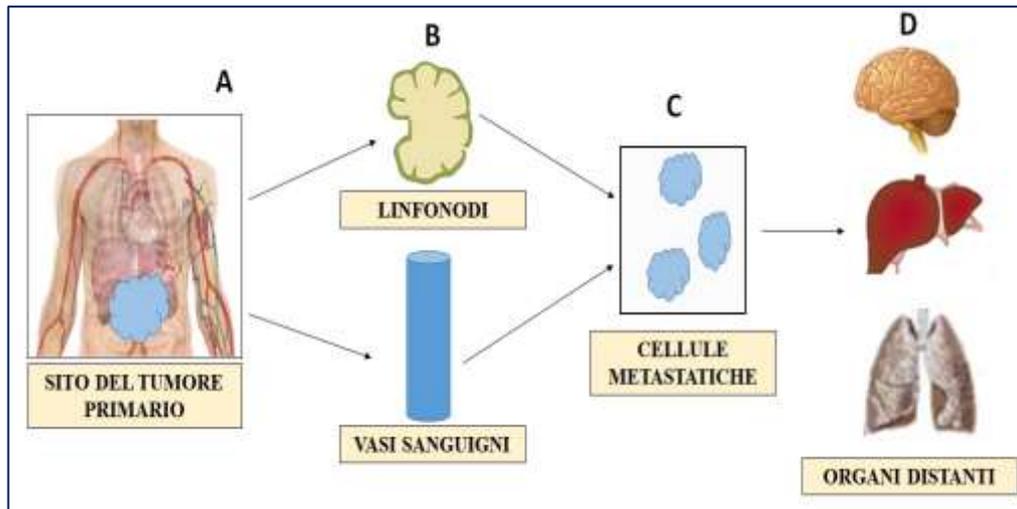


Figura 1. Dal sito primario di crescita (A) un tumore può diffondere attraverso i linfonodi locali e/o i vasi sanguigni (B). Le cellule metastatiche (C) raggiungeranno gli organi distanti per infiltrarsi e distruggere strutture vitali (D).

Il meccanismo che porta alla diffusione di metastasi attraverso il SL è rimasto sconosciuto per molti anni. In origine si pensava che i vasi linfatici avessero solo un ruolo passivo nella diffusione delle cellule cancerogene, agendo semplicemente come dei canali [33]. Questo era dovuto a una scarsa attenzione nei confronti del SL rispetto a quello circolatorio. Recentemente, numerosi studi hanno invece dimostrato l'implicazione del SL in numerose patologie e meccanismi fisiologici come la modulazione immunitaria e la sopravvivenza delle cellule staminali tumorali [34]. Maggiori informazioni riguardanti il meccanismo di disseminazione linfatica sono state acquisite in seguito alla scoperta di marcatori specifici per i vasi linfatici e di fattori di crescita tumorali, i quali stimolano lo sviluppo dei vasi [35]. I fattori di crescita portano ad un ampliamento della vascolarizzazione tumorale e ad una notevole linfangiogenesi, effetti che favoriscono l'ingresso di cellule metastatiche nel SL [36]. La linfangiogenesi è un processo che porta alla formazione di nuovi vasi linfatici da predecessori linfatici endoteliali o da vasi preesistenti e alla cui base vi sono delle interazioni tra cellule immunitarie, tumorali ed endoteliali [37]. In molti tumori solidi vi è spesso la sovraespressione di una famiglia di recettori tirosinchinasici: i recettori del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor). Una volta attivati, questi recettori, danno inizio ad un insieme di fenomeni intracellulari che portano alla proliferazione delle cellule endoteliali. A questa famiglia

appartengono tre recettori (VEGFR-1 VEGFR-2 e VEGFR-3) e sono i principali responsabili dell'angiogenesi, un processo che porta alla formazione di nuovi vasi a partire da quelli già esistenti [38]. I ligandi per questi recettori sono due: il fattore di crescita dell'endotelio vascolare C (VEGF-C) e D (VEGF-D), i quali, una volta attivata la via di VEGFR causano crescita dei vasi linfatici, stimolazione della proliferazione e della migrazione cellulare e inibizione dell'apoptosi [39-41]. Nel 2001, Stacker et al. hanno dimostrato l'abilità del VEGF-C nell'indurre lo sviluppo dei vasi linfatici e nel promuovere la diffusione di cellule maligne in modelli murini di cancro [42]. In altri lavori è stato invece riportato come sostanze capaci di bloccare VEGF-C e VEGF-D o la via di VEGFR-3 possono inibire la crescita dei vasi linfatici e la diffusione delle metastasi [43-45].

Il SL, non solo ha un ruolo primario nella diffusione di metastasi e infezioni [46], ma è anche il sito di sviluppo per altre patologie come HIV, tubercolosi, leishmaniosi e antrace [47]. Pertanto è stato ampiamente studiato come bersaglio per farmaci chemioterapici e antinfettivi, per agenti di "imaging", terapia genica e vaccini. Va inoltre tenuto in considerazione che la via linfatica consente di evitare il metabolismo di primo passaggio epatico [48]. La presenza di metastasi nei linfonodi drenanti è un fattore caratteristico per la stadiazione e la progressione del tumore; per questo motivo la veicolazione di farmaci anticancro è particolarmente interessante [49].

I principali approcci per l'eradicazione delle metastasi linfatiche sono la linfadenectomia (la rimozione chirurgica dei linfonodi), la chemioterapia e la radioterapia, tuttavia questi sono dei metodi molto invasivi che portano a importanti effetti collaterali [50]. Inoltre, l'utilizzo della linfadenectomia è ostacolato dai pochi dati che dimostrano l'efficacia di questa procedura e spesso si ha una scarsa correlazione tra rimozione dei linfonodi e miglioramento della sopravvivenza [51]. Per distruggere le cellule metastatiche evitando gli effetti avversi è necessario che una concentrazione appropriata di chemioterapico raggiunga selettivamente i vasi linfatici e i linfonodi. Tuttavia la veicolazione dei farmaci verso specifici siti del tessuto linfatico è ostacolata dalle particolari caratteristiche anatomiche del SL. Per tale motivo, attraverso le tradizionali infusioni endovenose di farmaci è molto difficile raggiungere le metastasi linfatiche [52]. È stato riportato che in seguito a somministrazione endovenosa di

Doxorubicina nei ratti, la quantità di farmaco ritrovata nel sangue era circa 8 volte più alta rispetto a quella presente nella linfa [53].

La biopsia del linfonodo sentinella (il primo linfonodo a essere raggiunto da eventuali metastasi a partenza dai tumori maligni) è diventata una procedura comunemente utilizzata per valutare lo stadio di numerosi tumori. Tuttavia questa tecnica presenta alcuni svantaggi come dei falsi negativi, nel caso in cui non si riescano a visualizzare le eventuali cellule tumorali presenti. Un falso negativo viene definito come un linfonodo sentinella che dà esito negativo durante la biopsia, ma in seguito ad ulteriori esami istologici viene individuato come positivo. La presenza di “detriti” tumorali, così come una fibrosi linfatica possono alterare il drenaggio linfatico e di conseguenza si possono avere dei fallimenti nella biopsia del linfonodo sentinella [54]. In alcuni studi è stato riportato che il tasso di falsi negativi associati alla biopsia del linfonodo sentinella va da 5 al 10% e poiché questo è un problema clinico molto importante, è necessario individuare delle nuove strategie [55].

Le tecniche per “l’imaging” linfatico sono meno sviluppate di quelle utilizzate per la visualizzazione dei vasi sanguigni, inoltre la delicata struttura dei vasi linfatici ostacola l’iniezione diretta di agenti di contrasto. Per migliorare la visualizzazione del SL, prima dell’esame diagnostico vengono somministrati dei traccianti come il Verde d’Indocianina (ICG), un colorante fluorescente utilizzato nella diagnosi e nel trattamento di tumori [56, 57]. Negli ultimi anni, ICG è stata utilizzata nella biopsia del linfonodo sentinella per numerosi tumori [58-61]. Un agente di contrasto ideale dovrebbe essere capace di raggiungere il SL senza essere prima captato dai vasi sanguigni [62].

Dei nuovi sistemi di veicolazione o formulazioni farmaceutiche che facilitano il raggiungimento del SL rappresentano delle importanti strategie per migliorare il trattamento delle metastasi tumorali. Tra questi, i nanosistemi sembrano essere particolarmente promettenti.

4 Nanosistemi per la veicolazione di farmaci: una strategia per le metastasi linfatiche

I nanosistemi sono stati ampiamente studiati per la diagnosi e il trattamento dei tumori [63]. Come mostrato nella tabella seguente, la nanotecnologia ha permesso di ottenere importanti risultati in numerosi apparati [64-68].

Tipo di nanosistema	Apparato	Risultati biologici	Referenza
Nanoparticelle solide lipidiche	Digestivo	<i>In vitro</i> induzione dell'apoptosi nelle cellule cancerogene; <i>in vivo</i> azione antitumorale in modelli murini di tumore	64
Nanoparticelle polimeriche	Respiratorio	Sia <i>in vitro</i> che <i>in vivo</i> le nanoparticelle hanno mostrato una notevole azione antitumorale con ridotti effetti avversi	65
Liposomi	Riproduttore femminile	I liposomi hanno portato ad una riduzione della proliferazione delle cellule tumorali	66
Nanoparticelle di manganese	Urinario	Le nanoparticelle, <i>in vitro</i> , hanno permesso di visualizzare il tumore renale mediante risonanza magnetica nucleare; <i>in vivo</i> hanno mostrato elevata capacità di ritenzione e accumulo nelle cellule tumorali	67
Micelle	Endocrino	Le micelle hanno portato ad una riduzione della crescita delle cellule tumorali	68

Tabella 1: Risultati clinici recenti, ottenuti in vari apparati, utilizzando la nanotecnologia.

I “nano drug delivery systems” comprendono un insieme di sistemi a struttura differente tra cui nanoparticelle polimeriche, liposomi, micelle, coniugati polimerici, dendrimeri e nanoparticelle lipidiche. Sono delle formulazioni studiate per differenti applicazioni e,

grazie alle loro particolari caratteristiche, hanno un notevole potenziale nella diagnosi e nel trattamento tumorale. Un sistema destinato al SL dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: selettività nei confronti dei vasi linfatici e dei linfonodi, capacità di accumulo e di rilascio dei farmaci nelle metastasi e ridotti effetti collaterali nei tessuti sani.

I nanosistemi consentono di veicolare selettivamente un farmaco o un agente di contrasto nel SL, incluse le metastasi, portando ad una riduzione della quantità di farmaco libero nel sistema circolatorio e un ad accumulo nei siti tumorali [69].

Sono serviti numerosi studi per comprendere quali proprietà dei “nano drug delivery systems” consentano di aumentarne il tempo di circolazione dopo somministrazione parenterale. Dimensioni, proprietà superficiali e forma possono essere opportunamente modulate per evitare un riconoscimento da parte del sistema fagocitario mononucleare. Un lungo tempo di circolazione permette ai “nanocarriers” di entrare nel tessuto cancerogeno attraverso l’irregolare vascolarizzazione tumorale e di accumularsi a causa del ridotto drenaggio linfatico [70-72]. Come detto in precedenza, questo fenomeno è stato descritto per la prima volta nel 1986 da Matsuma and Maeda ed è chiamato “Enhanced permeability and retention (EPR) effect” [73,74]. Le nanoformulazioni si accumulano nei siti tumorali per l’effetto EPR e rilasciano i farmaci direttamente all’interno del tumore stesso. Tuttavia, alcuni autori hanno riportato che spesso, l’effetto EPR porta a un incremento dell’accumulo dei chemioterapici in tessuti tumorali di solo due volte rispetto a quelli sani [75]. Per questo motivo sono necessarie delle nuove strategie per aumentare questo fenomeno all’interno dei tumori.

Le caratteristiche fisico-chimiche che influenzano la captazione dei “nanocarriers” all’interno del SL (definito come un processo competitivo tra i vasi sanguigni e quelli linfatici) sono: dimensioni, carica superficiale, idrofobia e peso molecolare (tabella 2). Le dimensioni rappresentano un parametro fondamentale nella veicolazione dei nanosistemi al SL, in particolare dopo somministrazione interstiziale. Con questo tipo di somministrazione i farmaci devono attraversare lo spazio interstiziale, uno dei primi ostacoli per un drenaggio linfatico. L’interstizio è costituito da delle fibre inserite in un fluido le quali si distribuiscono in modo da formare dei canali acquosi con un diametro di circa 100 nm, che permettono il passaggio delle sostanze per diffusione [76]. Solo

nanosistemi con un diametro compreso tra 10 e 80 nm vengono captati efficientemente dai vasi linfatici. Particelle con dimensioni inferiori a 10 nm vengono drenate dai capillari sanguigni, mentre quelle di grosse dimensioni restano bloccate nel sito d'iniezione [77]. Reddy et al. hanno studiato il processo di veicolazione nell'organismo di NP di polipropilene stabilizzate con Pluronic, aventi dimensioni di 25 e 100 nm. I risultati hanno dimostrato come, dopo somministrazione intradermica, solo le nanoparticelle con dimensioni di 25 nm erano riuscite a raggiungere il SL, mentre quelle con diametro di 100 nm presentavano un ridotto trasporto interstiziale [78]. Oussoren et al. hanno valutato la distribuzione e la ritenzione a livello linfatico di liposomi (diametro: 40, 70, 170 e 400 nm) somministrati per via sottocutanea. È stato riportato che i liposomi di grosse dimensioni (400 nm) erano trattenuti nel sito d'iniezione e presentavano un ridotto accumulo linfatico [79].

La captazione linfatica è influenzata anche dalle interazioni tra l'interstizio e i "nanocarriers". I principali costituenti dello spazio interstiziale sono i glicosaminoglicani i quali conferiscono una carica negativa che influenza il passaggio delle specie cariche [80]. Perciò, sostanze cariche negativamente vengono drenate più velocemente dal sito d'iniezione rispetto a quelle positive, le quali interagiscono con la matrice interstiziale negativa [81, 82].

L'idrofobia è un altro parametro che può influenzare la veicolazione e l'accumulo dei nanosistemi nel SL. È stata dimostrata una relazione inversa tra idrofobia e ritenzione linfatica. La riduzione dell'idrofobia delle particelle causa una minore opsonizzazione e fagocitosi da parte del sistema fagocitario mononucleare, con conseguente incremento della ritenzione a livello linfatico [83].

Il ruolo del peso molecolare (PM) sull'assorbimento linfatico, dopo somministrazione sottocutanea, è stato studiato da molti gruppi di ricerca. Supersaxo et al. hanno valutato l'assorbimento di varie sostanze con PM differente. Molecole con PM > 16 kDa venivano captate principalmente attraverso i vasi linfatici, mentre quelle con PM < 1 kDa erano drenate dai vasi sanguigni, con ridotto assorbimento linfatico [84]. L'influenza del peso molecolare sulla captazione linfatica è stata studiata anche utilizzando dei biopolimeri coniugati con coloranti che emettono nell'infrarosso, aventi vari PM (6,4, 35, 74, 132, 357 e 697 kDa). Per ciascun polimero sono state determinate

le dimensioni corrispondenti ai vari PM (scelti all'interno del range di dimensioni ideale per l'assorbimento linfatico) ed è stato dimostrato che i bioconiugati con PM di 74 kDa (circa 30-50 nm) mostravano un'elevata ritenzione a livello linfatico [85].

Parametri fisico-chimici	Caratteristiche ottimali	Referenze
Diametro	10-80 nm	77,78,79
Carica superficiale	Negativa	81,82
Idrofobia	Idrofobia ridotta	83
Peso molecolare	MW > 16 kDa per macromolecole, circa 74 kDa per polimeri	84,85

Tabella 2. Parametri fisico-chimici che influenzano la captazione linfatica e loro caratteristiche ideali.

Ad oggi, varie tipologie di nanosistemi sono utilizzati per la veicolazione di farmaci al SL: liposomi [86-94], micelle [95-97], dendrimeri [98, 99], nanoconiugati [100-102], nanoemulsioni [103], nanogels [104], nanotubuli di carbonio [105], “quntum dots” [106, 107]. Oltre a questi, vari tipi di nanoparticelle (descritte nel Capitolo II) hanno ricevuto particolare attenzione. Queste formulazioni, una volta penetrate all'interno delle cellule attraverso meccanismi di trasporto attivo e passivo, vengono inglobate all'interno di endosomi e bypassano la farmacoresistenza causata alla glicoproteina-P [108].

5 Conclusioni

Il cancro è una delle principali cause di morte a livello mondiale. I comuni protocolli di trattamento includono la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia, tuttavia in alcuni casi queste strategie possono fallire.

Il SL ha un ruolo fondamentale nel processo di disseminazione di metastasi da tumori primari, pertanto la diagnosi ed il trattamento delle metastasi linfatiche è fondamentale per una prognosi favorevole. I nanosistemi, grazie alle loro particolari caratteristiche, hanno aperto delle nuove prospettive e hanno mostrato un potenziale per lo sviluppo di nuove strategie per la diagnosi ed il trattamento delle metastasi linfatiche. Questi sistemi di “drug delivery” portano a un miglioramento dell'accumulo tumorale dei

chemioterapici grazie all'effetto EPR, inoltre ne aumentano l'assorbimento linfatico e la ritenzione all'interno dei linfonodi.

6 Bibliografia

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2):87-108.
2. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer.* 2016; 139(11):2436-2446.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5):359-386.
4. Adam R. Chemotherapy and surgery: new perspectives on the treatment of unresectable liver metastases. *Ann Oncol.* 2003; 14(2):13-16.
5. Fisher B. Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. *Cancer.* 1977; 40(Suppl 1):574-587.
6. Wada H, Hitomi S, Teramatsu T. Adjuvant chemotherapy after complete resection in non-small-cell lung cancer. West Japan Study Group for Lung Cancer Surgery. *J Clin Oncol.* 1996; 14(4):1048-1054.
7. Burish TG, Lyles JN. Effectiveness of relaxation training in reducing adverse reactions to cancer chemotherapy. *J Behav Med.* 1981;4(1):65-78.
8. Chen Y, Song G, Dong Z, et al. Drug-loaded mesoporous tantalum oxide nanoparticles for enhanced synergetic chemoradiotherapy with reduced systemic toxicity. *Small.* 2017; ARTICLE IN PRESS
9. Fass L. Imaging and cancer: a review. *Mol Oncol.* 2008; 2(2):115-152.
10. Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol.* 2008; 26(24):4012-4021.
11. Charman WN, Stella VJ. Lymphatic transport of drugs. Florida (FL):C.R.C. Press. Boca Raton: 1992.
12. Olszewski WL. The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions. *Lymphatic Res Biol.* 2004; 1(1):11-24.
13. Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Delivery Rev.* 2001; 50(1-2):3-20.

14. McGeown JG, Symmers WStC. The lymphatic vessels. In thymus, lymph nodes, spleen and lymphatics, (Systemic Pathology 7). New York (NY): Symmers: 1992.
15. Lane K, Worsley D, McKenzie D. Exercise and the lymphatic system. *Sports Med.* 2005; 35(6):461-471.
16. Szuba A, Rockson SG. Lymphedema: anatomy, physiology and pathogenesis. *Vasc Med.* 1997; 2(4):321-326.
17. Clément O, Luciani A. Imaging the lymphatic system: possibilities and clinical applications. *Eur Radiol.* 2004; 14(8):1498-1507.
18. Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev.* 1990; 70(4):987-1028.
19. Muthuchamy M, Zawieja D. Molecular regulation of lymphatic contractility. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1131:89-99.
20. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(10):2167-2177.
21. Gashev AA. Physiologic aspects of lymphatic contractile function. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 979:178-187.
22. Von Der Weid PY, Rainey KJ. Review article: lymphatic system and associated adipose tissue in the development of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010; 32(6):697-711.
23. Katakai T, Hara T, Lee JH et al. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol.* 2004; 16(8):1133-1142.
24. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245-252.
25. Willard-Mack CL. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol.* 2006; 34(5):409-424.
26. Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech.* 2001; 55(2):92-99.
27. Chua B, Ung O, Taylor R, et al. Frequency and predictors of axillary lymph node metastases in invasive breast cancer. *ANZ J Surg.* 2001; 71(12):723-728.
28. Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, et al. Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol.* 2002; 17(3):863-870.
29. Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol.* 2016; 39(5):397-410.

30. Kawada K, Taketo MM. Significance and mechanism of lymph node metastasis in cancer progression. *Cancer Res.* 2011; 71(4):1214-1218.
31. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992; 6(79):2397-2404.
32. Ran S, Volk L, Hall K, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology.* 2010; 17(4):229-251.
33. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise. *Cell.* 2010; 140(4):460-476.
34. Karaman S, Detmar M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J Clin Invest.* 2014; 124(3):922-928.
35. Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol.* 2008; 216(2):347-354.
36. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14:159-172.
37. McAllaster JD, Cohen MS. Role of the lymphatics in cancer metastasis and chemotherapy applications. *Adv Drug Delivery Rev.* 2011; 63(10-11):867-875.
38. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001; 20(6):1223-1231.
39. Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 2001; 20(17):4762-4773.
40. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(2):548-553.
41. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996; 15(2):290-298.
42. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 2001; 7:186-191.
43. He Y, Kozaki KI, Karpanen T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 Signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(11):819-825.
44. Lin J, Lalani AS, Harding TC, et al. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res.* 2005; 65(15):6901-6909.

45. Zhang D, Li B, Shi J, et al. Suppression of tumor growth and metastasis by simultaneously blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and VEGF-C with a receptor-immunoglobulin fusion protein. *Cancer Res.* 2010; 70(6):2495-2503.
46. Xie Y, Bagby TR, Cohen MS, et al. Drug Delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. *Expert Opin Drug Delivery.* 2009; 6(8):785-792.
47. Singh I, Swami R, Khan W, et al. Lymphatic system: a prospective area for advanced targeting of particulate drug carriers. *Expert Opin Drug Delivery.* 2014; 11(2):211-229.
48. Khan AA, Mudassir J, Mohtar N, et al. Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations. *Int J Nanomed.* 2013; 8:2733-2744.
49. Cueni LN, Detmar M. The lymphatic system in health and disease. *Lymphatic Res Biol.* 2008; 6(3-4):109-122.
50. Ashikaga T, Krag DN, Land SR, et al. Morbidity results from the NSABP B-32 trial comparing sentinel lymph node dissection versus axillary dissection. *J Surg Oncol.* 2010; 102(2):111-118.
51. Fife K, Thompson JF. Lymph-node metastases in patients with melanoma: what is the optimum management? *Lancet Oncol.* 2001; 2(10):614-621.
52. Zhang XY, Lu WY. Recent advances in lymphatic targeted drug delivery system for tumor metastasis. *Cancer Biol Med.* 2014; 11(4):247-254.
53. Ryan GM, Kaminskas LM, Bulitta JB, et al. PEGylated polylysine dendrimers increase lymphatic exposure to doxorubicin when compared to PEGylated liposomal and solution formulations of doxorubicin. *J Control Release.* 2013; 172(1):128-136.
54. Rovera F, Frattini F, Marelli M, et al. Axillary sentinel lymph node biopsy: an overview. *Int J Surg.* 2008; 6:S109-S112.
55. Wang Y, Dong H, Wu H, et al. Improved false negative rate of axillary status using sentinel lymph node biopsy and ultrasound-suspicious lymph node sampling in patients with early breast cancer. *BMC cancer.* 2015; 15(1):382.
56. Porcu EP, Salis A, Gavini E, et al. Indocyanine green delivery systems for tumour detection and treatments. *Biotechnol Adv.* 2016; 34(5):768-89.
57. Giunchedi P, Gavini E, Dionigi P, et al. Selective targeting of liver nodules. Present situation and new challenges to enhance Indocyanine Green captation from colorectal liver metastases. *Curr Drug Deliv.* 2015; 12(5):474-476.
58. Miura Y, Mikada M, Ouchi T, et al. Early diagnosis of lymph node metastasis: Importance of intranodal pressures. *Cancer Science.* 2016; 107(3):224-232.

59. Emile SH, Elfeki H, Shalaby M, et al. Sensitivity and specificity of indocyanine green near-infrared fluorescence imaging in detection of metastatic lymph nodes in colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *J Surg Oncol.* 2017; 116:730–740.
60. Guo J, Yang H, Wang S, et al. Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green, blue dye, and their combination in breast cancer patients: a prospective cohort study. *World J Surg Oncol.* 2017; 15(1):196.
61. Taşkın S, Şükür YE, Altın, D, et al. Laparoscopic near-infrared fluorescent imaging as an alternative option for sentinel lymph node mapping in endometrial cancer: A prospective study. *Int J Surg.* 2017; 47:13-17.
62. Proulx ST, Luciani P, Dieterich LC, et al. Expansion of the lymphatic vasculature in cancer and inflammation: new opportunities for *in vivo* imaging and drug delivery. *J Control Release.* 2013; 172(2):550-557.
63. Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, et al. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer.* 2006; 107(3):459-466.
64. Li T, Zhang Y, Meng YP, et al. miR-542-3p Appended Sorafenib/All-trans Retinoic Acid (ATRA)-Loaded Lipid Nanoparticles to Enhance the Anticancer Efficacy in Gastric Cancers. *Pharm Res.* 2017; 34(12):2710-2719.
65. He Z, Huang J, Xu Y, et al. Co-delivery of cisplatin and paclitaxel by folic acid conjugated amphiphilic PEG-PLGA copolymer nanoparticles for the treatment of non-small lung cancer. *Oncotarget.* 2015; 6(39):42150-42168.
66. Yang Y, He L, Liu Y, et al. Promising nanocarriers for PEDF gene targeting delivery to cervical cancer cells mediated by the over-expressing FR α . *Sci. Rep.* 2016; 6:32427.
67. Li J, Wu C, Hou P, et al. One-pot preparation of hydrophilic manganese oxide nanoparticles as T1 nano-contrast agent for molecular magnetic resonance imaging of renal carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Biosens Bioelectron.* 2018; 102:1-8.
68. Jaskula-Sztul R, Chen G, Dammalapati A, et al. AB3-loaded and tumor-targeted unimolecular micelles for medullary thyroid cancer treatment. *J Mater Chem B.* 2017; 5(1):151-159.
69. Ryan GM, Kaminskas LM, Porter CJ. Nano-chemotherapeutics: maximising lymphatic drug exposure to improve the treatment of lymph-metastatic cancers. *J Control Release.* 2014; 193:241-256.
70. Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release.* 2010; 148(2):135-146.

71. Maeda H, Tsukigawa K, Fang J. A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors: next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy-problems, solutions, and prospects. *Microcirculation*. 2016; 23(3):173-182.
72. Matsumura Y, Maeda HA. New concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986; 46(12):6387-6392.
73. Greish K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J Drug Targeting*. 2007; 15(7-8):457-464.
74. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting in cancer nanotechnology: methods and protocols. *Cancer Nanotechnology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, New York (NY): Humana Press; 2010; 624:25-37.
75. Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, et al. Nanodrug delivery: is the enhanced permeability and retention effect sufficient for curing cancer? *Bioconjug Chem*. 2016; 27(10):2225-2238.
76. Hawley AE, Davis SS, Illum L. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics. *Adv Drug Delivery Rev*. 1995; 17(1):129-148.
77. Nune SK, Gunda P, Majeti BK, et al. Advances in lymphatic imaging and drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev*. 2011; 63(10-11):876-885.
78. Reddy ST, Van Der Vlies AJ, Simeoni E, et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol*. 2007; 25:1159-1164.
79. Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, et al. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection.:II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1997; 1328(2):261-272.
80. Wiig H, Swartz MA. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiol Rev*. 2012; 92(3):1005-1060.
81. Bagby TR, Duan S, Cai S, et al. Lymphatic trafficking kinetics and near-infrared imaging using star polymer architectures with controlled anionic character. *Eur J Pharm Sci*. 2012; 47(1):287-294.
82. Kaminskis LM, Porter CJ. Targeting the lymphatics using dendritic polymers (dendrimers). *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63(10):890-900.

83. Rao DA, Forrest ML, Alani AW, et al. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery. *J Pharm Sci.* 2010; 99(4):2018-2031.
84. Supersaxo A, Hein WR, Steffen H. Effect of molecular weight on the lymphatic absorption of water-soluble compounds following subcutaneous administration. *Pharm Res.* 1990; 7(2):167-169.
85. Bagby TR, Cai S, Duan S, et al. Impact of molecular weight on lymphatic drainage of a biopolymer-based imaging agent. *Pharmaceutics.* 2012; 4(2):276-295.
86. Trubetskoy VS, Torchilin VP. New approaches in the chemical design of Gd-containing liposomes for use in magnetic resonance imaging of lymph nodes. *J Liposome Res.* 1994; 4(2):961-980.
87. Lundberg BB, Griffiths G, Hansen HJ. Cellular association and cytotoxicity of anti-CD74-targeted lipid drug-carriers in b lymphoma cells. *J Control Release.* 2004; 94(1):155-161.
88. Lawson KA, Anderson K, Snyder RM, et al. Novel vitamin E Analogue and 9-nitro-camptothecin administered as liposome aerosols decrease syngeneic mouse mammary tumor burden and inhibit metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004; 54(5):421-431.
89. Shmeeda H, Mak L, Tzemach D, et al. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(4):818-824.
90. Ichihara H, Ueno J, Umebayashi M, et al. Chemotherapy with hybrid liposomes for acute lymphatic leukemia leading to apoptosis *in vivo*. *Int J Pharm.* 2011; 406(1-2):173-178.
91. Cai S, Yang Q, Bagby TR, et al. Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Delivery Rev.* 2011; 63(10-11):901-908.
92. Toyota T, Fujito H, Suganami A, et al. Near-infrared-fluorescence imaging of lymph nodes by using liposomally formulated indocyanine green derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22(2):721-727.
93. Yan Z, Zhan C, Wen Z, et al. LyP-1-conjugated doxorubicin-loaded liposomes suppress lymphatic metastasis by inhibiting lymph node metastases and destroying tumor lymphatics. *Nanotechnology.* 2011; 22(41):415103- 415111.
94. Ye T, Zhang H, Chen G, et al. Fluorescent molecular imaging of metastatic lymph node using near-infrared emitting low molecular weight heparin modified nanoliposome based on enzyme-substrate interaction. *Contrast Media Mol Imaging.* 2016; 11(6):842-891.

95. Xiao K, Luo J, Li Y, et al. PEG-oligocholic acid telodendrimer micelles for the targeted delivery of doxorubicin to B-cell lymphoma. *J Control Release*. 2011; 155(2):272-281.
96. Rafi M, Cabral H, Kano MR, et al. Polymeric micelles incorporating (1, 2-diaminocyclohexane) platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis. *J Control Release*. 2012; 159(2):189-196.
97. Lee C, Kim J, Zhang Y, et al. Dual-color photoacoustic lymph node imaging using nanoformulated naphthalocyanines. *Biomaterials*. 2015; 73:142-148.
98. Kobayashi H, Kawamoto S, Brechbiel MW, et al. Detection of lymph node involvement in hematologic malignancies using micromagnetic resonance lymphangiography with a gadolinium-labeled dendrimer nanoparticle. *Neoplasia*. 2005; 7(11):984-991.
99. Koyama Y, Talanov VS, Bernardo M, et al. A dendrimer-based nanosized contrast agent dual-labeled for magnetic resonance and optical fluorescence imaging to localize the sentinel lymph node in mice. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 25(4):866-871.
100. Cai S, Xie Y, Bagby TR, et al. Intralymphatic chemotherapy using a hyaluronan-cisplatin conjugate. *J Surg Res*. 2008; 147(2):247-252.
101. Cohen MS, Cai S, Xie Y, et al. A novel intralymphatic nanocarrier delivery system for cisplatin therapy in breast cancer with improved tumor efficacy and lower systemic toxicity *in vivo*. *Am J Surg*. 2009; 198(6):781-786.
102. Cai S, Xie Y, Davies NM, et al. Pharmacokinetics and disposition of a localized lymphatic polymeric hyaluronan conjugate of cisplatin in rodents. *J Pharm Sci*. 2010; 99(6):2664-2671.
103. Lee EH, Kim JK, Lim JS, et al. Enhancement of indocyanine green stability and cellular uptake by incorporating cationic lipid into indocyanine green-loaded nanoemulsions. *Colloids Surf B*. 2015; 136:305-313.
104. Mok H, Jeong H, Kim SJ, et al. Indocyanine green encapsulated nanogels for hyaluronidase activatable and selective near infrared imaging of tumors and lymph nodes. *Chem Commun*. 2012; 48:8628-8630.
105. Yang F, Jin C, Yang D, et al. Magnetic functionalised carbon nanotubes as drug vehicles for cancer lymph node metastasis treatment. *Eur J Cancer*. 2011; 47(12):1873-1882.
106. Kobayashi H, Ogawa M, Kosaka N, et al. Multicolor imaging of lymphatic function with two nanomaterials: quantum dot-labeled cancer cells and dendrimer-based optical agents. *Nanomedicine*. 2009; 4(4):411-419.

107. Rhyner MN, Smith AM, Gao X, et al. Quantum dots and multifunctional nanoparticles: new contrast agents for tumor imaging. *Nanomedicine*. 2006; 1(2):209-217.
108. Cho K, Wang XU, Nie S, et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(5):1310-1316

CAPITOLO II

Nanoparticelle per la diagnosi e il trattamento di metastasi linfatiche: una visione dal punto di vista della via di somministrazione

Abstract

I vasi linfatici rappresentano la via preferenziale attraverso la quale molti tumori solidi disseminano le loro metastasi nell'organismo. La visualizzazione e l'eliminazione delle cellule tumorali presenti nel sistema linfatico è un importante obiettivo da raggiungere. Le nanoparticelle, grazie alle loro ridotte dimensioni e ad altre importanti caratteristiche chimico-fisiche, sono dei veicoli ideali per il trasporto di agenti di contrasto e di farmaci nel sistema linfatico. In questo lavoro, è stata data una visione dei vari tipi di sistemi nanoparticellari utilizzati per la diagnosi e il trattamento di metastasi linfatiche. In particolare è stata effettuata una classificazione di questi sistemi sulla base della via di somministrazione utilizzata.

1 Vie di somministrazione utilizzate per il raggiungimento delle metastasi linfatiche: considerazioni generali

La scelta della via di somministrazione gioca un ruolo fondamentale per la veicolazione di farmaci e di agenti diagnostici nelle metastasi linfatiche. Generalmente, per la somministrazione di farmaci chemioterapici la via più utilizzata è quella endovenosa (EV). Non sempre però la veicolazione di farmaci al sistema linfatico (SL) mediante infusione EV è efficiente, a causa di un ridotto assorbimento linfatico [1].

Una strategia per incrementare l'accumulo di farmaci nel SL è quella di incapsularli all'interno di nanoparticelle (NPs) le quali, hanno dimensioni idonee per subire uno stravasamento dai vasi sanguigni. In genere, il limite dimensionale massimo perché le NPs possano subire stravasamento è di 200 nm, anche se, per i vari tipi di tumore, sono state riportate delle differenze nelle dimensioni delle fenestrazioni dei capillari [2]. Affinché le NPs possano raggiungere il SL dopo somministrazione EV, è infatti necessario che fuoriescano dai vasi sanguigni nello spazio interstiziale, dal quale vengono successivamente drenate all'interno dei linfonodi mediante i vasi linfatici. Quest'ultimo passaggio è controllato dalle dimensioni delle NPs; per avere un drenaggio efficiente sono necessarie dimensioni particellari inferiori a 80-100 nm. Nel 2013, Quin et al. hanno dimostrato che micelle di polietilenglicole caricate con Doxorubicina e Vinorelbina, con diametro di circa 14 nm, erano capaci di attraversare le pareti dei vasi sanguigni e di accumularsi nel SL [3]. Un accumulo all'interno dei linfonodi è stato riportato anche per micelle polimeriche contenenti (1,2-diamminocicloesano) platino(II) caratterizzate da diametro di circa 50 nm [4].

La somministrazione interstiziale (sottocutanea, intramuscolare e intradermica) è una via alternativa attraverso la quale i vari sistemi colloidali possono essere drenati dal sito d'iniezione ai linfonodi, senza subire un precedente assorbimento all'interno dei vasi sanguigni. La somministrazione sottocutanea è abbastanza semplice da eseguire e viene utilizzata per modificare il profilo di rilascio delle sostanze e per veicolare molecole con ridotta biodisponibilità orale. I liposomi somministrati per via sottocutanea possono essere utilizzati per la veicolazione di farmaci, sostanze per diagnostica e immunomodulatori ai linfonodi regionali. Vari parametri come le dimensioni e il sito d'iniezione influenzano la captazione linfatica di questo tipo di formulazione. In

generale, i piccoli liposomi (<100 nm) sono meglio assorbiti, a livello linfatico, rispetto a quelli di grosse dimensioni. Questo, come spiegato nel Capitolo I, sembra essere dovuto alla particolare organizzazione dello spazio interstiziale. Le particelle di piccole dimensioni riescono ad attraversare facilmente i canali acquosi presenti nell'interstizio, mentre quelle più grandi restano bloccate nel sito d'iniezione. Anche le differenze anatomiche tra i vari siti d'iniezione sono importanti per il drenaggio delle particelle dallo spazio interstiziale per mezzo dei vasi linfatici [5, 6]. Alcuni autori hanno riportato che piccole NPs con diametro di 25 nm, quando veicolate per via intradermica riescono ad accumularsi all'interno dei linfonodi in modo più efficiente di quelle di dimensioni maggiori (100 nm), suggerendo anche l'utilizzo della somministrazione intradermica per il raggiungimento di un bersaglio linfatico [7].

La via di somministrazione orale è certamente quella maggiormente accettata dai pazienti poiché consente di evitare gli svantaggi associati alla somministrazione parenterale ma anche i rischi d'infezione, dolore ed extravasazione [1]. I vasi linfatici presenti nell'intestino tenue giocano un ruolo molto importante nell'assorbimento di molecole lipofile somministrate oralmente. Il trasporto linfatico intestinale consente di migliorare la biodisponibilità di farmaci con elevato metabolismo di primo passaggio epatico in quanto permette un accesso diretto al sistema circolatorio, senza passare per il fegato [8]. La linfa, dal tratto gastro-intestinale, viene raccolta nel dotto toracico e raggiunge la circolazione sanguigna in corrispondenza della vena succlavia. Attraverso il trasporto linfatico intestinale anche i nanosistemi costituiti da lipidi possono facilmente entrare nel circolo sanguigno. In questo passaggio, il tessuto linfoide associato all'intestino, noto anche come GALT (acronimo dell'inglese Gut-Associated Lymphoid Tissue), che include le placche di Peyer's e le cellule M, è rilevante. I "nano-drug delivery systems" di tipo lipidico vengono studiati per la veicolazione di sostanze, attraverso la via orale, nei linfonodi mesenterici, mediastinici e paraortici.

Anche la somministrazione intraperitoneale ha ricevuto particolare attenzione per il raggiungimento del SL. In uno studio pubblicato da Parker et al. è stata valutata la distribuzione tissutale e l'accumulo linfatico di Adriamicina (ADR) libera e di liposomi caricati con ADR dopo somministrazione intraperitoneale nei ratti. I risultati di questo studio hanno mostrato che i liposomi sono stati drenati dalla cavità peritoneale

attraverso i capillari linfatici e veicolati nei linfonodi [9]. Akamo et al. hanno dimostrato la capacità dei liposomi caricati con ADR di rilasciare selettivamente il farmaco nei linfonodi regionali di pazienti affetti da cancro gastrico. I liposomi sono stati somministrati nella mucosa gastrica, mentre come controllo è stata utilizzata una infusione EV di farmaco libero. Elevate concentrazioni di ADR sono state ritrovate nei linfonodi primari e secondari (i più inclini allo sviluppo di metastasi) dopo la somministrazione dei liposomi, al contrario l'infusione EV del farmaco ha portato ad una distribuzione non specifica di ADR nei linfonodi [10].

La struttura anatomica e il flusso unidirezionale della linfa devono essere presi in considerazione quando si scelgono la via e il sito d'iniezione per raggiungere una specifica localizzazione linfatica.

Esempi di sistemi nanoparticellari utilizzati per metastasi linfatiche e classificati sulla base della via di somministrazione sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Sistemi di veicolazione basati su NPs per la diagnosi e/o il trattamento di metastasi linfatiche.

Via di somministrazione	Tipologia di NPs	Applicazione	Tumore di origine delle metastasi	Ref.	
<i>Somministrazione endovenosa</i>	FSHP-NPs	Chemioterapia	Carcinoma ovarico	11	
	USPIO	RMI	Cancro endometriale e cervicale	13	
	USPIO	RMI-PET/CT	Cancro VX2	14	
	USPIO	RMI	Cancro al seno	15	
	USPIO	RMI	Cancro al seno	16	
	USPIO	RMI	Cancro alla prostata e alla vescica	17	
	USPIO	RMI	Cancro VX2	18	
	USPIO	RMI	Melanoma	19	
	USPIO	RMI	Cancro VX2	20	
	NPs linfotrofiche	LNMRI	Cancro al testicolo	22	
	NPs linfotrofiche	LNMRI	Cancro alla prostata	23	
	NPs linfotrofiche	LNMRI	Cancro alla prostata	24	
	NPs linfotrofiche	LNMRI	Cancro alla prostata	25	
	SERS-NPs	SERS imaging	Cancro alla prostata	26	
	LCP-NPs	Chemioterapia/ SPECT-CT imaging	Cancro al seno	27	
	<i>Somministrazione interstiziale</i>				
	Somministrazione sottocutanea	NPs di carbone	Chemioterapia/ diagnosi metastasi	Cancro al seno	28
NPs di carbone		Diagnosi metastasi	Cancro al seno	29	

	SLN	Chemioterapia/ diagnosi metastasi	Cancro al seno	30
	SPIO	PA imaging	-	31
	SPIO	PA imaging	Adenocarcinoma prostatico	32
	Gd-NPs	RMI	Melanoma	33
	NCs lipidiche	Chemioterapia	Cancro polmonare	34
	NCs polimeriche	Chemioterapia	Cancro polmonare	35
Somministrazione intradermica	NPs pH sensibili	Chemioterapia	-	36
	NPs adiuvanti	Chemioterapia	Melanoma	37
	DTX/FPR-675NPs	Imaging a fluorescenza / chemioterapia	Tumore SCC7	38
Somministrazione interstiziale nella zampa del ratto	Cy5 –NPs	Imaging a fluorescenza	-	39
	GO-IONPs	RMI/PTT	Cancro al pancreas	40
<i>Somministrazione orale</i>	SLN	Assorbimento linfatico intestinale	-	41
	NCs polimeriche	Assorbimento linfatico intestinale	-	42
	NCs polimeriche	Assorbimento linfatico intestinale	-	43
<i>Somministrazione intraperitoneale</i>	PTX-NPs	Chemioterapia	Cancro ovarico	44
	SPIO	RMI	-	45
<i>Altre vie di somministrazione</i> Somministrazione duodenale e orale	SLN	Chemioterapia	-	46
Iniezione nella sottomucosa	USPIO	RMI	Tumore cervice uterina	47
	USPIO	RMI / terapia ipertermica	Tumore seno piriforme	48
	NPs di carbone	Diagnosi metastasi	Cancro rettale	49
Iniezione nella sottosierosa	NPs di carbone	Diagnosi metastasi	Cancro del colon-retto	50
Iniezione nella tiroide	NPs di carbone	Diagnosi metastasi	Carcinoma della tiroide	51
	NPs di carbone	Diagnosi metastasi	Carcinoma della tiroide	52

NPs: nanoparticelle; FSHP-NPs: nanoparticelle coniugate con il polipeptide dell'ormone follicolo-stimolante; USPIO: ultranoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro; RMI: risonanza magnetica per immagini; PET/CT: tomografia ad emissione di positroni combinata con la tomografia computerizzata; LNMRI: risonanza

magnetica con NPs linfotrofiche ; SERS: spettroscopia Raman amplificata da superfici; LCP-NPs: nanoparticelle lipidiche di fosfato di calcio; SPECT-CT: tomografia ad emissione di fotone singolo single; SLN: nanoparticelle solide lipidiche; SPIO: nanoparticelle supermagnetiche di ossido di ferro; PA: imaging fotoacustico; Gd-NPs: nanoparticelle di gadolinio; NCs: nanocapsule; DTX/FPR-675- NPs: docetaxel-flamma-nanoparticelle; GO-IONP: nanoparticelle di ossido di ferro modificate con ossido di grafene; PTX-NPs: nanoparticelle di paclitaxel;

2 Via di somministrazione endovenosa

La via di somministrazione EV viene utilizzata comunemente, sia per la rapidità con cui compare l'effetto dei farmaci, che per l'elevata biodisponibilità. Con questo tipo di somministrazione i farmaci raggiungono direttamente il sistema circolatorio senza subire delle modifiche. Come detto prima, un ostacolo difficile da superare è la veicolazione selettiva di chemioterapici o di agenti diagnostici all'interno di linfonodi contenenti cellule cancerogene. Per questo motivo sono state utilizzate numerose formulazioni basate su NPs.

Fan et al. hanno utilizzato un polipeptide dell'ormone follicolo-stimolante (FSHP) per preparare delle NPs coniugate, indicate come FSHP-NPs. Questi sistemi erano destinati ai recettori dell'ormone follicolo-stimolante (FSHR) sovraespressi nelle cellule metastatiche del tumore ovarico. Il FSHR è un recettore accoppiato a proteine G presente in grosse quantità nel sistema riproduttore femminile. Il polipeptide è stato sintetizzato, mentre le NPs sono state preparate utilizzando la tecnica dell'emulsione con evaporazione del solvente. Per ottenere le FSHP-NPs, una miscela di NPs e di polipeptide è stata preparata sotto agitazione magnetica e la formulazione coniugata è stata testata su cellule presentanti il FSHR per valutarne la captazione. In seguito le stesse NPs coniugate sono state caricate con il Paclitaxel e la loro attività antitumorale è stata valutata sia *in vitro* sia *in vivo*. Le NPs cariche sono state veicolate per via EV nei ratti, e i risultati ottenuti hanno mostrato che esse erano effettivamente capaci di veicolare il farmaco nei linfonodi, riducendo la proliferazione delle cellule metastatiche [11].

La via di somministrazione EV è stata oggetto di studio per la visualizzazione e la diagnosi delle metastasi linfatiche. Le ultrananoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro (USPIO) sono state utilizzate come agenti di contrasto per il SL a partire dal

1990. Sono delle particelle con diametro compreso tra 30 e 1000 nm, con dimensioni sufficientemente ridotte per attraversare la parete dei capillari linfatici. Vengono utilizzate come agenti di contrasto per somministrazione EV nella risonanza magnetica per immagini (RMI) per migliorare la diagnosi delle metastasi linfatiche [12]. Vari ricercatori hanno proposto l'uso delle USPIO per "l'imaging" linfatico. Un nuovo tracciante specifico per i linfonodi, chiamato femoxtran-10, costituito da USPIO è stato utilizzato per visualizzare le metastasi linfatiche in donne affette da cancro endometriale e cervicale. Lo studio è stato eseguito su 146 pazienti e la RMI è stata eseguita sia prima che dopo la somministrazione del femoxtran-10. La somministrazione del tracciante ha portato a un incremento della sensibilità della RMI indicando che esso può essere utile sia nella fase pre-operatoria che durante il trattamento chirurgico [13]. Choi et al. hanno studiato la rappresentazione dei linfonodi affetti da metastasi, confrontando le USPIO associate alla RMI (USPIO-RMI) con la tomografia ad emissione di positroni combinata con la tomografia computerizzata (PET/CT). Lo studio è stato effettuato in modelli animali di cancro VX2. La RMI è stata eseguita 24 ore dopo la somministrazione di USPIO, seguita dalla PET/CT. La specificità e la sensibilità ottenute utilizzando le due tecniche di diagnosi erano differenti. I valori di specificità e di sensibilità trovati erano di 95% e 91% rispettivamente per le USPIO-MRI e di 98% e 64% per la PET/CT [14]. Altri studi clinici sono stati effettuati per valutare l'utilità della RMI associata alle USPIO. In un lavoro effettuato nel 2007 queste particelle sono state utilizzate nella valutazione delle metastasi ascellari nei linfonodi di pazienti con tumore al seno. La formulazione è stata somministrata per via EV e, dopo aver raggiunto l'interstizio, le USPIO sono state internalizzate dai macrofagi e drenate ai linfonodi dai vasi linfatici. Nello studio sono state comparate varie tecniche di diagnosi: la tradizionale RMI basata sul criterio morfologico e dimensionale, la combinazione delle immagini ottenute sia prima che dopo la somministrazione del mezzo di contrasto e l'analisi effettuata dopo la somministrazione delle USPIO. Dai risultati è emerso che non vi erano differenze tra lo studio combinato e quello effettuato dopo la somministrazione dell'agente di contrasto, indicando che quest'ultima tecnica, meno complicata e costosa può essere utilizzata per la diagnosi delle metastasi linfatiche [15]. La potenzialità delle USPIO associate alla RMI nella valutazione dello stadio del

tumore al seno è stata valutata anche in altri lavori [16]. Nel cancro alla prostata e alla vescica la diagnosi precoce di metastasi linfatiche è fondamentale per una prognosi positiva. La linfoadenectomia pelvica è uno dei principali approcci per l'individuazione di metastasi linfatiche in pazienti con cancro urogenitale. Per migliorare la diagnosi di queste metastasi è stato introdotto l'utilizzo delle USPIO, le quali hanno permesso di visualizzare le lesioni presenti all'interno dei linfonodi e di guidare il chirurgo nell'asportazione [17]. Yoo et al. hanno studiato un nuovo mezzo diagnostico costituito da NPs di ossido di ferro rivestite con dei particolari ligandi formati da derivati del polietilenglicole. Le particelle (diametro 13 nm) sono state somministrate per via EV in modelli murini di tumore VX2, utilizzando tre differenti dosi. Elevati valori di sensibilità e di specificità (100% e 89% rispettivamente) sono stati individuati utilizzando una dose di NPs pari a 10.4 mg Fe/Kg [18]. Un altro mezzo di contrasto basato su USPIO, il P904, è stato proposto dagli stessi autori. Generalmente questo agente si utilizza "nell'imaging" dei macrofagi, mentre i ricercatori hanno cercato di determinarne la dose ideale da utilizzare nella RMI. Essi hanno individuato come dose ottimale 300 μmol Fe/kg, la quale è stata quindi suggerita per migliorare l'identificazione delle metastasi linfatiche [19]. L'utilità delle USPIO nella visualizzazione delle metastasi linfonodali è stata ulteriormente investigata anche in un lavoro del 2016. Sono stati effettuati degli studi di "imaging" dinamico 3D per quantificare le USPIO all'interno dei linfonodi sia prima che dopo la somministrazione in animale e dai risultati è emerso ancora una volta come questi sistemi magnetici migliorino la RMI [20].

Tra le particelle magnetiche a base di ossidi di ferro si possono includere anche le NPs linfotrofiche. Esse sono una classe di agenti di contrasto magnetici, formate da un core monocristallino di ossido di ferro, rivestito da polimeri biodegradabili come il destrano, che evitano l'aggregazione delle particelle e ne aumentano il tempo di circolazione. Inizialmente sono state sviluppate per "l'imaging" del fegato, successivamente è stato visto che, grazie alle ridotte dimensioni, queste particelle possono diffondere attraverso i capillari e vengono trattenute all'interno dei linfonodi [21]. Perciò si è pensato di studiarne il potenziale come agente di contrasto per un nuovo metodo non invasivo, la risonanza magnetica con NPs linfotrofiche (LNRMI). I classici trattamenti per il tumore

al testicolo comprendono la chemioterapia, la radioterapia e la linfadenectomia pelvica che dà importanti informazioni sullo stadio del tumore. Per la diagnosi delle metastasi presenti all'interno dei linfonodi pelvici si utilizzano vari metodi come la tomografia computerizzata addominale/pelvica e la linfongiografia, tuttavia nessuno si è rivelato essere ottimale e nuove strategie sono necessarie. Harisinghani et al. hanno dimostrato che la LNRMI è un metodo non invasivo e accurato per la rivelazione di metastasi linfatiche in pazienti affetti da tumore al testicolo [22]. In precedenza gli stessi autori avevano dimostrato l'utilità di questo metodo diagnostico anche per metastasi linfatiche originanti da cancro alla prostata. Un tumore alla prostata maligno può metastatizzare ai linfonodi del bacino e le tecniche usate fino allora per la determinazione di queste lesioni maligne, presentavano vari problemi. La procedura di diagnosi standard, basata sul criterio dimensionale, la classica RMI e la tomografia computerizzata mostravano una scarsa sensibilità nel riconoscimento di metastasi con dimensioni inferiori a 1 cm. Lo studio è stato effettuato su 80 pazienti i quali sono stati sottoposti a RMI prima e 24 h dopo la somministrazione EV delle NPs linofotrofiche. I risultati, confrontati con quelli ottenuti da analisi istopatologiche, hanno rivelato l'efficacia della LNRMI nell'identificazione delle metastasi linfatiche [23]. La LNRMI è stata studiata anche su pazienti con cancro alla prostata in stadio avanzato. In alcuni pazienti le precedenti analisi avevano portato a risultati negativi, mentre con la LNRMI è stato possibile individuare delle cellule tumorali prima non identificate. Inoltre, questa tecnica ha portato alla visualizzazione di metastasi presenti all'interno di linfonodi che, attraverso il criterio standard, non erano apparse visibili [24]. L'utilità della LNRMI per la stadiazione del tumore alla prostata è stata riportata anche da Fortuin et al. [25].

Recentemente è stata introdotta, una nuova tecnica "di imaging" per la localizzazione di linfonodi metastatici in pazienti affetti da cancro alla prostata, la spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS). A differenza di altre tecniche basate sulla fluorescenza, essa presenta vari vantaggi come assenza di "photobleaching" (diminuzione della fluorescenza di un campione dovuta alla degradazione fotochimica) ed elevata sensibilità e specificità. Spaliviero et al. hanno utilizzato la SERS, usando come agente di contrasto delle NPs aventi un core di silice ricoperto da uno strato d'oro per differenziare i linfonodi metastatici da quelli sani. Modelli murini di cancro alla

prostata, ottenuti utilizzando le cellule PC-3, sono stati trattati con le SERS-NPs (30 mol/g per via EV). Queste ultime si sono rivelate capaci di localizzarsi selettivamente all'interno dei linfonodi sani e non in quelli con metastasi. Inoltre, nel caso di linfonodi solo parzialmente attaccati da cellule tumorali, le NPs hanno permesso di discriminare tra tessuto sano e malato [26].

Una nuova tipologia di NPs costituite da un core di fosfato di calcio rivestito da lipidi (LCP-NPs) sono state preparate per la veicolazione di farmaci al SL e per la contemporanea diagnosi di metastasi linfatiche, utilizzando come tecnica di “imaging” la tomografia ad emissione di fotone singolo (SPECT). Questo tipo di NPs sono state inizialmente sviluppate per il trasporto del siRNA, ma gli autori pensarono che tutte le sostanze capaci di formare dei precipitati con il core di fosfato di calcio potessero essere inglobate all'interno delle LCP-NPs. L'indio (In) è uno dei radionuclidi più utilizzati e ha la capacità di formare dei precipitati con i fosfati. NPs contenenti indio (^{111}In -LCP-NPs) sono state preparate utilizzando delle microemulsioni acqua in olio e sono state somministrate agli animali. Le immagini ottenute con la SPECT hanno mostrato che la formulazione era capace di attraversare i tessuti, di penetrare nel SL e di accumularsi dentro i linfonodi. In questo modo è stata mostrata l'utilità delle ^{111}In -LCP-NPs sia nella veicolazione di farmaci che nella identificazione delle metastasi [27].

3 Via di somministrazione interstiziale

La via di somministrazione interstiziale ha rappresentato una valida alternativa per la veicolazione di farmaci e di agenti di contrasto al SL. Come detto precedentemente, un tipo di somministrazione interstiziale è rappresentato dalla via sottocutanea la quale è spesso utilizzata per la veicolazione di NPs come ad esempio quelle di carbone, dei nanosistemi caratterizzati da elevata biodisponibilità e bassa tossicità. Una sospensione di NPs di carbone, formata da particelle con diametro di 21 nm e da agenti sospendenti, è stata testata al fine di migliorare l'identificazione dei linfonodi nella dissezione linfonodale ascellare nel trattamento del cancro al seno. Lo studio è stato effettuato su 90 pazienti che sono state suddivise in tre gruppi: il primo gruppo è stato trattato con l'agente tracciante, rappresentato dalle sospensioni di NPs somministrate per via sottocutanea, il secondo gruppo ha ricevuto una sospensione di NPs di carbone caricate

con Epirubicina, infine il terzo gruppo (controllo) non ha avuto nessun tracciante. In seguito alla somministrazione della sospensione, molti dei linfonodi ascellari sono apparsi colorati di nero, rendendo più semplice la loro identificazione, inoltre nel gruppo trattato con le particelle caricate con il farmaco, l'analisi istologica ha evidenziato la presenza di aree di cellule tumorali morte. La sospensione ha quindi mostrato una duplice funzione, sia come tracciante per l'identificazione dei linfonodi, che come sistema per la veicolazione di farmaci per il trattamento dei tumori [28]. Anche in un precedente lavoro è stata dimostrata la capacità delle NPs di carbone di colorare selettivamente i linfonodi, comportandosi perciò da valida guida per il chirurgo nella chirurgia conservativa del carcinoma mammario [29].

NPs solide lipidiche (SLN) caricate con Mitoxantrone (MTO-SLN) sono state sviluppate con l'intento di migliorare il trattamento del tumore al seno e delle sue metastasi linfatiche. Le SLN sono state preparate con la tecnica dell'ultrasonificazione e poi liofilizzate e sterilizzate con ^{60}Co . La caratterizzazione chimico-fisica delle particelle ha portato ai seguenti risultati: diametro di 61 nm, efficacia di incapsulamento pari a 87,23% e contenuto di farmaco del 4,18%. Il test di dissoluzione *in vitro* ha mostrato un rilascio controllato di farmaco mentre, gli studi *in vivo* su modelli animali di cancro al seno, hanno dimostrato che le MTO-SLN riducevano le metastasi linfatiche. Sulla base di questi risultati la formulazione può essere considerata un buon candidato per la veicolazione di chemioterapici nel tumore al seno e nelle sue metastasi [30].

Grootendorst et al. hanno proposto un nuovo agente di contrasto basato su NPs supermagnetiche di ossido di ferro (SPIO), come tracciante per "l'imaging" fotoacustico dei linfonodi. Le NPs sono state somministrate per via sottocutanea e tramite l'analisi fotoacustica, è stato possibile osservare il tragitto delle SPIO attraverso i vasi linfatici, verso i linfonodi regionali [31]. Gli stessi autori, in un altro lavoro, hanno ulteriormente confermato l'utilità delle SPIO come agente di contrasto "nell'imaging" fotoacustico per la visualizzazione dei linfonodi metastatici [32].

NPs di gadolinio (Gd-NPs) sono state preparate come mezzi di contrasto per la RMI per poter valutare eventuali variazioni nel drenaggio linfatico in linfonodi metastatici. Varie tipologie di Gd-NPs (Gd-NPs lipidiche, Gd-NPs a basso peso molecolare e Gd-NPs

funzionalizzate con albumina) sono state somministrate per via sottocutanea in modelli murini di melanoma. Tutte le formulazioni somministrate sono state captate selettivamente dai linfonodi drenanti [33].

Per il trattamento del tumore polmonare non a piccole cellule, Wauthoz et al. hanno incapsulato il profarmaco Gemcitabina all'interno di nanocapsule lipidiche. La formulazione ottenuta aveva la capacità di formare un idrogel dopo l'incorporazione del farmaco. Le nanocapsule lipidiche sono state somministrate sia per via sottocutanea che EV, inoltre sono state iniettate anche delle micelle contenenti la Gemcitabina. I risultati dell'esperimento hanno mostrato come le nanocapsule iniettate per via sottocutanea abbiano raggiunto i linfonodi mediastinici espletando una spiccata attività antitumorale. Inoltre questa azione chemioterapeutica era molto simile sia a quella dei sistemi iniettati per via EV che a quella delle micelle [34].

In un recente lavoro Borrajo et al. hanno sintetizzato delle nanocapsule formate da acido glutammico e da polietilenglicole, caricate con Docetaxel, per l'eradicazione delle cellule tumorali che diffondono attraverso il SL. Le nanocapsule avevano un diametro di 100 nm e la loro biodistribuzione è stata valutata confrontando la somministrazione sottocutanea e quella EV. Un maggiore accumulo nel SL è stato ottenuto dopo la somministrazione sottocutanea; l'attività antitumorale è stata valutata in modelli murini di tumore al polmone che diffondono le loro metastasi attraverso i linfonodi mediastinici. Le nanocapsule hanno mostrato elevata azione citotossica nei confronti delle cellule tumorali e ridotta tossicità nei tessuti sani, inoltre, rispetto a una soluzione di Docetaxel presente in commercio, hanno portato ad una maggiore eliminazione delle metastasi [35].

La somministrazione intradermica è stata proposta per la veicolazione di NPs ai linfonodi caratterizzati dalla presenza di metastasi. Delle NPs sensibili al pH, costituite da cumarina e monomeri di metacrilato di metile, sono state sviluppate per valutare il rilascio di farmaci chemioterapici nei linfonodi mesenterici e inguinali in maiali Yorkshire. Le NPs hanno attraversato abbastanza facilmente il SL, rivelandosi appropriate per un rilascio selettivo di farmaci nei linfonodi [36].

Un'altra strategia di trattamento dei tumori è rappresentata dall'immunoterapia, la quale viene utilizzata per stimolare l'uccisione di cellule cancerogene da parte del sistema

immunitario di pazienti affetti da tumore. Spesso, i linfonodi sono stati utilizzati come bersaglio per farmaci oncologici immunoterapici. Thomas et al. hanno progettato delle NPs capaci di veicolare cellule dendritiche nei linfonodi metastatici, dopo somministrazione intradermica. Le NPs sono state prodotte utilizzando il metodo dell'emulsione inversa inoltre il farmaco Paclitaxel e l'adiuvante CpG vi sono stati incorporati all'interno. Le NPs hanno raggiunto facilmente i linfonodi inducendo la maturazione delle cellule dendritiche, inoltre, favorendo la stimolazione antigenica, hanno portato a una riduzione della crescita tumorale [37].

Con lo scopo di migliorare l'identificazione del tumore primario e delle sue metastasi linfatiche, Oh et al. hanno preparato delle NPs caricate con il Docetaxel e funzionalizzate con il Flamma (FPR-675), un mezzo diagnostico fluorescente. Il percorso delle NPs all'interno dell'organismo, dopo somministrazione intradermica e sistemica nei ratti, è stato osservato utilizzando "l'imaging" a fluorescenza nel vicino infrarosso. Le NPs si sono accumulate all'interno del tumore primario e nelle sue metastasi linfatiche, inoltre la fluorescenza era maggiore negli animali affetti da tumore rispetto ai controlli sani. Gli studi di citotossicità *in vivo* hanno evidenziato ridotti effetti collaterali, indicando che questi sistemi possono essere proposti per la veicolazione contemporanea di farmaci al tumore primario e alle metastasi che diffondono attraverso il SL [38].

Chaney et al. hanno sintetizzato delle NP di acido polilattico caricate con un colorante sintetico appartenente alla famiglia delle cianine (Cy5) per valutarne la distribuzione nel SL dopo somministrazione nello spazio interstiziale nella zampa del ratto, un sito ideale per il raggiungimento dei vasi linfatici. Gli autori hanno dimostrato la capacità di questa formulazione di raggiungere i linfonodi metastatici [39]. Questo tipo di somministrazione è stata proposta anche da Wang et al. che hanno preparato delle NPs di ossido di ferro modificate con ossido di grafene (GO-IONPs) per "l'imaging" e la contemporanea terapia fototermica di metastasi linfatiche di tumore al pancreas. Questa formulazione può essere molto utile nel guidare il chirurgo nella distinzione dei linfonodi dal tessuto circostante, in quanto consente una doppia visualizzazione delle strutture linfonodali, sia con una colorazione nera che attraverso la RMI. Inoltre la terapia fototermica ha portato ad una graduale scomparsa delle metastasi [40].

4 Via di somministrazione orale

Recentemente, le NPs solide lipidiche (SLN) sono state oggetto di studio come sistemi per la veicolazione orale di farmaci destinati a un assorbimento da parte dei capillari linfatici presenti nell'intestino. Questo tipo di assorbimento è favorito dal core lipidico di queste NPs che, una volta penetrate all'interno degli enterociti possono stimolare la formazione dei chilomicroni. SLN di Metotrexato (MTX-SLN) formate da differenti lipidi come acido stearico, glicerolo monostearato e Compritol ATO 888 sono state ottenute con il metodo della diffusione del solvente e in seguito caratterizzate. La biodisponibilità *in vivo* è stata determinata valutando la concentrazione di farmaco all'interno dei linfonodi in seguito alla somministrazione orale delle formulazioni. Le SLN costituite dal Compritol ATO 888, rispetto a quelle formate dagli altri lipidi, hanno migliorato la biodisponibilità orale del Metotrexato, probabilmente a causa di un maggiore assorbimento a livello intestinale [41]. Nassar et al. hanno preparato nanocapsule di acido poli(lattico-co-glicolico) incorporate all'interno di microparticelle gastroresistenti, per migliorare la biodisponibilità orale del Docetaxel. Le nanocapsule somministrate per via orale hanno incrementato l'assorbimento del farmaco rispetto a una soluzione di solo Docetaxel somministrata per via EV. Per valutare la distribuzione *in vivo* le nanocapsule di Docetaxel sono state caricate anche con un colorante fluorescente, il NIR 783, e il loro percorso è stato osservato attraverso "l'imaging" a fluorescenza. Le microparticelle hanno rilasciato le nanocapsule, le quali, una volta assorbite nell'intestino si sono accumulate nel SL evitando il metabolismo da parte del tessuto linfoide associato all'intestino. Successivamente sia le nanocapsule cariche che frazioni di farmaco libero sono state rilasciate nella circolazione sanguigna [42]. Anche Attili-Qadri et al. hanno dimostrato l'efficacia delle nanocapsule incorporate all'interno di microparticelle per migliorare la biodisponibilità orale del Docetaxel [43]

5 Via di somministrazione intraperitoneale

La via di somministrazione intraperitoneale è stata utilizzata per veicolare NPs di acido polilattico contenenti Paclitaxel (PTX-NPs), al fine di inibire la diffusione delle metastasi linfatiche associate a cancro ovarico. Il test MTT ha mostrato l'azione

citotossica delle particelle nei confronti delle cellule tumorali. Per gli studi *in vivo*, cellule di tumore ovarico sono state inoculate nei ratti e gli animali sono stati trattati sia con le PTX-NPs sia con farmaco libero, entrambi somministrati per via intraperitoneale. Alla fine dell'esperimento gli animali sono stati sacrificati e sono state asportate le masse tumorali. Per valutare l'attività antitumorale sono stati presi come riferimenti il volume e il peso del tumore, inoltre è stata determinata la concentrazione di farmaco nei linfonodi pelvici. Le PTX-NPs hanno ridotto la crescita tumorale, stimolato l'apoptosi nelle cellule malate e ridotto la proliferazione cellulare. Inoltre è stata ritrovata una maggiore concentrazione linfatica di farmaco negli animali trattati con le NPs rispetto a quelli nei quali è stato somministrato il farmaco libero [44]. La via di somministrazione intraperitoneale è stata proposta anche da Vu-Quang et al. per migliorare la captazione da parte dei macrofagi e la RMI di metastasi linfatiche, utilizzando delle SPIO rivestite con mannano, un polisaccaride con elevata affinità per i recettori del mannosio presenti nelle cellule macrofagiche. Grazie alle ridotte dimensioni, ad una elevata stabilità in acqua e a bassa tossicità, queste NPs si sono dimostrate degli ottimi mezzi di contrasto. La formulazione è stata somministrata nella cavità peritoneale di ratti ed è stata studiata la captazione da parte dei macrofagi. Utilizzando come controllo delle SPIO rivestite con polivinil alcol, le SPIO di mannano hanno mostrato una maggiore affinità per i macrofagi linfatici [45].

6 Altre vie di somministrazione

Oltre a quelle riportate in precedenza, sono state proposte altre vie di somministrazione per veicolare selettivamente i farmaci e le sostanze diagnostiche nelle metastasi linfatiche. Cho et al. hanno preparato delle SLN modificate con D- α -tocoferolo polietilenglicole 1000 succinato per migliorare l'assorbimento intestinale e linfatico del Docetaxel. La formulazione è stata caratterizzata in termini di dimensioni, morfologia, potenziale zeta e sono stati effettuati studi *in vitro* e *in vivo*. Le SLN sono state confrontate con una soluzione di Docetaxel somministrato per via EV e, rispetto a quest'ultima, hanno mostrato un rilascio controllato di farmaco. Per valutare l'assorbimento intestinale e linfatico le SLN sono state somministrate direttamente a livello duodenale, mentre gli effetti tossici sono stati studiati dopo somministrazione

orale. I risultati ottenuti hanno mostrato che le SLN, rispetto alla soluzione di confronto, hanno portato ad un miglioramento della biodisponibilità orale del farmaco e ad un incremento dell'assorbimento intestinale e linfatico [46].

Per ottenere un rilascio locale di NPs è stata utilizzata l'iniezione diretta nella sottomucosa che circonda il tumore. Per migliorare la visualizzazione di lesioni maligne nei linfonodi metastatici da tumore della cervice uterina sono state somministrate delle USPIO in modelli animali di tumore del seno piriforme. L'utilizzo delle USPIO ha permesso di migliorare la sensibilità e la specificità della tecnica di diagnosi utilizzata [47]. Wang et al. hanno proposto le USPIO come sistemi teranostici per diagnosticare e contemporaneamente trattare, grazie alla terapia ipertermica, le metastasi linfatiche del collo in conigli con cancro del seno piriforme. Le NPs sono state iniettate nella mucosa attorno alla massa tumorale e dopo 12 h è stata effettuata la RMI. Per ottenere la temperatura ideale per la terapia ipertermica i conigli sono stati posti all'interno di un campo magnetico alternato. Le USPIO hanno permesso di identificare le metastasi e di distruggere le cellule tumorali [48]. In uno studio clinico del 2015, pazienti affetti da carcinoma del retto sono stati trattati con iniezioni di NPs di carbone nella sottomucosa per migliorare la visualizzazione dei linfonodi [49].

Cai et al. hanno somministrato NPs di carbone nella sottosierosa attorno al tumore in pazienti affetti da cancro colon-rettale. Le particelle hanno permesso di migliorare l'identificazione dei linfonodi, pertanto possono essere proposte come traccianti per la mappatura linfatica [50].

La dissezione dei linfonodi cervicali è uno dei trattamenti più utilizzati nel caso di carcinoma della tiroide, tuttavia questa procedura spesso può causare dei danni nelle ghiandole paratiroidi portando a ipoparatiroidismo. In due studi clinici abbastanza recenti, è stata valutata l'efficacia delle NPs di carbone come traccianti per guidare il chirurgo durante questa pratica. Le NPs sono state iniettate direttamente all'interno della tiroide e, immediatamente, attraverso i vasi linfatici, hanno raggiunto i linfonodi cervicali colorandoli di nero facilitandone la visualizzazione e proteggendo le paratiroidi da eventuali danni [51, 52].

Gli studi riportati in precedenza hanno mostrato il notevole interesse che c'è stato nel corso degli anni nello sviluppo di NPs idonee per la diagnosi e il trattamento di tumori. Nella seguente tabella è riportata una classificazione di tali sistemi sulla base della loro applicazione e della fase di studio.

Tabella 2. Classificazione dei sistemi nanoparticellari per diagnosi e/o trattamento delle metastasi linfatiche sulla base dell'applicazione e della fase di studio.

Applicazione	Via di somministrazione	Fase di studio	Ref.
<i>Diagnostico</i>	Endovenosa	Trial clinico	13
		Sperimentazione con animali	14
		Trial clinico	15
		Trial clinico	16
		Trial clinico	17
		Sperimentazione con animali	18
		Sperimentazione con animali	19
		Sperimentazione con animali	20
		Trial clinico	22
		Trial clinico	23
		Trial clinico	24
		Trial clinico	25
	Sperimentazione con animali	26	
	Interstiziale: sottocutanea	Trial clinico	29
		Sperimentazione con animali	31
Sperimentazione con animali		32	
Sperimentazione con animali		33	
Interstiziale: zampa ratto		Sperimentazione con animali	39
		Intraperitoneale	Sperimentazione con animali
Iniezione nella sottomucosa			Sperimentazione con animali
		Trial clinico	49
Iniezione nella subsierosa	Trial clinico	50	
	Iniezione nella tiroide	Trial clinico	51
Trial clinico		52	
<i>Terapeutico</i>	Endovenosa	Sperimentazione <i>in vitro</i> e con animali	11
		Interstiziale: sottocutanea	Sperimentazione con animali
	Sperimentazione con animali		34
	Sperimentazione con animali		35

	Interstiziale: intradermica	Sperimentazione con animali	36
		Sperimentazione <i>in vitro</i> e con animali	37
	Orale	Sperimentazione con animali	41
		Sperimentazione con animali	42
		Sperimentazione con animali	43
Intraperitoneale	Sperimentazione <i>in vitro</i> e con animali	44	
Duodenale e orale	Sperimentazione <i>in vitro</i> e con animali	46	
<i>Diagnostico e terapeutico</i>	Endovesosa	Sperimentazione con animali	27
	Interstiziale: sottocutanea	Trial clinico	28
	Interstiziale: intradermica	Sperimentazione con animali	38
	Interstiziale: zampa ratto	Sperimentazione con animali	40
	Iniezione nella sottomucosa	Sperimentazione con animali	49

7 Conclusioni

Quando una patologia è presente in un determinato distretto anatomico il principale problema da risolvere è come raggiungerla. Formulazioni a rilascio controllato possono essere somministrate tramite varie vie, come ad esempio quella intra-arteriosa [53, 54], se la patologia si trova in un organo specifico come il fegato. Queste formulazioni possono veicolare degli agenti diagnostici e/o farmaci [55-58]. Le NPs rappresentano un'interessante strategia per il trattamento e la diagnosi di metastasi linfatiche. Numerose vie di somministrazione sono state utilizzate per il raggiungimento del SL e tra queste la via EV è sicuramente quella più comune, soprattutto per "l'imaging" linfatico. Anche la somministrazione interstiziale può essere idonea per favorire l'assorbimento linfatico in quanto, in questo modo, viene evitato l'ingresso delle NPs nel sistema circolatorio. Oltre a queste, altre vie come quella orale e intraperitoneale sono adatte per il raggiungimento del SL.

La nanomedicina è quindi una strategia molto incoraggiante, però nonostante i numerosi risultati ottenuti, sono necessari ulteriori studi per confermare l'efficacia dell'uso delle NPs nella diagnosi ed eradicazione dei tumori. Infatti, nonostante le numerose NPs proposte per la diagnosi e il trattamento di metastasi linfatiche, solo pochi sistemi per scopo diagnostico sono in fase di sperimentazione clinica e solo uno ad attività

terapeutica e diagnostica si trova in questa fase di studio. Per la maggior parte delle NPs per applicazione terapeutica sono stati effettuati solo degli studi *in vivo* su animale e il loro ingresso in sperimentazioni cliniche è ancora lontano.

8 Bibliografia

1. Chaudhary S, Garg T, Murthy RSR, et al. Recent approaches of lipid-based delivery system for lymphatic targeting via oral route. *J Drug Targeting*. 2014; 22(10):871-882.
2. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat nanotechnol*. 2011; 6(12):815-823.
3. Qin L, Zhang F, Lu X, et al. Polymeric micelles for enhanced lymphatic drug delivery to treat metastatic tumors. *J Control Release*. 2013; 171(2):133-142.
4. Cabral H, Makino J, Matsumoto Y, et al. Systemic targeting of lymph node, metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers. *ACS nano*. 2015; 9(5):4957-4967.
5. Oussoren C, Velinova M, Scherphof G, et al. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection: IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1998; 1370(2):259-272.
6. Oussoren C, Storm G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Adv Drug Delivery Rev*. 2001; 50(1-2):143-156.
7. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol*. 2007; 25:1159-1164.
8. Cohen MS, and Forrest ML. Lymphatic drug delivery: therapy, imaging and nanotechnology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63(10-11):865–866.
9. Parker RJ, Hartman KD, Sieber SM. Lymphatic absorption and tissue disposition of liposome-entrapped [¹⁴C] adriamycin following intraperitoneal administration to rats. *Cancer Res*. 1981; 41(4):1311-1317.

10. Akamo Y, Mizuno I, Yotsuyanagi T, et al. Chemotherapy targeting regional lymph nodes by gastric submucosal injection of liposomal adriamycin in patients with gastric carcinoma. *Cancer Sci.* 1994; 85(6):652-658.
11. Fan L, Chen J, Zhang X, et al. Follicle-stimulating hormone polypeptide modified nanoparticle drug delivery system in the treatment of lymphatic metastasis during ovarian carcinoma therapy. *Gynecol Oncol.* 2014; 135(1):125-132.
12. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology.* 1990; 175(2):489-493.
13. Rockall AG, Sohaib SA, Harisinghani MG, et al. Diagnostic performance of nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging in the diagnosis of lymph node metastases in patients with endometrial and cervical cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(12):2813-2821.
14. Choi SH, Moon WK, Hong JH, et al. Lymph node metastasis: ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging versus PET/CT in a rabbit model. *Radiology.* 2007; 242(1):137-143.
15. Harada T, Tanigawa N, Matsuki M, et al. Evaluation of lymph node metastases of breast cancer using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol.* 2007; 63(3):401-407.
16. Michel SC, Keller TM, Fröhlich JM, et al. Preoperative breast cancer staging: MR imaging of the axilla with ultrasmall superparamagnetic iron oxide enhancement. *Radiology.* 2002; 225(2):527-536.
17. Triantafyllou M, Studer UE, Birkhäuser FD, et al. Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide allow for the detection of metastases in normal sized pelvic lymph nodes of patients with bladder and/or prostate cancer. *Eur J Cancer.* 2013; 49(3):616-624.
18. Yoo RE, Choi SH, Cho HR, et al. Magnetic resonance imaging diagnosis of metastatic lymph nodes in a rabbit model: efficacy of PJY10, a new ultrasmall

superparamagnetic iron oxide agent, with monodisperse iron oxide core and multiple-interaction ligands. *PLoS ONE*. 2014; 9(9):e107583.

19. Yoo RE, Cho HR, Choi SH, et al. Optimization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (P904)-enhanced magnetic resonance imaging of lymph nodes: initial experience in a mouse model. *Anticancer Res*. 2014; 34(10):5389-5396.

20. Kim SH, Oh SN, Choi HS, et al. USPIO enhanced lymph node MRI using 3D multi-echo GRE in a rabbit model. *Contrast Media Mol Imaging*. 2016; 11(6):544-549.

21. Saksena MA, Saokar A, Harisinghani MG. Lymphotropic nanoparticle enhanced MR imaging (LNMRI) technique for lymph node imaging. *Eur J Radiol*. 2006; 58(3):367-374.

22. Harisinghani MG, Saksena M, Ross RW, et al. A Pilot study of lymphotropic nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging technique in early stage testicular cancer: a new method for noninvasive lymph node evaluation. *Urology*. 2005; 66(5):1066-1071.

23. Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348:2491-2499.

24. Ross RW, Zietman AL, Xie W, et al. Lymphotropic nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging (LNMRI) identifies occult lymph node metastases in prostate cancer patients prior to salvage radiation therapy. *Clin Imaging*. 2009; 33(4):301-305.

25. Fortuin AS; Smeenk RJ, Meijer HJ, et al. Lymphotropic nanoparticle-enhanced MRI in prostate cancer: value and therapeutic potential. *Curr Urol Rep*. 2014; 15:389-395.

26. Spaliviero M, Harmsen S, Huang R, et al. Detection of lymph node metastases with SERRS nanoparticles. *Mol Imaging Biol*. 2016; 18(5):677-685.

27. Tseng YC, Xu Z, Guley K, et al. Lipid–calcium phosphate nanoparticles for delivery to the lymphatic system and SPECT/CT imaging of lymph node metastases. *Biomaterials*. 2014; 35(16):4688-4698.

28. Du J, Zhang Y, Ming J, et al. Evaluation of the tracing effect of carbon nanoparticle and carbon nanoparticle-epirubicin suspension in axillary lymph node dissection for breast cancer treatment. *World J Surg Oncol*. 2016; 14:164-171.
29. Jiang Y, Lin N, Huang S, et al. Tracking non palpable breast cancer for breast-conserving surgery with carbon nanoparticles: implication in tumor location and lymph node dissection. *Medicine*. 2015; 94(10):e605.
30. Lu B, Xiong SB, Yang H, et al. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *Eur J Pharm Sci*. 2006; 28(1):86-95.
31. Grootendorst DJ, Jose J, Fratila RM, et al. Evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Endorem®) as a photoacoustic contrast agent for intra-operative nodal staging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2013; 8(1):83-91.
32. Grootendorst DJ, Fratila RM, Visscher M, et al. Intra-operative ex vivo photoacoustic nodal staging in a rat model using a clinical superparamagnetic iron oxide nanoparticle dispersion. *J Biophotonics*. 2013; 6(6-7):493-504.
33. Partridge SC, Kurland BF, Liu CL, et al. Tumor-induced lymph node alterations detected by MRI lymphography using gadolinium nanoparticles. *Sci Rep*. 2015; 5:1-14.
34. Wauthoz N, Bastiat G, Moysan E, et al. Safe Lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice. *Nanomedicine*. 2015; 11(5):1237-1245.
35. Borrajo E, Abellan-Pose R, Soto A, et al. Docetaxel-loaded polyglutamic acid-PEG nanocapsules for the treatment of metastatic cancer. *J Control Release*. 2016; 238:263-271.
36. Khullar OV, Griset AP, Gibbs-Strauss SL, et al. Nanoparticle migration and delivery of paclitaxel to regional lymph nodes in a large animal model. *J Am Coll Surg*. 2012; 214(3):328-337.

37. Thomas SN, Vokali E, Lund AW, et al. Targeting the tumor-draining lymph node with adjuvanted nanoparticles reshapes the anti-tumor immune response. *Biomaterials*. 2014; 35(2):814-824.
38. Oh KS, Yhee JY, Lee DE, et al. Accurate sequential detection of primary tumor and metastatic lymphatics using a temperature-induced phase transition nanoparticulate system. *Int J Nanomed*. 2014; 9:2955-2965.
39. Chaney EJ, Tang L, Tong R, et al. Lymphatic biodistribution of polylactide nanoparticles. *Mol Imaging*. 2010; 9(3):153-162.
40. Wang S, Zhang Q, Luo XF, et al. Magnetic graphene-based nanotheranostic agent for dual-modality mapping guided photothermal therapy in regional lymph nodal metastasis of pancreatic cancer. *Biomaterials*. 2014; 35(35):9473-9483.
41. Paliwal R, Rai S, Vaidya B, et al. Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. *Nanomedicine*. 2009; 5(2):184-191.
42. Nassar T, Attili-Qadri S, Harush-Frenkel O, et al. High plasma levels and effective lymphatic uptake of docetaxel in an orally available nanotransporter formulation. *Cancer Res*. 2011; 71(8):3018-3028.
43. Attili-Qadri S, Karra N, Nemirovski A, et al. Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(43):17498-17503.
44. Lu H, Li B, Kang Y, et al. Paclitaxel nanoparticle inhibits growth of ovarian cancer xenografts and enhances lymphatic targeting. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007; 59(2):175-181.
45. Vu-Quang H, Yoo MK, Jeong HJ, et al. Targeted delivery of mannan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles to antigen-presenting cells for magnetic resonance-based diagnosis of metastatic lymph nodes *in vivo*. *Acta Biomater*. 2011; 7(11):3935-3945.

46. Cho HJ, Park JW, Yoon IS, et al. Surface-modified solid lipid nanoparticles for oral delivery of docetaxel: enhanced intestinal absorption and lymphatic uptake. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9:495-504.
47. Shen N, Tan J, Wang P, et al. Indirect magnetic resonance imaging lymphography identifies lymph node metastasis in rabbit pyriform sinus VX2 carcinoma using ultra-small super-paramagnetic iron oxide. *Plos One*. 2014; 9:e94876.
48. Wang P, Xie X, Wang J, et al. Ultra-small superparamagnetic iron oxide mediated magnetic hyperthermia in treatment of neck lymph node metastasis in rabbit pyriform sinus VX2 carcinoma. *Tumor Biol*. 2015; 36:8035-8040.
49. Wang Y, Deng H, Chen H, et al. Preoperative submucosal injection of carbon nanoparticles improves lymph node staging accuracy in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Am Coll Surg*. 2015; 221(5):923-930.
50. Cai HK, He HF, Tian W, et al. Colorectal cancer lymph node staining by activated carbon nanoparticles suspension *in vivo* or methylene blue *in vitro*. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(42):6148-6154.
51. Li Z, Ao S, Bu Z, et al. Clinical study of harvesting lymph nodes with carbon nanoparticles in advanced gastric cancer: a prospective randomized trial. *World J Surg Oncol*. 2016; 14(88).
52. Chaojie Z, Shanshan L, Zhigong Z, et al. Evaluation of the clinical value of carbon nanoparticles as lymph node tracer in differentiated thyroid carcinoma requiring reoperation. *Int J Clin Oncol*. 2016; 21(1):68-74.
53. Giunchedi P, Maestri M, Gavini E, et al. Transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma. Agents and drugs: an overview. Part 1. *Expert Opin Drug Delivery*. 2013; 10(6):679-90.
54. Giunchedi P, Maestri M, Gavini E, et al. Transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma. Agents and drugs: an overview. Part 2. *Expert Opin Drug Delivery*. 2013; 10(6):799-810.

55. Giunchedi P, Gavini E, Dionigi P, et al. Selective targeting of liver nodules. Present situation and new challenges to enhance indocyanine green captation from colorectal liver metastases. *Curr Drug Deliv.* 2015; 12(5):474-476.
56. Porcu EP, Salis A, Gavini E, et al. Indocyanine green delivery systems for tumour detection and treatments. *Biotechnol Adv.* 2016; 34(5):768-89.
57. Salis A, Rasso G, Budai-Szűcs M, et al. Development of thermosensitive chitosan/glicerophosphate injectable in situ gelling solutions for potential application in intraoperative fluorescence imaging and local therapy of hepatocellular carcinoma: a preliminary study. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015; 12(10):1583-1596.
58. Porcu EP, Salis A, Rasso G, et al. Engineered polymeric microspheres obtained by multi-step method as potential systems for transarterial embolization and intraoperative imaging of HCC: Preliminary evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017; 117:160-167.

CAPITOLO III

Incremento della stabilità chimica del Verde Indocianina con nanoparticelle di poli (etil 2-cianoacrilato). Una strategia per la diagnosi e il trattamento di tumori

Abstract

Il Verde Indocianina è una tricarbocianina approvata dalla “Food and Drug Administration” capace di emettere fluorescenza nel vicino infrarosso. Questo colorante è utilizzato per numerose applicazioni ma è particolarmente utile per la diagnosi e il trattamento dei tumori. Tuttavia l’uso clinico del Verde Indocianina è limitato da numerosi svantaggi come l’instabilità in acqua e la rapida degradazione per opera del calore e della luce. Al fine di superare questi limiti sono stati proposti numerosi sistemi capaci di proteggere il colorante dall’ambiente esterno.

In questo lavoro sono state sviluppate delle nanoparticelle polimeriche, costituite da poli(etil 2-cianoacrilato) per migliorare la stabilità chimica del Verde Indocianina e per promuoverne l’accumulo all’interno delle cellule tumorali. In una prima parte del lavoro sono stati effettuati degli studi preliminari per individuare la composizione e la tecnica di preparazione ideali, in seguito sono state preparate le nanoparticelle cariche utilizzando la tecnica della polimerizzazione in emulsione. Le varie formulazioni sono state caratterizzate da un punto di vista chimico-fisico valutando: dimensioni e indice di polidispersione, morfologia, stabilità fisica nel corso del tempo, spettroscopia IR e ¹H-NMR e infine intensità e stabilità della fluorescenza. La citotossicità delle nanoparticelle è stata valutata con il saggio MTT, mentre l’attività antitumorale è stata testata su sferoidi tumorali 3D. Inoltre è stato valutato “l’uptake” cellulare delle nanoparticelle. I risultati ottenuti hanno dimostrato che questi sistemi possono essere considerati dei possibili candidati per migliorare la stabilità del Verde Indocianina e per l’identificazione e l’eradicazione delle cellule tumorali.

1 Introduzione

Il cancro è una patologia in rapida diffusione ed è una tra le principali cause di morte nei paesi sviluppati [1]. Come riportato nell'introduzione di questo lavoro di tesi i trattamenti convenzionale per i tumori includono, oltre la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia. Tuttavia queste strategie presentano numerosi inconvenienti come gli effetti collaterali, la resistenza ai farmaci chemioterapici e possibili recidive. Questi problemi non possono essere ignorati e sono una delle sfide più importanti per le nuove terapie anti-cancro. Il principale obiettivo delle terapie antitumorali è la veicolazione selettiva di alte concentrazioni di farmaco nelle cellule tumorali, riducendo così gli effetti tossici nei tessuti sani circostanti [2]. La distinzione tra tessuto tumorale e sano è fondamentale sia nelle diagnosi della patologia che nella terapia con sistemi per il trasporto degli agenti antineoplastici. Tuttavia, la veicolazione di farmaci e/o agenti diagnostici in uno specifico sito tumorale non sempre è semplice e sono necessarie delle nuove strategie.

Le nanoparticelle (NPs) rappresentano una valida alternativa per la veicolazione di sostanze nelle cellule maligne; esse hanno infatti delle particolari caratteristiche che le rendono idonee per il trasporto e il rilascio di chemioterapici nei tessuti tumorali. Ad esempio, NPs capaci di circolare *in vivo* per lungo tempo si possono accumulare all'interno delle masse tumorali grazie alle fenestrate presenti nei vasi che circondano il tumore e al ridotto drenaggio linfatico tumorale [3]. I principali benefici dell'uso di NPs come sistemi di trasporto sono la capacità di veicolazione e il rilascio controllato dei farmaci. Tra le differenti tipologie di sistemi nanoparticellari utilizzati nel trattamento e nella diagnosi del cancro, le NPs polimeriche rappresentano dei promettenti "drug delivery systems". Esse sono caratterizzate da biocompatibilità, facilità nella preparazione e nella funzionalizzazione e dalla possibilità di controllare il tasso di degradazione [4].

Tra i vari polimeri utilizzati per la preparazione di NPs, come l'acido polilattico (PLA), l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) o il policaprolattone, per questo lavoro è stato scelto il poli (etil 2-cianoacrilato) (PECA), un polimero biodegradabile e biocompatibile. Come tutti i poli alchil-cianoacrilati, esso è dotato di ottime proprietà adesive e i corrispettivi monomeri hanno la capacità di polimerizzare facilmente in

numerosi mezzi tra cui l'acqua [5, 6]. Molti lavori di letteratura riportano l'uso dei policianoacrilati come materiali per la preparazione di NPs [7-9] e una delle applicazioni più interessanti delle NPs costituite da questi polimeri è il loro uso nel trattamento cancro [10]. Quest'azione terapeutica può essere attribuita alla capacità di tali sistemi di superare la resistenza che spesso insorge nei confronti della chemioterapia tradizionale, grazie all'adesione sulla superficie cellulare [11]. Inoltre i poli alchilcianoacrilati hanno dei tempi di degradazione molto brevi, se confrontati con polimeri come il PLA e il PLGA che, al contrario, *in vivo* degradano molto lentamente. Perciò, nel caso di trattamenti cronici, questi polimeri sono ideali per evitare di sovraccaricare le cellule [12].

Il Verde Indocianina (ICG) è un colorante appartenente alla classe delle tricarbocianine caratterizzato da bande di assorbimento e di emissione nella regione del vicino infrarosso (NIR). Se esposto a una luce eccitante (lunghezza d'onda compresa tra 750 e 810 nm) l'ICG emette fluorescenza a 840 nm [13]. L'ICG è l'unico colorante NIR approvato dalla "Food and Drug Administration" per uso diagnostico e per studi di "imaging" clinico [14]. Per la sua capacità di emettere fluorescenza l'ICG è utilizzato come agente per la valutazione della funzione epatica e della gittata cardiaca, per le analisi farmacocinetiche, per l'angiografia oftalmica e per la visualizzazione della vascolarizzazione retinica e coroideale [15, 16]. Rispetto ad altri coloranti fluorescenti, l'ICG ha ricevuto una notevole attenzione per i numerosi vantaggi tra cui una profonda penetrazione nei tessuti, scarsa diffusione della luce e ridotta autofluorescenza dei tessuti [17]. Tuttavia l'utilizzo clinico dell'ICG è limitato. Il colorante si lega in modo non specifico alle proteine plasmatiche e questo causa una rapida clearance (emivita plasmatica di circa 2-4 minuti) e una instabilità *in vivo*. Inoltre l'ICG è molto instabile sia *in vitro* che *in vivo* a causa della sensibilità nei confronti del calore e della luce, ma soprattutto per la scarsa stabilità in acqua [18, 19]. In soluzioni acquose l'ICG subisce un insieme di cambiamenti fisico-chimici come aggregazione e degradazione irreversibile. Perciò è di fondamentale importanza individuare una formulazione a base di ICG caratterizzata da stabilità in acqua, lungo tempo di circolazione e capace di raggiungere specifici siti d'azione. Al fine di superare questi limiti è stato proposto il caricamento dell'ICG in vari sistemi di veicolazione [20-22].

Lo scopo di questo lavoro è stato la preparazione di NPs di PECA e di NPs di PECA caricate con ICG per migliorare la stabilità chimica dell'ICG e come promettenti sistemi teranostici per la contemporanea diagnosi e trattamento dei tumori. Inizialmente sono stati individuati i parametri formulativi e la tecnica di preparazione ideali. Dopo la preparazione, le NPs sono state caratterizzate in termini di dimensioni, distribuzione dimensionale, potenziale zeta, stabilità fisica, spettroscopia IR e ¹H-NMR e morfologia. Inoltre, nel caso delle particelle caricate con ICG, è stata valutata la stabilità della fluorescenza in soluzione acquosa. La citotossicità *in vitro* delle NPs bianche è stata determinata con il saggio con MTT, mentre l'attività antitumorale è stata testata su sferoidi tumorali 3D, dei sistemi che meglio riproducono la struttura del tumore e il microambiente tumorale. Infatti, sebbene molti autori abbiano proposto l'utilizzo delle NPs poli alchil-cianoacrilati nel trattamento del cancro, la valutazione delle proprietà antitumorali di tali sistemi su sferoidi tumorali 3D non è riportata. Infine è stata valutata la captazione cellulare delle NPs attraverso degli studi di uptake.

2 Materiali e metodi

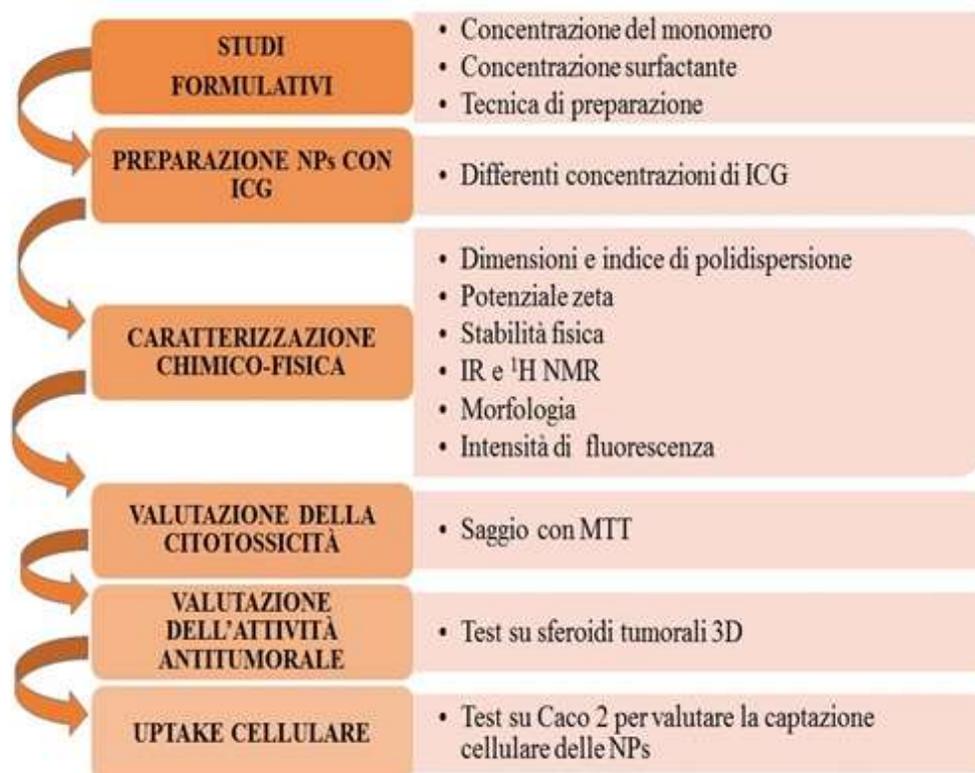


Figura 1. Schema illustrante le principali fasi del lavoro

2.1 Materiali

L'etil 2-cianoacrilato (ECA) utilizzato come monomero per la polimerizzazione, il Tween 20 il Verde Indicianina (ICG), la soluzione di antibiotico/antimicotico (100×) contenente 10000 unità/ml di penicillina, 10 mg/ml di streptomina e 25 mg/ml di amfotericina B, e il dimetilsolfossido (DMSO) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). L'acido fosfotungstico è stato comprato da Carlo Erba reagenti s.r.l. (Milan, Italy). Il terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM con 4.5 g/L di glucosio, L-glutamminae piruvato di sodio) è stato acquistato da Corning (Mediatech Inc. A Corning Subsidiary Manassas, USA). La soluzione di tampone fosfato Dulbecco e il siero fetale di bovino sono stati comprati dalla Biowest (Nuaille, F); l'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) e la soluzione di trypan blue sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La linea cellulare Caco-2 è stata ottenuta "dall' European Tissue Culture Collection". Le linee cellulari HepG2 e A498 sono state ottenute dall' ICLC (Interlab Cell Line Collection, Genova, Italia). Il kit per il test di citotossicità con il CellTox green è stato acquistato da Promega (Madison, WI, USA). L'acqua bidistillata è stata prodotta da un sistema MilliQ R4 Millipore (Milano, Italia).

2.2 Caco-2, cellule di adenocarcinoma umano

Le cellule sono state coltivate in fiasche di polistirene (Greiner bio-one, PBI International, Milano, Italia) con 10-12 ml di mezzo di cultura completo (MC) costituito da DMEM con 1% (v/v) di soluzione di antibiotico/antimicotico e 10% di siero bovino inattivato. Le cellule sono state poste in incubatore (Shellab® Sheldon® Manufacturing Inc., Oregon, USA) a 37°C con livelli di umidità (95%) e di CO₂ (5%) controllati. Tutte le operazioni riguardanti le cellule sono state effettuate sotto una cappa a flusso laminare verticale (Ergosafe Space 2, PBI International, Milano, Italia). Dopo che le cellule hanno raggiunto una confluenza pari a 80-90%, è stata effettuata la tripsinizzazione. Lo strato di cellule è stato lavato con il tampone fosfato Dulbecco per rimuovere eventuali cationi bivalenti che possono inattivare la tripsina, successivamente 3 ml di una soluzione allo 0,25% (p/v) di tripsina ed EDTA sono stati lasciati in contatto con le cellule per 5 minuti. Trascorso questo tempo, le cellule sono state trattate con 7

ml di MC per bloccare l'azione proteolitica della tripsina e per facilitarne il distacco. In seguito la sospensione di cellule è stata centrifugata (TC6, Sorvall Products, Newtown, USA) a 1500 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in 6 ml di MC. Per contare le cellule è stata utilizzata una camera di conta (Hycor Biomedical, Garden Grove, California, USA), usando una soluzione contenente 0,5 % di trypan blue per identificare e contare le cellule vitali.

2.3 Preparazione delle NPs bianche: studi formulativi

Le NPs bianche di PECA sono state preparate utilizzando il metodo della polimerizzazione in emulsione modificato [23, 24]. Durante gli studi formulativi, è stata valutata l'influenza della concentrazione del monomero, del surfactante e della tecnica di preparazione sulle dimensioni delle particelle, sull'omogeneità della dispersione e sul grado di polimerizzazione.

Per la preparazione delle NPs il surfactante non ionico Tween 20 (0,5 p/v) è stato disciolto in 10 ml di una soluzione di acido cloridrico a pH 2,5 per ottenere il mezzo di polimerizzazione. Successivamente, tre differenti volumi di ECA (50, 100 e 200 μ l) sono stati aggiunti goccia a goccia, sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente nel mezzo di polimerizzazione per ottenere le concentrazioni finali di monomero di 0,5, 1 e 2% (v/v) (formulazioni **NPsB 1-3**). L'agitazione meccanica è stata mantenuta finché la polimerizzazione era completa (circa 3 h). Dopo la polimerizzazione, la dispersione di NPs è stata neutralizzata a pH 7,4 con NaOH 0,2 M per bloccare la reazione. Per eliminare eventuali reagenti in eccesso, la dispersione è stata purificata utilizzando un metodo di ultrafiltrazione con i dispositivi Amicon[®] (30 kDa MWCO; Molecular Weight Cut Off). Inizialmente la sospensione è stata concentrata sino ad ottenere un volume finale di 1 ml, successivamente sono stati aggiunti 10 ml di acqua bidistillata ed è stata effettuata l'ultrafiltrazione. La procedura di purificazione è stata ripetuta varie volte. La sospensione purificata di NPs è stata conservata in contenitori di polietilene a 4°C.

In seguito è stata valutata anche l'influenza della concentrazione di surfactante. È stata preparata una soluzione acida contenente una concentrazione maggiore di Tween 20 (1% p/v), e le diverse concentrazioni di monomero (0,5, 1 e 2% (v/v)) sono state

ottenute aggiungendo il monomero a questo mezzo di polimerizzazione utilizzando il metodo descritto precedentemente. Sono state così ottenute le formulazioni **NPsB 4-6**.

Una volta individuata la composizione ideale, è stata valutata l'influenza del metodo di preparazione sulla formazione delle NPs. Sono state testate altre due tecniche per la dispersione del monomero nel mezzo di polimerizzazione: omogeneizzazione con Ultra Turrax T-25 (IKA, Staufen, Germania) a 8600 rpm per 5, 10, 15 and 30 minuti (**NPsB 7**) e sonicazione con sonda ad ultrasuoni Vibra Cell, VC 50 (Sonics and Materials, Danbury, USA) a 50 W per tempi differenti (1, 2, 4, 6 e 10 minuti) (**NPsB 8**).

La composizione e la tecnica di preparazione di tutte le formulazioni allestite durante gli studi formulativi sono riportate in tabella 1.

Sulla base di questi studi preliminari è stata individuata la formulazione leader la quale è stata sottoposta al caricamento con l'ICG e alla caratterizzazione chimico-fisica.

Campione	ECA monomero (v/v)	Tween 20 (p/v)	Agitazione magnetica	Ultra Turrax	Sonda ad ultrasuoni
NPsB 1	0,5%	0,5%	✓		
NPsB 2	1%	0,5%	✓		
NPsB 3	2%	0,5%	✓		
NPsB 4	0,5%	1%	✓		
NPsB 5	1%	1%	✓		
NPsB 6	2%	1%	✓		
NPsB 7	1%	1%		✓	
NPsB 8	1%	1%			✓

Tabella 1. Composizione e tecnica di preparazione delle formulazioni allestite durante gli studi formulativi

2.4 Preparazione delle NPs caricate con ICG

Le NPs cariche sono state preparate utilizzando la tecnica della polimerizzazione in emulsione descritta nel precedente paragrafo. Una opportuna quantità di ICG (1 mg (**NPsICG 1**), o 2 mg (**NPsICG 2**)) è stata solubilizzata nel mezzo di polimerizzazione (10 ml di una soluzione acquosa di acido cloridrico pH 2,5 contenente Tween 20 1% (p/v)). L'ECA (1% p/v) è stato aggiunto goccia a goccia nel mezzo sotto agitazione magnetica costante. Dopo neutralizzazione con NaOH 0,2 M la sospensione di NPs è stata purificata con le Amicon[®] e conservata a 4°C. Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi dimensionale, è stata individuata la formulazione migliore la quale è stata sottoposta a successiva caratterizzazione.

2.5 Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs bianche

2.5.1 Analisi dimensionale

Il diametro delle NPs e l'indice di polidispersione (PI) sono stati determinati con il metodo del "dynamic light scattering" utilizzando un Coulter Submicron Particle Sizer N5 (Beckman-Coulter Inc. Miami, Florida, USA). Le misure sono state effettuate a 25°C utilizzando un angolo di "light scattering" di 90°. Prima di ciascun'analisi le dispersioni di NPs sono state opportunamente diluite con acqua bidistillata, precedentemente filtrata con filtri di cellulosa rigenerata (diametro pori 0,22 µm), sino ad ottenere la concentrazione richiesta dallo strumento per l'analisi (range 4×10^4 - 1×10^6). Ogni campione è stato analizzato in triplicato e il risultato è stato espresso come diametro medio (DM)± deviazione standard (DS) e come PI medio ± DS.

La caratterizzazione riportata in seguito è stata effettuata solo sulla formulazione bianca scelta come leader.

2.5.2 Stabilità fisica e potenziale zeta

La stabilità fisica delle NPs in funzione del tempo è stata valutata sia a 25°C sia a 4°C. L'omogeneità della sospensione è stata osservata macroscopicamente, inoltre le NPs sono state analizzate in termini di DM e di PI nel corso del tempo (7, 15 e 30 gg),

confrontando i risultati con quelli ottenuti al momento della preparazione, per valutare eventuali variazioni.

Il potenziale zeta è stato misurato in acqua a 25°C con una conducibilità di 0,019 mS/cm, utilizzando un Litesizer 500 (Anton Paar, Austria).

2.5.3 Spettroscopia IR e ¹H NMR

La caratterizzazione strutturale è stata eseguita utilizzando la spettroscopia infrarossa (IR) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (¹H-NMR). Per questo scopo le NPs sono state lavate e concentrate con i dispositivi Amicon[®] e la dispersione ottenuta è stata liofilizzata a -54.5 °C, sottovuoto (0,909 mbar) per 8 h utilizzando un Lio 5P Cinquepascal (Trezzano sul Naviglio, Italia) per ottenere una polvere. Gli spettri IR sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro Nicolet Avatar 320 FTIR (Nicolet Instrument Corporation, Madison, WI, USA), preparando i campioni con la tecnica della pastiglia di KBr. Gli spettri ¹H-NMR sono stati determinati in DMSO-d₆ e registrati con un Bruker Avance III 400 NanoBay riportando i “chemical shifts” in parti per milione (ppm).

2.5.4 Osservazioni morfologiche

La morfologia delle NPs è stata osservata utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Le NPs in sospensione acquosa (15 µl) sono state poste su retini di rame da 200 mesh (FCF200-Cu, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) rivestiti con carbonio e posti sopra una pellicola di supporto (Formvar). Dopo 15 minuti i campioni sono stati asciugati delicatamente con carta da filtro Whatman (Whatman[®] Cellulose Filter Paper - Sigma-Aldrich) e 10 µl di acido fosfotungstico all'1% (v/v) (Carlo Erba, Milano, Italia) sono stati aggiunti sui retini. Per evitare artefatti è stata prestata particolare attenzione all'asciugatura. Inizialmente è stata effettuata un'asciugatura molto delicata nei bordi delle griglie utilizzando la carta Whatman, successivamente i campioni sono stati lasciati asciugare per tutta la notte a temperatura ambiente. In seguito i retini con i campioni sono state posti nella colonna da vuoto del microscopio e sono stati osservati al TEM [25]. Le analisi TEM sono state effettuate utilizzando un microscopio JEOL JEM-1200 EX II dotato di una fotocamera TEM CCD Olympus Mega View III con diversi ingrandimenti nel range tra 12000× e

100000×. La misura delle NPs è stata effettuata direttamente sulle immagini originali utilizzando il software ImageJ [26].

2.6 Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs caricate con ICG

Le NPs cariche sono state caratterizzate in termini di diametro medio, PI, stabilità fisica nel tempo e morfologia utilizzando i metodi descritti nei precedenti paragrafi.

La fluorescenza è stata determinata con uno spettrofluorimetro RF-6000 (Shimadzu, Japan) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 785 nm. Gli spettri di emissione sono stati registrati in un range di lunghezze d'onda comprese tra 200 e 900 nm. Per valutare l'influenza della concentrazione di ICG sull'intensità di fluorescenza, la formulazione NPsICG1 e una soluzione acquosa di ICG (avente la stessa concentrazione di ICG, 100 µg/ml), sono state diluite con acqua bidistillata per ottenere una serie di campioni con concentrazioni di colorante comprese tra 0,1 e 100 µg/ml. I campioni ottenuti sono stati analizzati e la lunghezza d'onda del picco di emissione e l'intensità del picco sono stati registrati. Per valutare eventuali interferenze nello spettro di emissione è stato analizzato anche un campione di NPs bianche.

Per studiare la stabilità della fluorescenza nel corso del tempo, una dispersione acquosa di NPsICG1 e una soluzione acquosa di ICG, aventi entrambe una concentrazione di colorante pari a 10 µg/ml, sono state conservate al buio a 4°C per 15 giorni. Le analisi sono state effettuate a tempi stabiliti (0, 1, 2, 3, 4, 7, 10, e 15 giorni) valutando la decadenza della fluorescenza in funzione del tempo. I risultati sono stati espressi come % di fluorescenza rimanente; ciascun valore è la media di tre esperimenti.

2.7 Test di citotossicità

Il test è stato effettuato per studiare l'effetto di diverse concentrazioni di NPs bianche sulla vitalità di cellule di adenocarcinoma di colon umano (Caco-2). Le cellule sono state seminate su piastre da 96 pozzetti ($2,0 \times 10^4$ cellule in 200 µl di mezzo di coltura completo (MC)/pozzetto) e incubate (37°C e 5% di CO₂) per 24 h. Le NPs in sospensione sono state diluite (750, 75 e 7,5 µg/ml) con il MC. Le cellule sono state trattate con 200 µl di ciascun campione per 24 h, utilizzando il MC come controllo. Trascorso questo tempo è stato eseguito il saggio con MTT. Le cellule sono state lavate

con 100 μ l di PBS (pH 7,4) e poi lasciate in contatto per 3 h con 50 μ l di MTT (soluzione 7,5 μ M in DMEM senza rosso fenolo). Infine, in ciascun pozzetto, sono stati aggiunti 100 μ l di DMSO per essere sicuri della completa dissoluzione dei cristalli di formazano, ottenuti dalla riduzione operata dalle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali sul MTT. L'assorbanza della soluzione è stata determinata a 570 nm, con una lunghezza d'onda di riferimento di 690 nm, utilizzando un lettore di micropiastre IMark1 (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Segrate, Milan, I). I risultati sono stati espressi come % di vitalità, normalizzando i valori di assorbanza ottenuti dopo il contatto con le cellule, con quelli ottenuti dopo contatto con il MC puro, usato come controllo positivo.

2.8 Valutazione dell'attività antitumorale delle NPs bianche su modelli di sferoidi tumorali 3D

L'attività antitumorale delle NPs bianche è stata valutata in due modelli di sferoidi tumorali. Le cellule di carcinoma epatocellulare (HepG2) e di adenocarcinoma renale (A498) sono state seminate all'interno di piastre da 384 pozzetti "ultra-low attachment" (ULA) (Corning, NY, USA). I pozzetti di queste piastre hanno un fondo a U e sono rivestiti con un idrogel sintetico per favorire la formazione di un singolo sferoide all'interno di ogni pozzetto [27]. La morte degli sferoidi è stata valutata aggiungendo il colorante CellTox green al mezzo di coltura [28]. Brevemente, all'interno di ciascun pozzetto delle piastre 384 ULA sono state poste 500 cellule, in un volume di 20 μ l di mezzo di coltura; dopo tre giorni, necessari per la formazione degli sferoidi, sono state effettuate 8 diluizioni seriali della dispersione di NPs (nel mezzo di coltura) in un range compreso tra 375 e 2,9 μ g/ml. I campioni ottenuti sono stati aggiunti al mezzo insieme al CellTox per ottenere un volume finale di 30 μ l. Immediatamente dopo l'inizio del trattamento, gli sferoidi sono stati incubati a 37°C e con 5% di CO₂ in un lettore BioTek Cytation 5 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). Le immagini ottenute in campo chiaro con un filtro "green fluorescence protein" (GFP) (eccitazione 469 \pm 25, emissione 525 \pm 25) sono state raccolte con un obiettivo 4 \times dopo 15 minuti e a 6, 12, 18 e 24 h dopo il trattamento. Dopo 24 h, le piastre sono state poste all'interno di un incubatore standard (37°C e 5% di CO₂) e sono state registrate le altre immagini dopo 48 e 72 h di trattamento. L'area degli sferoidi (A) e l'intensità di fluorescenza di colore verde (GFI),

limitata all'area degli sferoidi, sono state calcolate utilizzando il software Gen5. (A) è stata usata per calcolare il volume degli sferoidi (V): $4/3 \cdot A \cdot \text{RADQ}(A/\pi)$ [29].

Il volume degli sferoidi è stato calcolato come V/V_0 , dove V è il volume degli sferoidi a ogni tempo di analisi e V_0 è il volume degli stessi sferoidi 15 minuti dopo il trattamento con i campioni. La morte degli sferoidi è stata calcolata come $(\text{GFI}-\text{GFI}_0)/A$, in cui GFI è l'intensità di fluorescenza verde a ogni tempo e GFI_0 è l'intensità di fluorescenza verde dopo 15 minuti dal trattamento. Per ogni condizione sono stati trattati quattro sferoidi. I risultati sono stati espressi come valore medio \pm errore standard.

2.9 Studi di “uptake” cellulare

Gli studi di “uptake” cellulare sono stati effettuati sia sulle NPs di PECA bianche che su quelle caricate con ICG. Le interazioni tra le NPs e le cellule tumorali sono state valutate mediante TEM, utilizzando delle cellule di adenocarcinoma di colon umano (Caco-2) seminate all'interno di piastre multiwell (Corning®Costar® -Sigma-Aldrich). Le cellule sono state trattate per 1 h con i campioni di NPs, ottenuti diluendo 1:1000 (7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) la formulazione iniziale (sia bianca che carica) con il mezzo di coltura. Successivamente le cellule sono state lavate e fissate con una soluzione di formaldeide (2%) e glutaraldeide (2,5%) in tampone sodio cacodilato (0,1 M, pH 7,3) per 6 h a 4°C. Il processo di post-fissazione è stato eseguito utilizzando tetraossido di osmio (1,33%) in tampone collidina per 20 minuti a temperatura ambiente e, successivamente, a 4°C per tutta la notte. I campioni di cellule all'interno delle piastre Petri sono stati inseriti all'interno di cilindri di resina (a 60°C per 48 h) e poi allontanati dai supporti plastici. Le sezioni semifini (0,2 μm) per la microscopia ottica sono state colorate con blu di toluidina e osservate con un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania), dotato di fotocamera digitale 5.0 Mpxl CCD, utilizzando un filtro giallo per meglio osservare il probabile colore verde presente all'interno delle cellule. Delle sezioni ultrafini (50 nm) per l'analisi ultrastrutturale sono state ottenute con un ultramicrotomo Ultracut Reichert fornito di un coltello diamantato e contrastato con una soluzione di acetato di uranile e citrato di piombo.

2.10 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). Le differenze individuali tra i dati sono state valutate utilizzando il test non-parametrico di Tukey. $P < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo (GraphPad InStat Software Program, GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

3 Risultati e discussioni

3.1 Preparazione delle NPs bianche: studi formulativi

Le NPs sono state preparate con una polimerizzazione in emulsione utilizzando il Tween 20 come surfactante. La polimerizzazione dei poli alchil-cianoacrilati in soluzione acquosa procede attraverso un meccanismo anionico per mezzo di iniziatori basici presenti nel mezzo di polimerizzazione (ad esempio gli OH^- derivanti dalla dissociazione dell'acqua) [30, 31]. La presenza dei due gruppi fortemente elettron-attrattori nel carbonio in α al doppio legame ($-\text{COOR}$ e $-\text{CN}$), rende i monomeri cianoacrilati particolarmente suscettibili all'attacco da parte di nucleofili come basi e anioni [32]. Pertanto, basi deboli come gli ioni OH^- possono ionizzare il monomero con conseguente formazione di carbanioni, i quali reagiscono con altri monomeri portando alla formazione di catene polimeriche. Il processo di formazione delle particelle è un meccanismo molto complesso che consiste in tre diversi passaggi. Nella prima fase, si ha la formazione di oligomeri nella goccia di monomero e la polimerizzazione viene bloccata a questo stadio dai protoni. In seguito, le specie oligomeriche si aggregano per formare i nuclei delle NPs. Nella fase finale, i nuclei vengono attaccati da ulteriori monomeri e da oligomeri per formare le NPs finali [33, 34].

Molti autori hanno riportato che le dimensioni e la massa molecolare delle particelle sono influenzate dal pH del mezzo di polimerizzazione. Per la formazione di NPs è necessario un pH inferiore a 3, infatti, per valori superiori, a causa dell'alta concentrazione di ioni OH^- , la reazione di polimerizzazione procede molto velocemente e non si ottengono delle particelle di ridotte dimensioni [35, 36]. Perciò, per controllare la velocità della reazione è necessario un mezzo di polimerizzazione acido [37].

Durante la prima parte del lavoro sono stati effettuati degli studi formulativi per valutare come le variazioni di alcuni parametri influenzino le caratteristiche tecnologiche delle NPs, in particolar modo le dimensioni, l'omogeneità della dispersione e il grado di polimerizzazione. Uno dei parametri studiati è stato la concentrazione del monomero. I risultati ottenuti mostrano come, utilizzando tre diverse concentrazioni di ECA (0,5, 1 e 2% (v/v)), la dispersione di NPs appare diversa. Utilizzando una concentrazione di monomero pari a 2% (**NPsB 3** e **NPsB 6**) si osserva la formazione di grossi aggregati, mentre la riduzione della concentrazione di ECA dal 2% allo 0,5% (**NPsB 1** e **NPsB 4**) porta all'ottenimento di una sospensione molto chiara, indice di una polimerizzazione lenta e di una bassa concentrazione di NPs. Quando si utilizza una concentrazione di monomero pari all'1% (**NPsB 2** e **NPsB 5**), nelle due formulazioni si ottengono dei risultati diversi. Il campione **NPsB 2**, con bassa concentrazione di Tween 20, presenta numerosi aggregati, mentre la formulazione **NPsB 5** appare omogenea e lattescente. Questa differenza è probabilmente dovuta alla diversa concentrazione di surfactante utilizzata. La concentrazione del monomero è quindi un parametro molto importante. L'ECA è particolarmente reattivo, perciò, se si utilizzano delle concentrazioni molto elevate, probabilmente, non tutto il monomero reagirà per formare le NPs e l'eccesso può portare alla formazione di filamenti e aggregati. Di conseguenza sono necessari dei processi di purificazione come cicli ripetuti di centrifugazione [31] e filtrazioni [38]. Al contrario, quando la concentrazione del monomero è molto bassa, la polimerizzazione avviene molto lentamente e si formano poche NPs.

L'altro parametro preso in considerazione è stato la concentrazione del Tween 20 (0,5% e 1% (p/v)), un surfactante comunemente utilizzato come stabilizzante in molte formulazioni tecnologiche [39, 40]. Gli esperimenti effettuati hanno messo in evidenza come i risultati migliori siano stati ottenuti con una concentrazione di surfactante pari all'1%. Infatti, una concentrazione di Tween 20 inferiore all'1% è apparsa non idonea per la preparazione di NPs stabili. In tutte le formulazioni contenenti Tween 20 allo 0,5% (**NPsB 1-3**), durante il processo di polimerizzazione si sono formati degli aggregati, indice di una ridotta stabilità del sistema. Le formulazioni **NPsB 4-6** (preparate con l'1% di Tween 20 e con diverse concentrazioni di ECA) mostrano un incremento delle dimensioni al diminuire della concentrazione di monomero ($P < 0,05$).

I valori di PI aumentano significativamente quando la concentrazione di monomero è ridotta da 2 a 1 e 0,5% ($P < 0,05$) mentre non si hanno differenze rilevanti quando la concentrazione è variata da 1 a 0,5% ($P > 0,05$) (tabella 2). Come riportato in precedenza, i campioni **NPsB 4** e **NPsB 6** presentano delle problematiche relative alle concentrazioni dei loro componenti, pertanto come composizione ideale per la preparazione delle NPs è stata scelta la seguente: 1% (v/v) di ECA e 1% (p/v) di Tween 20.

In seguito, sono state testate delle tecniche alternative per la dispersione del monomero nel mezzo di polimerizzazione. L'omogeneizzazione mediante Ultra Turrax (**NPsB 7**) causa la formazione di grossi aggregati durante la polimerizzazione. Inoltre dalla tabella 3 si può osservare come le dimensioni e il PI subiscono un incremento all'aumentare del tempo di omogeneizzazione ($P < 0,05$). Con l'utilizzo della sonda a ultrasuoni (**NPsB 8**) il diametro delle particelle non varia durante i primi quattro minuti di sonicazione ($P > 0,05$), mentre l'aumentare del tempo di sonicazione porta a un'aggregazione delle NPs ($P < 0,05$). Inoltre, all'aumentare del tempo di sonicazione si assiste a una riduzione dell'omogeneità della dispersione ($P < 0,05$) (tabella 4). Di consuetudine l'Ultra-Turrax e la sonicazione possono essere considerate delle tecniche non idonee per la preparazione delle NPs. Al contrario, una dispersione omogenea e buone dimensioni sono ottenute disperdendo il monomero con l'agitazione magnetica per 3 h (diametro medio circa 80 nm e PI circa 0,08).

Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi formulativi il campione **NPsB 5** è stato scelto come formulazione leader per gli studi di caratterizzazione chimico-fisica riportati nei paragrafi seguenti e per il caricamento con l'ICG.

Campione	Diametro medio (nm)	PI
NPsB 4	108±1,83*§	0,08±0,06#
NPsB 5	80±0,92*§	0,08±0,03#
NPsB 6	60±0,76*	0,06±0,01#

Tabella 2. Diametro medio e PI delle formulazioni contenenti 1% (p/v) di Tween 20 e 0,5, 1 e 2% (v/v) di ECA. P<0.05: * NPsB 6 vs NPsB 5 e NPsB 4; § NPsB 5 vs NPsB 4; # NPsB 6 vs NPsB 5 e NPsB 4.

Tempo (min)	Diametro medio (nm)	PI
5	87.7±0,02*	0,209±0,002+
10	93,5±0,01*#	0,273±0,005+\$
15	100,5±0,2*#§	0,332±0,003+\$&
30	100±0,01*#§	0,345±0,005+\$&

Tabella 3. Variazioni del diametro medio e del PI ottenute utilizzando l'omogeneizzazione con Ultra Turrax per vari tempi. Diametro medio, P<0.05: * 5 min vs 10, 15 e 30 min; # 10 min vs 15 e 30 min; § 15 min vs 30 min. PI, P<0.05: + 5 min vs 10, 15 e 30 min; \$ 10 min vs 15 e 30 min, & 15 min vs 30 min.

Tempo (min)	Diametro medio (nm)	PI
1	148,3±0,03*	0,219±0,003§
2	141,2±0,01	0,343±0,001§
4	148,5±0,02	0,424±0,003§
6	233,4±0,01*	0,532±0,006§
10	353,2±0,03*	0,938±0,007§

Tabella 4. Variazioni in diametro medio e PI ottenute utilizzando la sonda a ultrasuoni per vari tempi. P<0.05: * 1 min vs 6 e 10 min; § 1 min vs 2, 4, 6 e 10 min.

3.2 Preparazione delle NPs caricate con ICG

Le NPs cariche sono state allestite utilizzando la composizione e la tecnica di preparazione ideali individuate durante gli studi formulativi. Pertanto sono state ottenute nel seguente modo: 1% (p/v) di Tween 20, 1% (v/v) di ECA e agitazione magnetica per 3 h. Sono state testate due differenti quantità di ICG (1 mg e 2 mg) per valutare l'eventuale effetto sulle caratteristiche tecnologiche delle NPs. Le analisi dimensionali mostrano che l'aumento della quantità di ICG causa un incremento dei valori di diametro medio e di PI ($P < 0,05$). Per la formulazione **NPsICG 1** (1 mg di ICG) i valori di diametro e PI sono $120 \pm 1,2$ nm e $0,04 \pm 0,02$, mentre per il campione **NPsICG 2** (2 mg di ICG) sono $200 \pm 10,2$ e $0,13 \pm 0,1$. Pertanto la formulazione **NPsICG 1** è stata scelta come leader per i successivi studi.

3.3 Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs bianche

3.3.1 Analisi dimensionale

Le dimensioni rappresentano un parametro fondamentale per i sistemi di “drug delivery”. Il diametro medio della formulazione **NPsB 5**, determinato con il metodo del “light scattering”, è di $80 \pm 0,92$ con un PI di $0,08 \pm 0,03$. Il metodo sviluppato durante gli studi formulativi ha permesso di ottenere delle dispersioni di NPs con una distribuzione dimensionale omogenea. È stato riportato che NPs con dimensioni inferiori a 400 nm possono penetrare all'interno dei vasi sanguigni e accumularsi nei tessuti tumorali, inoltre, con NPs di diametro inferiore a 1 μ m, è possibile avere una distribuzione uniforme nel sito bersaglio [41]. Il diametro medio delle NPs è compreso nel caratteristico range dimensionale dei sistemi nanoparticellari ottenuti con la polimerizzazione in emulsione e può essere considerato idoneo per una somministrazione parenterale [42].

3.3.2 Stabilità fisica e potenziale zeta

La figura 2 mostra l'andamento nel corso del tempo delle dimensioni e del PI della formulazione **NPsB 5**, in funzione del metodo di conservazione della dispersione. Dai risultati dell'analisi dimensionale è evidente che non vi sono dei cambiamenti nei valori di dimensioni e di PI ($P > 0,05$), indicando una buona stabilità della dispersione. Inoltre

non sono stati osservati degli aggregati visibili. Pertanto se la formulazione non fosse utilizzata immediatamente dopo la preparazione, può essere facilmente conservata fino al successivo uso.

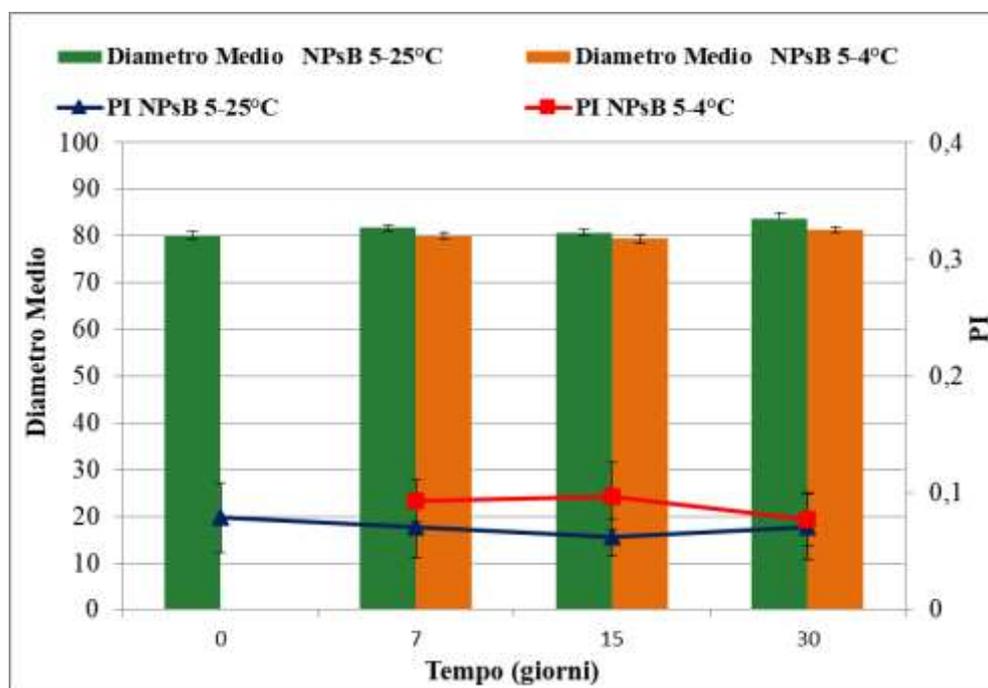


Figura 2. Stabilità fisica della formulazione NPsB 5 in funzione del tempo e delle condizioni di conservazione.

Il potenziale zeta delle NPs in acqua è negativo (-39,7 mV). Questo valore negativo può essere dovuto all'assorbimento superficiale di anioni [43] oppure al fatto che vi siano pochi gruppi carbossilici liberi sulla superficie delle NPs [9].

3.3.3 Spettroscopia IR e ¹H-NMR

La caratterizzazione del campione **NPsB 5** con la spettroscopia IR e ¹H-NMR ha confermato la composizione e la struttura chimica del polimero. Lo spettro IR mostra i caratteristici picchi di assorbimento per il carbonile estereo C=O (1750 cm⁻¹), C≡N (2250 cm⁻¹) e lo stretching C-O (1254 cm⁻¹). I picchi compresi tra 3000-2880 cm⁻¹ derivano dalle vibrazioni di stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi -CH₂ e -CH₃ del sostituente etilico. Anche lo spettro ¹H-NMR è quello tipico dei poli alchilcianoacrilati. L'ampio singoletto a δ 1.24- 1.31 ppm è dovuto al gruppo metile del

sostituente etilico; il multipletto a δ 2.51-2.85 ppm deriva dal gruppo $-\text{CH}_2$ della catena di polimerizzazione; il tripletto a δ 4.12 ppm è dovuto al $-\text{CH}$ terminale della catena e infine il multipletto a δ 4.13-4.22 deriva dai protoni dal gruppo $-\text{CH}_2$ del sostituente etilico. L'assenza dei picchi dei protoni olefinici a δ 6.65 and δ 7.07 ppm indica l'assenza di monomero non reagito, pertanto la polimerizzazione è completa.

3.3.4 Osservazioni morfologiche

L'analisi al TEM (figura 3) mostra delle particelle di forma sferica, omogenee e isolate. A ingrandimenti maggiori (100000 \times) è possibile osservare all'interno di esse due differenti tipologie di piccoli granuli, alcuni elettronegativi ed altri elettropositivi. Come riportato da Chitrani et al., la morfologia sferica della NPs potrebbe essere una caratteristica positiva per l'internalizzazione da parte delle cellule tumorali [44].

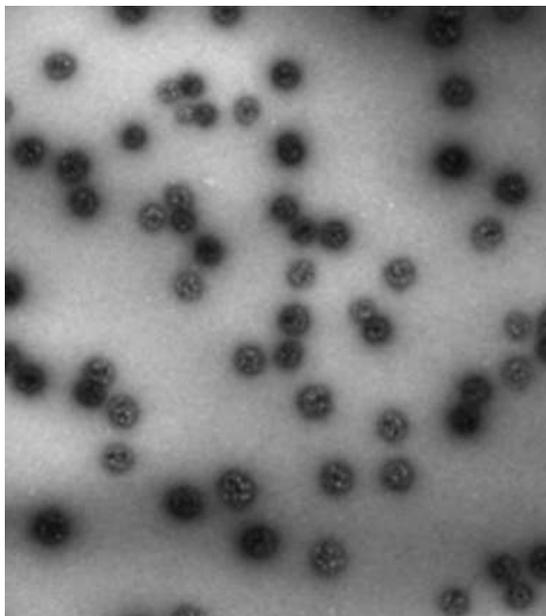


Figura 3. Analisi morfologica effettuata al TEM della formulazione NPsB 5.

3.4 Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs caricate con ICG

I valori di diametro medio e di PI per la formulazione **NPsICG 1** sono di $120\pm 1,2$ nm e $0,04\pm 0,02$. I bassi valori di PI indicano un'omogeneità dimensionale.

La stabilità fisica delle NPs cariche, in funzione del tempo e delle condizioni di conservazione è mostrata nella figura 4. L'analisi macroscopica della dispersione ha rivelato l'assenza di aggregati particellari visibili, inoltre non si sono verificate delle

variazioni in termini di dimensioni e PI ($P > 0,05$), indicando una buona stabilità della formulazione.

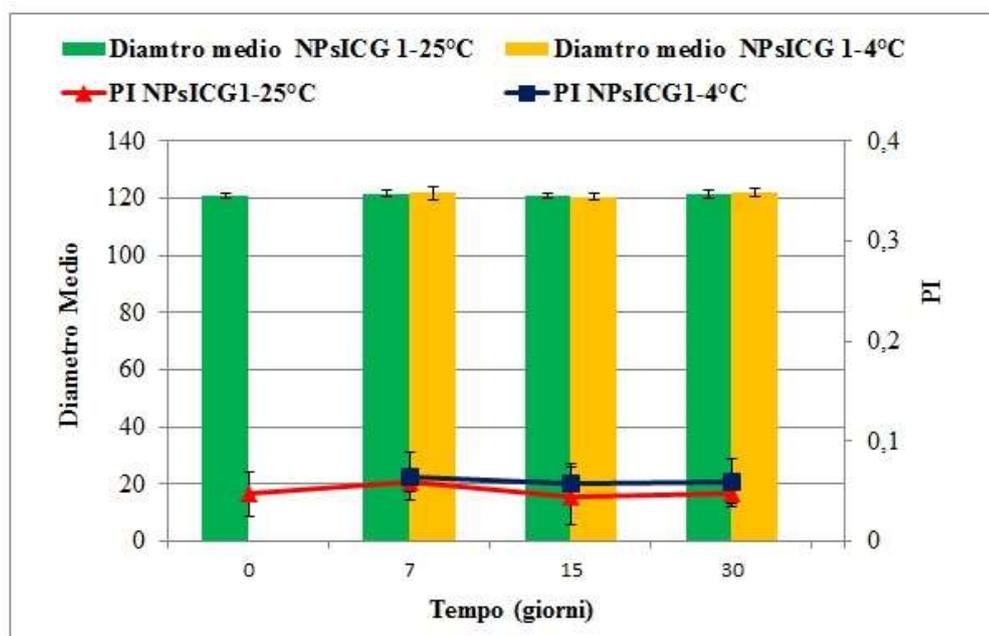


Figura 4. Stabilità fisica della formulazione NPsiCG 1 .

Le immagini al TEM mostrano delle particelle sferiche, meno disperse rispetto alle NPs bianche, probabilmente per la formazione di piccoli aggregati non visibili a occhio nudo. Con un ingrandimento 100000x si osservano tre tipologie di particelle con differente morfologia (figura 5). Alcune particelle hanno un contenuto elettrondenso medio-basso e omogeneo che si estende a tutta l'area osservabile delle NPs. Altre presentano un contenuto elettrondenso medio-alto circondato da un anello periferico sottile. All'interno del terzo tipo di particelle è invece presente un contenuto irregolare.

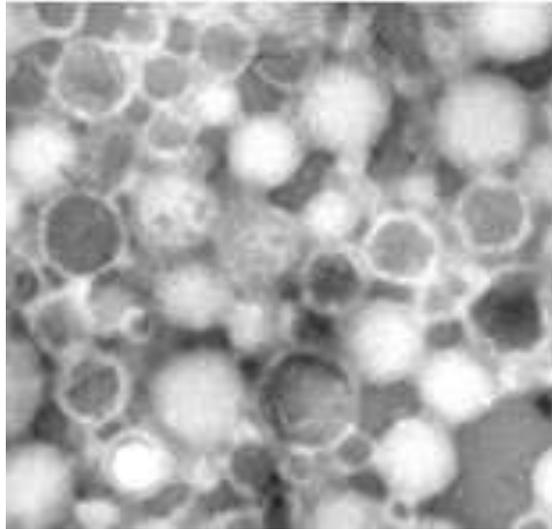


Figura 5. Analisi morfologica effettuata al TEM della formulazione NPsICG 1.

L'intensità di fluorescenza delle NPs caricate con ICG e della soluzione acquosa di ICG (ICG 100 $\mu\text{g/ml}$) sono riportate nella tabella 5. I risultati ottenuti coincidono con quelli riportati in letteratura per una soluzione acquosa di ICG [45]. In particolare, nel caso della soluzione di ICG, l'intensità di fluorescenza aumenta al crescere della concentrazione di colorante, fino ad un massimo di 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Ulteriori incrementi della concentrazione di ICG causano una riduzione della fluorescenza. Le NPs cariche mostrano circa lo stesso andamento, però la più alta intensità di fluorescenza si ottiene con una concentrazione di colorante pari 10 $\mu\text{g/ml}$. All'aumentare della concentrazione di ICG, il picco di emissione si sposta da 806 a 825 nm per la soluzione di ICG e da 810 a 850 nm per le NPs cariche. Questo spostamento della lunghezza d'onda del picco di emissione è probabilmente dovuto alla formazione di aggregati molecolari di ICG ad alte concentrazioni, i quali assorbono ed emettono a lunghezze d'onda maggiori rispetto alla singola molecola di colorante [45].

Inoltre, i dati raccolti in tabella mostrano che, per concentrazioni di ICG superiori a 2,5 $\mu\text{g/ml}$, le NPs presentano sempre un'intensità di fluorescenza superiore, se confrontate con le corrispondenti soluzioni di ICG. L'analisi delle NPs bianche conferma l'assenza d'interferenze nello spettro di emissione, infatti, nessun picco di fluorescenza è stato trovato nel range di lunghezza d'onda compreso tra 800 e 850 nm.

Sulla base dei risultati ottenuti dall'esperimento precedente, la dispersione di NPs e la soluzione acquosa con una concentrazione di colorante pari a 10 $\mu\text{g/ml}$ (concentrazione

alla quale la dispersione di NPs viene letta meglio dallo spettrofluorimetro) sono state scelte per valutare la stabilità dell'ICG in acqua (figura 6). È interessante osservare che l'intensità di fluorescenza delle NPs cariche non cambia nel corso del tempo, indicando un miglioramento della stabilità dell'ICG. Al contrario, la marcata riduzione della fluorescenza della soluzione è dovuta alla degradazione dell'ICG in acqua.

Concentrazione ICG (µg/ml)	Picco di emissione soluz. ICG (nm)	Picco di emissione NPsICG 1 (nm)	Intensità di fluorescenza soluz. ICG (unità arbitrarie)	Intensità di fluorescenza NPsICG 1 (unità arbitrarie)
100	825	850	72	15081,5
10	821	822	9268,2	60849
5	816	817	13268	43412
2,5	814	815	16620	26056,5
1	811	811	11038,5	11625
0,5	809	810	6627,5	6150,2
0,1	806	810	1617,5	2008,3

Tabella 5. Picchi di emissione ed intensità di fluorescenza delle NPs caricate con ICG e corrispondenti soluzioni acquose di colorante a differenti concentrazioni.

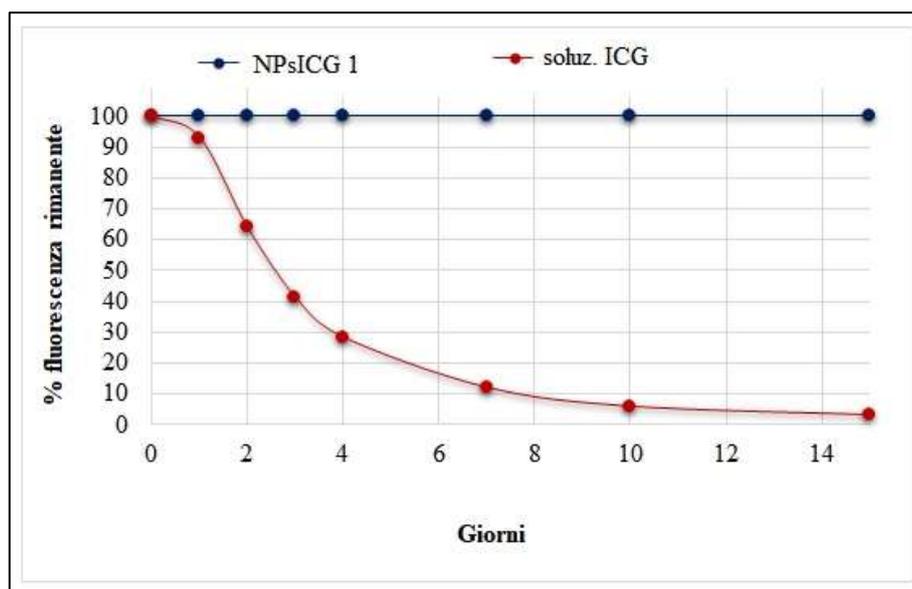


Figura 6. Stabilità in acqua della dispersione di NPs cariche e della corrispondente soluzione di ICG.

Gli studi effettuati dimostrano l'effettivo aumento della stabilità in acqua dell'ICG, ottenuto mediante la formulazione di NPs. L'incremento della stabilità in mezzo acquoso delle NPs cariche, rispetto alla soluzione di ICG è un interessante vantaggio per l'uso clinico di questo colorante e potrebbe essere dovuto alle interazioni tra l'ICG e la matrice polimerica. In questo modo l'ICG è protetta dall'ambiente circostante e viene evitata la formazione d'interazioni tra le molecole del colorante stesso, favorendo la presenza di molecole singole [46, 47]. Saxena et al. hanno infatti riportato che in acqua si verificano trasformazioni fisico-chimiche a carico dell'ICG, come l'aggregazione, le quali causano perdita della fluorescenza, decolorazione, riduzione dell'assorbimento della luce e spostamento del picco di emissione. Inoltre alte temperature e l'esposizione alla luce possono aumentare la degradazione dell'ICG in acqua [44].

3.5 Test di citotossicità

La citotossicità della formulazione **NPsB 5** è stata valutata su linee cellulari Caco-2 con il saggio del MTT, utilizzando il mezzo di coltura come controllo. Gli effetti di concentrazioni decrescenti di NPs sulla vitalità cellulare sono riportati nella figura 7. I risultati mostrano una soppressione della proliferazione cellulare di tipo dose-dipendente. Non è stata osservata morte cellulare per una concentrazione di NPs pari a

7,5 $\mu\text{g/ml}$ mentre la vitalità cellulare si riduce a circa il 4% aumentando la concentrazione a 75 e 750 $\mu\text{g/ml}$.

Questa correlazione tra citotossicità e concentrazione di NP è stata osservata in precedenza da Gonzalez-Martin et al. [48] e Lherm et al. [12]. Il meccanismo alla base dell'azione citotossica di queste NPs non è stato ancora perfettamente chiarito. Couvreur et al. [23] hanno suggerito che uno dei più importanti prodotti di degradazione delle NPs di PECA è la formaldeide, la quale può essere responsabile di danno cellulare. In un recente lavoro, è stata riportata la tossicità di NPs intatte e dei corrispettivi prodotti di degradazione in 12 diverse linee cellulari. È interessante notare che gli autori hanno osservato come le principali responsabili della citotossicità erano le NPs intatte e non i prodotti di degradazione. Inoltre si è visto che la tossicità era dipendente dalla linea cellulare. Infatti, la diversa capacità delle varie linee cellulari di interagire con le NPs e di endocitarle, possono influenzare la citotossicità [49]. Pertanto, il meccanismo alla base della tossicità delle NPs di PECA deve essere ulteriormente studiato. Tuttavia, il saggio del MTT non è in grado di valutare perfettamente il complesso effetto tossico che queste NPs potrebbero avere *in vivo* pertanto si è deciso di determinare l'azione antitumorale di questa formulazione su sistemi più complessi, gli sferoidi tumorali 3D.

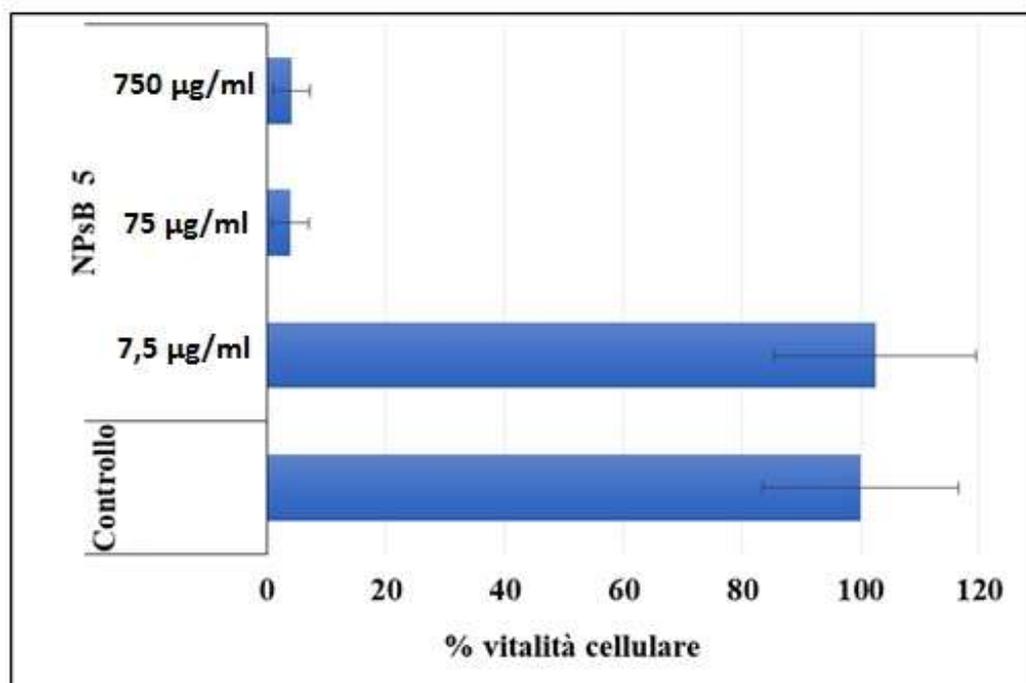


Figura 7. Citotossicità della formulazione NP5B.

3.6 Valutazione dell'attività antitumorale delle NPs bianche su modelli di sferoidi tumorali 3D

Recentemente, in vari lavori di ricerca è stata riportata l'implicazione del microambiente tumorale nei processi di crescita del cancro, nello sviluppo delle metastasi e nella resistenza alle terapie anticancro. Gli studi su nuove sostanze per le terapie antitumorali necessitano quindi di modelli che riproducano l'ambiente cellulare ed extracellulare attorno al quale si sviluppa il tumore. Generalmente per la valutazione degli effetti citotossici, i chemioterapici vengono testati su cellule che crescono in monostrato le quali però non rispecchiano il microambiente tumorale, di conseguenza questi sistemi non riescono a riprodurre il complesso effetto che queste sostanze hanno *in vivo* [50]. I modelli di sferoidi tumorali 3D sono invece molto più rappresentativi della struttura e del microambiente tumorale rispetto alle colture monostrato [51].

In questo lavoro l'attività antitumorale delle NPs di PECA bianche (formulazione **NPsB 5**) è stata valutata su sferoidi tumorali di carcinoma epatocellulare (HepG2) e di adenocarcinoma renale (A498).

Una delle sfide più importanti per la nanotossicologia è la preparazione di NPs che siano stabili in diverse sospensioni acquose pertanto come esperimento preliminare è stata valutata la precipitazione della formulazione nel mezzo di coltura cellulare completo. Non sono stati osservati precipitati di particelle, suggerendo che il sistema è stabile nel mezzo (dati non mostrati). In seguito, gli sferoidi tumorali sono stati trattati con varie concentrazioni di NPs per 72 ore e il volume e la morte di entrambi i modelli tumorali sono stati analizzati in diversi tempi (6, 12, 18, 24, 48 e 72 ore di trattamento). Il trattamento con la formulazione induce morte cellulare in entrambi i modelli tumorali (Figure 8 e 9), sebbene un significativo aumento della morte cellulare negli sferoidi HepG2 si osserva a una concentrazione inferiore rispetto agli sferoidi A498 (12 µg/ml in A498, 5,9 µg/ml in HepG2). Inoltre, un'alterazione della morfologia sferoidale appare dopo 6 h di trattamento in entrambi i modelli per concentrazioni elevate di NPs, indicando una rapida morte cellulare (47 µg/ml o superiore in entrambi i modelli tumorali).

La morte cellulare è accompagnata da una riduzione della crescita degli sferoidi HepG2 fino a una concentrazione di NPs pari a 5,9 µg/ml. Negli sferoidi A498, non si ha

riduzione della crescita tumorale nei campioni trattati, probabilmente poiché nei campioni non trattati non è stata in precedenza osservata crescita del tumore. Né la riduzione della crescita né la morte cellulare si sono verificate in entrambi i modelli di sferoidi trattati con NPs alla concentrazione di 2,9 $\mu\text{g/ml}$.

I risultati quindi mostrano che le NPs hanno un'azione antitumorale su entrambi i modelli di sferoidi e l'efficacia del trattamento può essere migliorata con l'aumento della concentrazione delle NPs e con l'estensione del tempo di contatto.

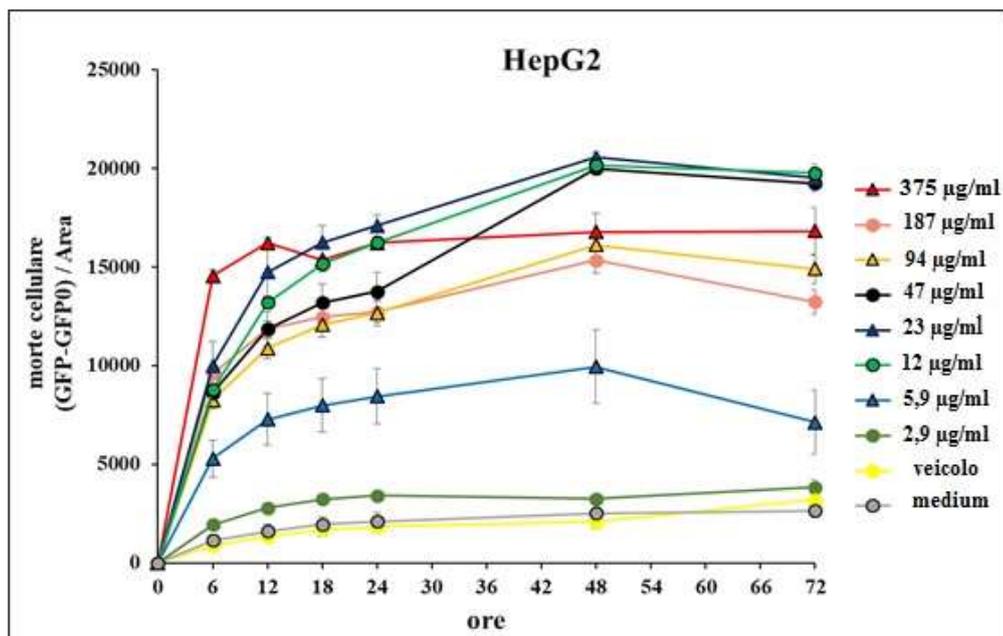


Figura 8. Morte cellulare a diversi tempi di trattamento in modelli di sferoidi tumorali di carcinoma epatocellulare (HepG2).

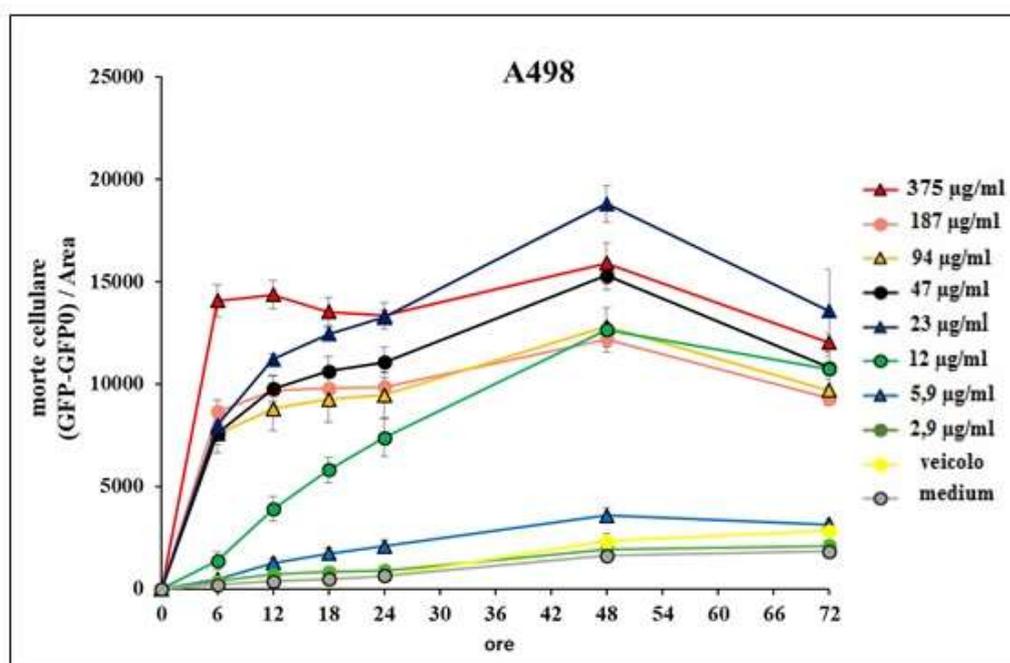


Figura 9. Morte cellulare a diversi tempi di trattamento in modelli di sferoidi tumorali di adenocarcinoma renale (A498).

3.7 Studi di “uptake” cellulare

L'interazione biologica *in vitro* tra le NPs (sia bianche **NPsB 5**, che cariche **NPsICG 1**), e Caco-2 è stata studiata al microscopio ottico su sezioni semifini colorate con blu di toluidina. I campioni sono stati osservati con un filtro giallo al fine di migliorare la sensibilità alla visualizzazione dell'ICG. Sia nelle cellule tumorali Caco-2 trattate con le **NPsB 5**, che in quelle non trattate usate come controllo (figura 10 A e B rispettivamente), non sono visibili NPs intorno e all'interno delle cellule. Le cellule trattate con **NPsICG 1** mostrano un'interazione con le NPs, rilevabile dalla presenza di punti verdi all'interno di alcune cellule (figura 10 C, frecce bianche). Le NPs cariche, si sono quindi mostrate dei buoni sistemi per la veicolazione dell'ICG all'interno delle Caco-2, pertanto la fluorescenza emessa dal colorante può essere sfruttata per diagnosticare la presenza di cellule tumorali.

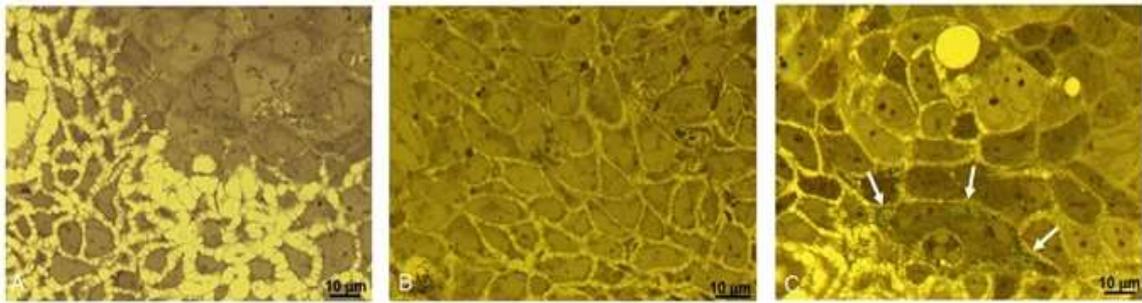


Figure 10. Studi di uptake cellulare con NPs bianche (NPsB 5) e cariche (NPsICG 1). A) cellule trattate con NPs bianche; B) cellule non trattate usate come controllo C) cellule trattate con NPsICG 1.

4 Conclusioni

I risultati presentati in questo lavoro dimostrano che le NPs di PECA offrono un'opportunità per migliorare l'uso clinico dell'ICG e sono dei promettenti sistemi teranostici. Le NPs migliorano la stabilità dell'ICG in soluzione acquosa e permettono di veicolarla all'interno di cellule tumorali, migliorando la sua utilità ed efficacia nell'imaging del cancro. Inoltre le NPs sono dotate di una spiccata attività antitumorale nei confronti di entrambi i modelli di sferoidi tumorali, rispecchiando quella che potrebbe essere la loro attività *in vivo*.

Oltre che nella diagnosi, recentemente, è stato studiato il ruolo dell'ICG anche nel trattamento dei tumori. In letteratura, è stato ampiamente riportato l'uso dell'ICG nella terapia fotodinamica (PDT) e nella terapia fototermica (PTT) [52, 53] a causa della sua forte banda di assorbimento che consente una maggiore penetrazione tissutale [54]. L'attivazione delle NPs caricate con l'ICG con un fascio di luce della lunghezza d'onda appropriata potrebbe essere utilizzata per distruggere selettivamente le cellule tumorali. Potrebbe quindi essere utile eseguire ulteriori studi per valutare l'attività terapeutica dell'ICG presente in questa formulazione di NP. In questo modo si potrebbe avere un effetto antitumorale sinergico, dovuto sia alla tossicità della formulazione tal quale che a quello dell'ICG.

5 Bibliografia

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber R, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA oncology*. 2017; 3(4):524-548.
2. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews cancer*. 2005, 5(3):161.
3. Danhier, F, Feron O, e Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release*. 2010; 148(2):135-146.
4. Sulheim, E, Baghirov H, Haartman E, et al. Cellular uptake and intracellular degradation of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Nanobiotechnology*. 2016; 14(1):1.
5. Katti D, e Krishnamurti N. Anionic polymerization of alkyl cyanoacrylates: in vitro model studies for in vivo applications. *J Appl Polym Sci*. 1999; 74(2):336-344.
6. Fattal E., Peracchia, MT, e Couvreur, P. "Poly (Alkylcyanoacrylates)" in *Handbook of Biodegradable Polymers*, ed. A.J. Domb, J. Kost, D.M. Wiseman (Amsterdam: Harwood). 1998:183-202.
7. Chauvierre C, Marden MC, Vauthier C, et al. Heparin coated poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles coupled to hemoglobin: a new oxygen carrier. *Biomaterials*. 2004; 25:3081-3086.
8. Cabeza L, Ortiz R, Arias JL. Et al. Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1291-1306.
9. Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, et al. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly (alkylcyanoacrylate)(core/shell) nanoparticles. *J Control Release*. 2008; 125:50-58.
10. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, et al. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv. Rev*. 2003; 55: 519-548.
11. Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, et al. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Control Release*. 2003; 93(2):151-160.
12. Lherm C, M ller RH, Puisieux F, et al. Alkylcyanoacrylate drug carriers: II. Cytotoxicity of cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length. *Int J Pharm*. 1992; 84:13-22.

13. Kokudo N, e Ishizawa T. Clinical application of fluorescence imaging of liver cancer using indocyanine green. *Liver Cancer*. 2012; 1:15-21.
14. Ma Y, Tong S, Bao G, et al. Indocyanine green loaded SPIO nanoparticles with phospholipid-PEG coating for dual-modal imaging and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2013; 34:7706-7714.
15. Saxena V, Sadoqi M, and Shao J. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J Pharm Sci*. 2003; 92:2090-2097.
16. Proulx ST, Luciani P, Derzsi S, et al. Quantitative imaging of lymphatic function with liposomal indocyanine green. *Cancer Res*. 2010; 70:7053-7062.
17. Rao J, Dragulescu-Andrasi A, and Yao H. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18:17-25.
18. Sheng Z, Hu D, Xue M, et al. Indocyanine green nanoparticles for theranostic applications. *Nanomicro Lett*. 2013; 5:145-150.
19. Porcu EP, Salis A, Gavini E, et al. Indocyanine green delivery systems for tumour detection and treatments. *Biotechnol Adv*. 2016; 34:768-789.
20. Hao Y, Wang L, Zhao Y, et al. Targeted Imaging and Chemo-Phototherapy of Brain Cancer by a Multifunctional Drug Delivery System. *Macromol Biosci* 2015; 15:1571-1585.
21. Bahmani B, Guerrero Y, Bacon D, et al. (2014). Functionalized polymeric nanoparticles loaded with indocyanine green as theranostic materials for targeted molecular near infrared fluorescence imaging and photothermal destruction of ovarian cancer cells. *Lasers Surg. Med*. 46, 582-592.
22. Patel RH, Wadajkar AS, Patel NL, et al. Multifunctionality of indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles for enhanced optical imaging and hyperthermia intervention of cancer. *J Biomed Opt* 2012; 17:046003.
23. Couvreur P, Lenaerts V, Leyh D, et al. "Design of biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as a drug carrier" in *Microspheres and Drug Therapy: Pharmaceutical Immunological and Medical Aspects*, ed. S.S. Davis, L. Illum, J.G. McVie, E. Tomillson (Amsterdam: Elsevier Science), 1984; 103-114.
24. Couvreur P, e Vauthier, C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. *J Control Release*. 1991; 17:187-198.
25. Locke Me Kirhman N. Preparation procedures for examining icosahedral and filamentous viruses. *J Ultrastruct Res*. 1971; 47:361.
26. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri. KWNH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9(7):671-675.

27. Selby M, Delosh R, Laudeman J, et al. 3D models of the NCI60 cell lines for screening oncology compounds. *SLAS Discov.* 2017; 22:473-483.
28. Fiorentino FP, Bagella L, e Marchesi I. A new parameter of growth inhibition for cell proliferation assays. *J Cell Physiol.* 2018; 233:4106-4115.
29. Vinci M, Gowan S, Boxall F, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* 2012; 10:1
30. Behan N, Birkinshaw C, e Clarke, N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerisation and particle formation. *Biomaterials.* 2001; 22:1335-1344.
31. Arias JL, Gallardo V, Gomez-Lopera SA, et al. Synthesis and characterization of poly (ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release.* 2001; 77:309-321.
32. Nicolas J, e Couvreur P. Synthesis of poly (alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley. Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2009; 1:111-127.
33. Yordanov G. Poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles as drug carriers: 33 years later. *Bulg J Chem.* 2012; 1:61-72.
34. Yordanov G, Skrobanska R, e Evangelatov A. Colloidal formulations of etoposide based on poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation, physicochemical properties and cytotoxicity. *Colloid Surf B Biointerfaces.* 2013; 101:215-222.
35. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001; 70:1-20.
36. Yang SC, Ge HX, Hu Y, et al. Formation of positively charged poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan. *Colloid Polym Sci.* 2000, 278:285-292.
37. Yordanov G, e Bedzhova Z. Poly (ethyl cyanoacrylate) colloidal particles tagged with Rhodamine 6G: preparation and physicochemical characterization. *Cent Eur J Chem.* 2011; 9:1062.
38. Peracchia MT, Vauthier C, Puisieux F, et al. Development of sterically stabilized poly (isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly (ethylene glycol). *J Biomed Mater Res.* 1997; 34(3):317-326.
39. Christov NC, Ganchev DN, Vassileva ND., et al. Capillary mechanisms in membrane emulsification: oil-in-water emulsions stabilized by Tween 20 and milk proteins. *Colloids Surf A.* 2002; 209(1).83-104.

40. Zhang Z, Zhang J, Qu C, et al. Label free colorimetric sensing of thiocyanate based on inducing aggregation of Tween 20-stabilized gold nanoparticles. *Analyst*. 2012; 137(11):2682-2686.
41. Duan J, Zhang Y, Han S, et al. Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm*. 2010; 400:211-220.
42. Musumeci T, Ventura CA, Giannone I, et al. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int J Pharm*. 2006; 325:172-179.
43. Douglas SJ, Davis SS, e Holding SR. Molecular weights of poly (butyl 2-cyanoacrylate) produced during nanoparticle formation. *Brit Polym J*. 1985; 17(4):339-342.
44. Chithrani BD, Ghazani AA, e Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. 2006; 6:662-668.
45. Saxena V, Sadoqi M, e Shao J. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J Pharm Sci*. 2003; 92:2090-2097.
46. Saxena V, Sadoqi M, e Shao J. Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2004; 74:29-38.
47. El-Daly SM, Gamal-Eldeen AM, Abo-Zeid MA, et al. Photodynamic therapeutic activity of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10:173-185.
48. González-Martín G, Figueroa C, Merino I, et al. Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potential lysosomatropic carrier: preparation and trypanocidal activity. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000, 49(2):137-142.
49. Sulheim, E, Iversen TG, To Nakstad V, et al. Cytotoxicity of Poly (Alkyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(11):2454.
50. Mikhail AS, Eetezadi S, e Allen C. Multicellular tumor spheroids for evaluation of cytotoxicity and tumor growth inhibitory effects of nanomedicines in vitro: a comparison of docetaxel-loaded block copolymer micelles and Taxotere®. *PLoS ONE* 2013; 8:4
51. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv*. 2016; 34:1427-1441.

52. El-Daly SM, Gamal-Eldeen AM, Abo-Zeid MA, et al. Photodynamic therapeutic activity of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10:173-185.
53. Jian WH, Yu TW, Chen CJ, et al. Indocyanine green-encapsulated hybrid polymeric nanomicelles for photothermal cancer therapy. *Langmuir.* 2015; 31:6202-6210.
54. Skřivanová K, Škorpíková J, Švihálek J, et al. Photochemical properties of a potential photosensitiser indocyanine green in vitro. *J Photochem Photobiol.B Biol.* 2006; 85:150-154

CAPITOLO IV

Sviluppo di nanoparticelle solide lipidiche contenenti Genisteina come possibile agente antitumorale per un trasporto linfatico intestinale

Abstract

Il trasporto di farmaci attraverso il sistema linfatico è un processo molto complesso influenzato dalle caratteristiche fisiologiche di questo sistema. La veicolazione di sostanze attraverso i vasi linfatici ha numerosi vantaggi tra cui il ridotto metabolismo di primo passaggio e il trasporto di farmaci verso patologie che utilizzano il sistema linfatico per progredire. Quest'ultimo può essere quindi utilizzato come via di trasporto per sostanze con bassa biodisponibilità orale e per molecole destinate al trattamento del cancro e di altre infezioni umane. La Genisteina è uno dei principali isoflavoni presenti nella soia e negli ultimi anni ha ricevuto particolare attenzione come agente anticancro, antiossidante e antiproliferativo. Tuttavia l'utilizzo di questa molecola è limitato dalla sua ridotta biodisponibilità orale a causa della scarsa solubilità in acqua e dell'elevata sensibilità alla luce e al calore. Per migliorare la stabilità della Genisteina e per promuoverne la veicolazione attraverso i vasi linfatici intestinali dopo somministrazione orale, in questo lavoro sono state preparate delle nanoparticelle solide lipidiche. Inizialmente sono stati effettuati degli studi formulativi per ottenere la formulazione ideale la quale è stata quindi caricata con la Genisteina e sottoposta a caratterizzazione. Le nanoparticelle preparate hanno delle dimensioni ideali per l'assorbimento attraverso i vasi linfatici intestinali inoltre mostrano buone capacità di caricamento del farmaco. La formulazione ottenuta potrebbe quindi aprire nuove prospettive per l'ottenimento di un sistema capace di veicolare farmaci con ridotta biodisponibilità orale per il trattamento di metastasi che diffondono attraverso il sistema linfatico.

1 Introduzione

Il sistema linfatico è un sistema di drenaggio a una via, responsabile del trasporto dei fluidi dallo spazio interstiziale dei tessuti al torrente circolatorio, pertanto è importante nella regolazione della pressione tissutale, nella difesa immunitaria e nell'assorbimento dei grassi a livello intestinale.

Come detto nell'introduzione di questo lavoro di tesi, il sistema linfatico ha un ruolo nel processo di disseminazione di metastasi tumorali e infezioni; i vasi linfatici rappresentano infatti una via primaria per la diffusione di molti tumori solidi. Tuttavia ancora poco si sa su patologie linfatiche e interstiziali, linfangiogenesi e sull'interazione tumore-sistema linfatico che porta allo sviluppo di metastasi. Diversi fattori contribuiscono a una ridotta comprensione delle metastasi linfatiche: una conoscenza ancora incompleta della biologia del sistema linfatico, una mancanza di modelli sperimentali e il presupposto che i tumori solidi manchino di vasi linfatici [1]. Quest'ultimo punto è stato recentemente contestato da numerosi studi, che non solo dimostrano la presenza di vasi linfatici nei tumori ma anche che l'estensione delle metastasi è direttamente correlata al grado di linfangiogenesi tumorale [2]. I vasi linfatici presentano numerosi vantaggi rispetto alla circolazione sanguigna come via di trasporto per le cellule tumorali, così come per i globuli bianchi del sangue: sono più grandi dei capillari sanguigni e il flusso è più lento. Il fluido linfatico quasi identico a quello interstiziale, promuove la vitalità cellulare e i linfonodi fungono da "incubatori" ideali per le cellule. Inoltre, essendo più difficili da raggiungere, i vasi linfatici forniscono una maggior possibilità alle cellule tumorali per sviluppo di metastasi [3]. Grazie alla sua particolare struttura e al ruolo che svolge nella diffusione di metastasi e infezioni, il sistema linfatico è stato studiato come una nuova via per il "drug delivery" di immunomodulatori, chemioterapici e agenti di "imaging". Tuttavia il sistema linfatico non è facilmente accessibile limitando pertanto la quantità di farmaco che raggiunge tale sistema e di conseguenza, le metastasi linfonodali [4]. Per tale motivo, recentemente, nuovi sistemi nanoparticellari destinati a un "target" linfatico hanno ricevuto molta attenzione. Tali sistemi sono utilizzati per aumentare l'effetto terapeutico di farmaci chemioterapici e l'assorbimento orale di macromolecole [5].

Per penetrare all'interno dei vasi, le particelle devono attraversare le giunzioni presenti nei capillari linfatici, perciò i nanocarriers hanno un elevato potenziale per il rilascio di chemioterapici nelle metastasi linfatiche. In particolare i veicoli nanoparticellari possono essere utilizzati per migliorare la penetrazione, la ritenzione linfatica e la biodisponibilità del farmaco, evitando effetti collaterali legati alla dose, diluizione sistemica e degradazione epatica [6].

Varie vie di somministrazione possono essere impiegate per la veicolazione di sostanze al sistema linfatico, tra cui la via orale, sottocutanea, intramuscolare e intraperitoneale ma tra queste la via orale è sicuramente la più accettata, a causa degli svantaggi associati alle altre vie di somministrazione. Il trasporto linfatico intestinale è un percorso attraverso il quale vengono assorbiti i lipidi e un numero crescente di farmaci lipofili o veicolati da carrier lipidici in seguito a somministrazione orale. Questi ultimi, una volta raggiunto l'intestino penetrano negli enterociti intestinali e subiscono il fisiologico assorbimento dei lipidi introdotti con la dieta, che porta alla formazione dei chilomicroni [7]. Fisiologicamente i lipidi introdotti con la dieta vengono idrolizzati ad opera di lipasi e in seguito gli enterociti riesterificano gli acidi grassi e i monogliceridi per formare trigliceridi e fosfolipidi attraverso due principali vie biosintetiche, ovvero la via del 2-monogliceride e quella del glicerolo-3-fosfato. I trigliceridi entrano nel lume del reticolo endoplasmatico e vengono assemblati in lipoproteine, i così detti chilomicroni, i quali vengono trasportati nell'apparato di Golgi e immessi nella circolazione linfatica mediante esocitosi. I chilomicroni sono le più grandi lipoproteine, il cui diametro può raggiungere anche 1 μm . In particolare la loro dimensione dipende significativamente dal tasso di assorbimento dei grassi e dal tipo e dalla quantità di grasso assorbito. Costano di una superficie idrofila costituita da fosfolipidi, colesterolo e apolipoproteine, e di un nucleo di lipidi neutri, soprattutto trigliceridi ed esteri del colesterolo [8].

Le nanoparticelle solide lipidiche (SLN) hanno delle caratteristiche che le rendono dei promettenti candidati per il rilascio di farmaci a livello linfatico dopo somministrazione orale [9]. Le formulazioni lipidiche possono migliorare la biodisponibilità orale dei farmaci in quanto ne incrementano la dissoluzione e la permeabilità intestinale, favorendo il passaggio attraverso le mucose [10, 11]. Le SLN sono dei sistemi di "drug

delivery” formati da una matrice lipidica solida, ideali per veicolare i farmaci al sistema linfatico associato all’intestino. Le piccole dimensioni di queste formulazioni garantiscono un efficiente assorbimento dei farmaci a livello intestinale, in particolare a livello linfatico, esclusivo per particelle con un diametro compreso tra i 20 e i 500 nm [12]. Le SLN possono indurre la stimolazione della formazione dei chilomicroni da parte degli enterociti, promuovendo l’assorbimento della matrice lipidica attraverso i vasi linfatici intestinali [13]. Essendo in seguito trasportate nella circolazione sistemica, le SLN hanno la capacità di aumentare la quantità di farmaco assorbita [14]. Aji Alex et al., nel 2011, hanno dimostrato come SLN di Compritol ATO888 destinate ad un target linfatico intestinale abbiano incrementato la percentuale di Lopinavir secreto nella linfa, rispetto ad una soluzione del farmaco libero, inoltre anche la biodisponibilità è stata aumentata [15]. SLN di acido palmitico sono state preparate per aumentare la biodisponibilità orale della Nimodipina, in seguito ad un trasporto linfatico [16].

La Genisteina (GEN) appartiene alla famiglia dei fitoestrogeni, i maggiori componenti della soia; essa, come la daidzeina e altri isoflavoni, è dotata di attività antiossidante, dovuta al gruppo fenolico e alla capacità di donare legami idrogeno, e di azione estrogenica, grazie all’affinità per i recettori degli estrogeni. Recentemente è cresciuto l’interesse nei confronti di questa sostanza per la sua potenziale azione protettiva contro varie malattie, tra cui alcuni tipi di tumore, dovuta alla capacità di ridurre la proliferazione delle cellule cancerogene [17]. Vari studi hanno mostrato come, nelle popolazioni asiatiche che assumono elevate quantità di isoflavoni, contenuti nella soia e nei preparati ricchi di soia, si riduca il rischio di osteoporosi e della sindrome climaterica associate alla menopausa, di patologie cardiovascolari e di cancro al seno e all’utero [18]. I fitoestrogeni, strutturalmente e funzionalmente simili agli estrogeni, possono esercitare un’attività agonista e antagonista estrogenica, legandosi ai recettori degli estrogeni, seppur con minore affinità rispetto all’estradiolo. In particolare la GEN può interagire con entrambe le isoforme dei recettori degli estrogeni, ER α e ER β ; i primi sono implicati nell’azione proliferativa e riproduttiva, mentre i secondi nell’azione ripartiva e antiproliferativa. Il fatto che la GEN sia in grado di inibire la carcinogenesi, lo rende un promettente agente chemiopreventivo, e potrebbe essere impiegato come coadiuvante nella terapia del cancro, in virtù della sua capacità di

ridurre chemioresistenza e radioresistenza [19, 20]. Tuttavia l'uso clinico della GEN è limitato dalla sua bassa solubilità in acqua e dall'ampio metabolismo che subisce a livello intestinale ed epatico; inoltre se veicolata mediante forme farmaceutiche convenzionali, la sua stabilità può risultare compromessa, data la sua sensibilità alla luce e al calore [21]. Per migliorarne la solubilità in acqua e la biodisponibilità orale sono stati studiati e proposti vari sistemi di rilascio, quali ad esempio microparticelle [22], micelle [23], complessi di inclusione con ciclodestrine [24] e nanoparticelle di Eudragit [18]. Marquez-Andrade et al. hanno inoltre proposto SLN per uso topico, per incrementare la permeazione della GEN attraverso la pelle [25].

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di preparare SLN destinate a una somministrazione orale per un trasporto intestinale linfatico e veicolanti il fitoestrogeno GEN. Come matrice lipidica solida per la preparazione delle SLN è stato utilizzato il Compritol ATO888, una miscela lipidica costituita da mono-, di- e trigliceridi dell'acido beenico. In particolare lo studio è rivolto all'individuazione dei parametri formulativi adatti all'ottenimento di SLN con dimensioni comprese in un range tra 20 e 500 nm, idonee per il raggiungimento del target linfatico, e capaci di veicolare la GEN al fine di stabilizzare il farmaco e aumentarne la biodisponibilità orale.

2 Materiale e metodi



Figura 1. Schema rappresentante le principali fasi del lavoro.

2.1 Materiali

SOSTANZA	DESCRIZIONE
Genisteina 98%	P.M. 270,23 p.f. 297-298°C Lotto n° V1500887 Farmalabor Canosa di Puglia (BT), Italia
Tween 80	Lotto n° A0233969 Acros Organics Geel, Belgio
Compritol ATO 888	Lotto n° 100160 Gattefossè Saint-Priest Cedev, France
H₂O bidistillata ultrapura	Ottenuta con il sistema milliq R4 Millipore; Milano; Italia
Metanolo ≥ 99,8%	Lotto n° SZBD0310V Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri)
Acido acetico	Sigma, Steinheim, Germany
Acetonitrile	Merck, Darmstadt, Germany

2.2 Apparecchiature

APPARECCHIATURE	CARATTERISTICHE
Bilancia analitica	Sartorius AC211S, Sartorius AG, Gottingen, Germania
Piastra agitante riscaldante	ARE Heating magnetic stirrer, CDL VELP Scientifica Usmate Velate, Italia
Coulter nanosizer	Beckman Coulter Inc., Miami, Florida (USA)
Filtri di PTFE	Lotto n° 54131-U Ø 13 mm Ø poro 0.2 µm SUPELCO, Bellefonte, PA-USA
Ultra-Turrax	Ultra-Turrax IKA T25 digital Laboratory Equipment Germany
Sonicator a sonda	Vibracell VC 50 Sonics&Materials, Inc (Newtown, Connecticut)
HPLC-DAD system	Palo Alto, CA, USA
Vortex	Techno Kartell, TK3S
Centrifuga	VWR, serial w009222, USA
Bagno Termostato	GA 100, Grant instruments (Royston, Regno Unito)
Dissolutore multiplo	Erweka DT70, Erweka GmbH, Heusenstamm, Germania

2.3 Studi formulativi

La prima fase del lavoro è stata caratterizzata da un insieme di studi formulativi effettuati con lo scopo di individuare una formulazione con caratteristiche tecnologiche ideali per il processo di caricamento del farmaco e per il raggiungimento del target stabilito.

2.3.1 Preparazione della formulazione di riferimento

Una prima dispersione di SLN bianche, denominata **SLN B**, è stata preparata utilizzando “l’hot homogenization process” [26, 27]. Sono state preparate due fasi, una oleosa e una acquosa. La fase oleosa è stata ottenuta fondendo il Compritol ATO888 (C) 2 % (p/v) a 85°C, mentre la fase acquosa è stata preparata sciogliendo il surfactante Tween 80 in acqua bidistillata in modo da avere una concentrazione finale dello 0,5% (p/v). Il lipide fuso è stato aggiunto, a goccia a goccia e sotto agitazione magnetica, alla fase acquosa mantenuta alla stessa temperatura di 85°C. La pre-emulsione olio in acqua (O/A) ottenuta è stata sottoposta a un processo di omogeneizzazione utilizzando l’Ultra-Turrax con i seguenti parametri di lavoro: 14600 rpm per 5 minuti a 85°C. La nanoemulsione è stata raffreddata in modo tale da ottenere una sospensione acquosa di SLN. Al fine di valutare l’effetto del processo di raffreddamento sulle proprietà tecnologiche del sistema, il campione ottenuto è stato suddiviso in due frazioni. Una parte è stata lasciata ricristallizzare in ghiaccio sotto agitazione magnetica per dieci minuti, l’altra è stata sottoposta a un raffreddamento a temperatura ambiente per quaranta minuti.

Nella seguente tabella è riportata la composizione quali-quantitativa della formulazione di riferimento.

Campione	Fase acquosa		Fase oleosa	Compritol/Tween
	H ₂ O (ml)	Tween 80 (mg)	Compritol (mg)	80 (p/p)
SLN B	20	100	400	4/1

Tabella 1. Composizione quali-quantitativa della formulazione di riferimento

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi dimensionale della formulazione **SLN B**, è stato condotto uno studio in cui sono stati modificati alcuni parametri formulativi al fine di individuare quelli più idonei per l'ottenimento di nanoparticelle con dimensioni inferiori a 500 nm (infatti come riportato da Ghosh e Roy, un "particle size" compreso tra 20 e 500 nm è ideale per il raggiungimento di un target linfatico intestinale [28]) e caratterizzate da uniformità nella distribuzione dimensionale, stabilità nel tempo e buona capacità di caricamento del farmaco.

Le variazioni introdotte sulla composizione delle nuove formulazioni sono descritte nei paragrafi successivi.

Nello schema seguente sono riassunte le variazioni dei parametri formulativi che hanno portato all'ottenimento delle formulazioni cariche.

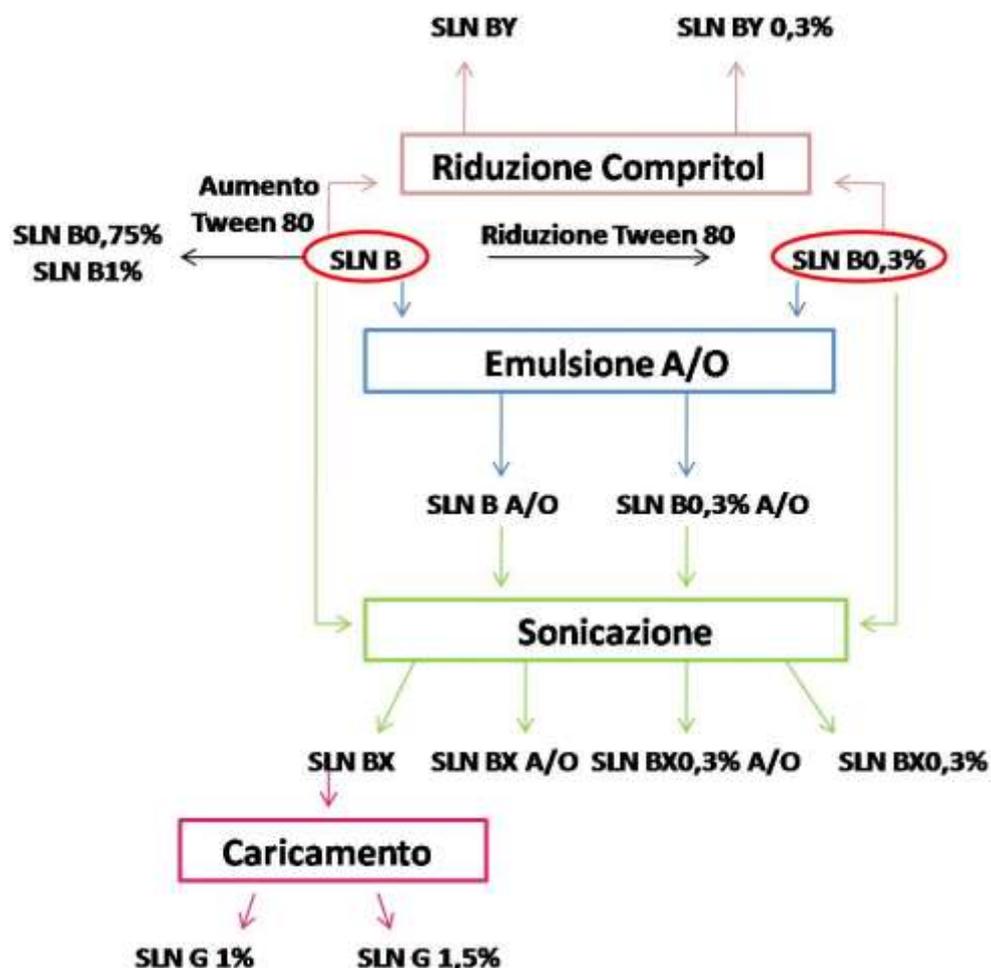


Figura 2. Variazione dei parametri formulativi introdotti nella formulazione di riferimento

2.3.2 Studi sulla variazione di concentrazione del Tween 80

L'influenza della variazione della concentrazione di Tween 80 sulle dimensioni e sull'indice di polidispersione (PI) delle SLN è stata valutata preparando tre formulazioni nelle quali è stato modificato il rapporto in peso tra C:Tween 80. Sono stati preparati i seguenti campioni: **SLN B0,75%** (rapporto Compritol:Tween 80 4:3 p/p), **SLN B1%** (rapporto Compritol:Tween 80 2:1 p/p) e **SLN B0,3%** (rapporto Compritol:Tween 80 7:1 p/p). Le formulazioni sono state preparate mantenendo una concentrazione di lipide in dispersione del 2% (p/v).

Nelle Tabelle 2 e 3 è stata riportata la composizione delle formulazioni allestite.

Campione	Fase acquosa		Fase oleosa
	H ₂ O (ml)	Tween 80 (mg)	Compritol (mg)
SLN B0,75%	20	150	400
SLN B1%	20	200	400
SLN B0,3%	20	60	400

Tabella 2. Composizione quali-quantitativa delle formulazioni

Campione	Compritol/Tween 80	Tween 80 (%p/v)	Compritol (%p/v)
SLN B0,75%	4/3	0,75	2
SLN B1%	2/1	1	2
SLN B0,3%	7/1	0,3	2

Tabella 3. Rapporti Compritol/Tween 80 e rispettive percentuali p/v dei componenti nella dispersione

2.3.3 Successive variazioni introdotte nei parametri formulativi

Tra le nanodispersioni allestite, le formulazioni **SLN B** e **SLN B0,3%**, avendo dato i migliori risultati in termini di dimensioni e PI, sono state selezionate per essere sottoposte a nuove modifiche:

- preparazione di un'emulsione acqua in olio (A/O): come riportato in letteratura [29] SLN con diametro inferiore a 300 nm possono essere ottenute preparando una pre-emulsione A/O e sottoponendola ad un processo di omogeneizzazione. Sono state pertanto preparate altre due formulazioni, **SLN BA/O** e **SLN B0,3%A/O** aggiungendo la soluzione acquosa di Tween 80, mantenuta alla temperatura di 85°C, al lipide fuso e omogeneizzando i sistemi con l'Ultra-Turrax utilizzando i parametri descritti in precedenza;
- utilizzo della sonda ad ultrasuoni: per migliorare le caratteristiche tecnologiche delle nanodispersioni è stato utilizzato un processo di omogeneizzazione mediante sonda ad ultrasuoni [15]. Le sospensioni **SLN B**, **SLN B0,3%**, **SLN BA/O** e **SLN B0,3%A/O** sono state sottoposte a sonicazione testando differenti tempi (6, 9, 12 e 15 minuti). I parametri di lavoro impiegati sono stati i seguenti: potenza di 50 watt e frequenza di 70 hertz. Tale processo ha portato all'ottenimento di ulteriori quattro formulazioni: **SLN BX**, **SLN BX0,3%**, **SLN BX A/O** e **SLN BX0,3%A/O**;
- variazione della concentrazione di C: è stata ridotta la concentrazione di lipide in dispersione all'1% p/v mantenendo costanti i rapporti C/ Tween 80 4:1 p/p e 7:1 p/p. Come riportato da Vitorino et al. [30], il diametro medio delle SLN dipende dalla concentrazione di lipide nella fase organica, infatti, un elevato contenuto di lipide porta a una fase dispersa più viscosa con conseguente riduzione dell'efficienza di omogeneizzazione. Sono state così ottenute le formulazioni **SLN BY** e **SLN BY0,3%**.

La tabella 4 riassume la composizione quali-quantitativa delle formulazioni allestite durante gli studi formulativi precedentemente descritti.

Campione	Compritol/Tween 80	Tween 80 (%p/v)	Compritol (%p/v)
SLN B	4:1	0,5	2
SLN B0,75%	4:3	0,75	2
SLN B1%	2:1	1	2
SLN B0,3%	7:1	0,3	2
SLN BA/O	4:1	0,5	2
SLN B0,3% A/O	7:1	0,3	2
SLN BX	4:1	0,5	2
SLN BX0,3%	7:1	0,3	2
SLN BXA/O	4:1	0,5	2
SLN BX0,3%A/O	7:1	0,3	2
SLN BY	4:1	0,25	1
SLN BY0,3%	7:1	0,15	1

Tabella 4. Composizione delle formulazioni ottenute variando i parametri preparativi e formulativi.

2.4 Preparazione delle SLN di Genisteina

Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi formulativi riportati in precedenza, la formulazione **SLN BX** è stata scelta per il caricamento del farmaco. Le SLN sono state preparate utilizzando “l’hot homogenization process” descritto nel paragrafo 2.3.1 seguito da ultrasonicazione. La GEN è stata miscelata con il C e la fase lipidica ottenuta, dopo fusione, è stata aggiunta alla soluzione acquosa di surfactante (0,5% p/v) scaldata in precedenza. La pre-emulsione è stata sottoposta a omogeneizzazione utilizzando una sonda a ultrasuoni per 12 minuti con potenza di 50 watt e frequenza di 70 hertz. La nanoemulsione è stata lasciata ricristallizzare in ghiaccio sotto agitazione magnetica per 10 minuti.

Durante questa fase del lavoro sono state eseguite delle prove al fine di valutare la capacità massima di caricamento del farmaco da parte delle SLN, mantenendo costante

la concentrazione di lipide in dispersione (2% p/v). Le concentrazioni di GEN testate sono state: 1- 1,5- 2- 3% (p/p) rispetto alla quantità totale di lipide in dispersione. La capacità di caricamento è stata valutata osservando macroscopicamente la dispersione di SLN. Infatti, la GEN, essendo scarsamente solubile in acqua, quando non incorporata, dà luogo a fenomeni di precipitazione.

Campione	Compritol/ Tween 80	Tween 80 (%p/v)	Compritol (%p/v)	Genisteina (%p/p)
SLN G 1%	4:1	0,5	2	1
SLN G 1,5%	4:1	0,5	2	1,5

Tabella 5. Composizione delle SLN di GEN selezionate.

2.5 Caratterizzazione chimico-fisica delle formulazioni

2.5.1 Caratterizzazione dimensionale delle formulazioni

Tutte le formulazioni preparate, sotto forma di dispersioni, sono sottoposte ad analisi dimensionale attraverso l'utilizzo del Coulter Nanosizer N5 (Beckman-Coulter Inc. Miami, Florida, USA), il cui funzionamento è basato sulla spettroscopia di correlazione fotonica (PCS). Essa è fondata sul principio della diffrazione dinamica della luce e consente di determinare il coefficiente di diffusione di piccole particelle contenute in un liquido, mediante misurazione accurata dell'intensità della luce diffratta come una funzione del tempo di interazione con le particelle. Il coefficiente di diffusione di una particella sospesa in un fluido dipende da tre fattori: la temperatura, la viscosità del fluido e le dimensioni delle particelle. A parità di temperatura e viscosità, le particelle più piccole si muovono velocemente, causando notevoli variazioni dell'intensità di diffrazione, mentre le più grandi si muovono più lentamente, causando minori variazioni. Il campione da analizzare, è posto all'interno di cuvette, nelle quali le particelle si muovono con un moto browniano che porta a movimenti casuali delle stesse. Un raggio di luce colpisce le particelle ed esse, dato il loro particolare moto, provocano la rifrazione del raggio stesso con un angolo di diffrazione inversamente proporzionale al loro diametro. L'intensità della luce rifratta viene misurata attraverso un detector (www.beckmancoulter.com). Il Coulter Nanosizer misura particelle solide o

goccioline con un diametro medio nell'ordine dei nanometri definendo il così detto particle size, e inoltre consente di valutare l'omogeneità del campione (indice di polidispersione: PI) definendo il così detto "particle size distribution". Una dispersione può essere considerata omogenea o monodispersa quando il valore di PI è minore o uguale a 0,4.

Da un punto di vista pratico, le dispersioni sono state analizzate trasferendo in cuvetta una goccia del campione (circa 20 µl) e diluendo fino ad opportuna concentrazione stabilita dallo strumento con acqua bidistillata filtrata con filtri a membrana (pori di 0,45 µm) ed agitato al vortex per qualche secondo. Tutte le analisi sono state condotte in triplicato e i risultati ottenuti sono espressi in termini di diametro medio \pm deviazione standard (DS) e di PI \pm DS.

2.5.2 Test di stabilità

I campioni **SLN BX**, **SLN G 1%** e **SLN G 1,5%** sono stati sottoposti a test di stabilità fisica durante un periodo definito (1 mese). Una prima analisi dimensionale delle sospensioni è stata eseguita il giorno della preparazione, così come descritto nel paragrafo 2.5.1, mentre altre analisi sono state effettuate dopo 30 giorni, utilizzando una piccola aliquota di campione conservata in frigo ad una temperatura di 4°C. Si possono così evidenziare eventuali cambiamenti di diametro e PI indice del grado di stabilità della nanodispersione in funzione del tempo e della temperatura.

2.5.3 Determinazione del contenuto di GEN nelle dispersioni

Questa analisi è stata effettuata al fine di determinare la quantità di farmaco effettivamente presente nelle formulazioni (**SLN G 1%** e **SLN G 1,5%**) rispetto a quella teorica. Da un punto di vista pratico le analisi sono state eseguite prelevando un volume esatto di formulazione (50 µl) e sottoponendolo a estrazione con un opportuno volume di metanolo (950 µl). La sospensione ottenuta è stata sottoposta ad agitazione con vortex per 30' e centrifugata per 10' a 13000 rpm. Dopo filtrazione su membrane di PTFE da 0,2 µm i campioni sono stati analizzati mediante HPLC. La concentrazione di GEN è stata determinata confrontando i risultati ottenuti con quelli di soluzioni standard di GEN in metanolo comprese tra 0,5 e 20 mg/l, utilizzate per la costruzione della retta

di taratura $y = 290551x - 21665,9$ ($R^2 = 0.9996$). I campioni sono stati preparati in triplicato e per ciascuna formulazione l'analisi è stata eseguita due volte.

2.5.4 Analisi HPLC

Le analisi mediante HPLC sono state svolte seguendo la metodica riportata da De Zampieri et al. [31]. È stata utilizzata una colonna Supelco Ascentist™ C₁₈, 100 mm × 4.6 mm e una miscela eluente costituita da acetonitrile e una soluzione acquosa di acido acetico 25mM (350 μl/250ml) 48:52 (v/v). Il flusso è stato impostato a una velocità di 1,200 ml/min. Tali condizioni hanno portato all'individuazione del picco caratteristico della Genisteina a una lunghezza d'onda pari a 260 nm con un tempo di ritenzione di circa 2,5 minuti.

2.6 Test di dissoluzione *in vitro*

Gli studi di rilascio *in vitro* sono stati eseguiti sulla formulazione **SLN G1,5%** (con maggiore contenuto di GEN), in fluido intestinale simulato (FIS) a pH 6,8 (FU XII ed.), composto da 1 l di soluzione salina contenente 10 g di pancreatina, utilizzando un apparato per dissoluzione a paletta (Erweka, Heusenstamm, Germania). La velocità di rotazione e la temperatura del bagno sono state impostate rispettivamente a 50 giri al minuto e 37°C. Il test è stato eseguito al fine di valutare la capacità di rilascio della GEN da parte delle SLN e l'effetto degli enzimi intestinali sulla formulazione. Un volume esatto di dispersione di SLN contenente 0,6 mg di GEN è stato trasferito in un recipiente contenente 100 ml di mezzo di dissoluzione e la velocità di rilascio del farmaco è stata determinata prelevando 1 ml di campione a intervalli di tempo definiti (30 minuti, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ore). Dopo ogni prelievo, il fluido è stato ripristinato con 1 ml di FIS fresco, per mantenere le condizioni sink. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 13000 rpm, filtrati con filtri in PTFE con pori da 20 μm e analizzati mediante HPLC con il metodo descritto precedentemente. Ogni analisi è stata effettuata in triplicato e come controllo è stata utilizzata una dispersione di GEN in FIS con avente la stessa concentrazione di farmaco delle SLN.

2.7 Test di permeazione *in vitro*

I test di permeazione *in vitro* sono stati condotti sulla formulazione **SLN G1,5%** per determinare la quantità di farmaco in grado di attraversare una membrana sintetica, simulante la mucosa intestinale, utilizzando due differenti sistemi. Inizialmente è stato impiegato un sistema a flusso continuo, ideato nel nostro laboratorio, costituito da 3 celle e termostatato a 37°C [32]. In ciascuna cella, costituita da un comparto donatore e un comparto accettore, è stata applicata una membrana di cellulosa rigenerata avente pori di diametro pari a 0,45 µm (RC55, Whatman, Dassel, Germania) e sulla quale è stato distribuito omogeneamente 1 ml di formulazione. Dal liquido accettore, costituito da 50 ml di fluido intestinale simulato (FIS) a pH 6,8 (FU XII ed.), sono stati prelevati, a intervalli di tempo prestabiliti (30 minuti, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ore), volumi pari ad 1 ml, ripristinando di volta in volta la quantità prelevata con un uguale volume di FIS termostatato, al fine di garantire le condizioni sink. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 13000 rpm, filtrati e in seguito analizzati mediante HPLC con il metodo descritto precedentemente. Per determinare i residui di farmaco trattenuti nelle membrane, queste ultime sono state poste in 20 ml metanolo e tenute in agitazione per 5 minuti al fine di solubilizzare la GEN residua. Le sospensioni ottenute sono state analizzate tramite HPLC previa centrifugazione e filtrazione. Dai risultati ottenuti è emersa una non idoneità del sistema per lo scopo del test, pertanto è stato utilizzato un secondo apparato, rappresentato da un dissolutore multiplo, riadattato per la permeazione (figura 3). La formulazione è stata posta all'interno di un basket, nel quale era stata precedentemente posta la membrana, successivamente aggirato all'asta rotante del dissolutore. Il basket è stato immerso in 50 ml di FIS, termostatato a 37°C, e lasciato in agitazione con una velocità di 50 rpm. Sono stati effettuati prelievi di 1 ml dopo 3 e 6 ore e i campioni ottenuti, dopo centrifugazione per 10 minuti a 13000 rpm, sono stati analizzati tramite HPLC. Anche in questo caso sono stati determinati i residui di GEN presenti nelle membrane con la metodica sopra riportata. Il test è stato effettuato impiegando due membrane differenti, di cellulosa rigenerata e in nylon, aventi entrambe pori di diametro pari a 0,45 µm, per valutare l'influenza del materiale sulla percentuale di GEN permeata.

In entrambe le prove, i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di una dispersione di GEN in FIS con concentrazione paragonabile a quella delle SLN.

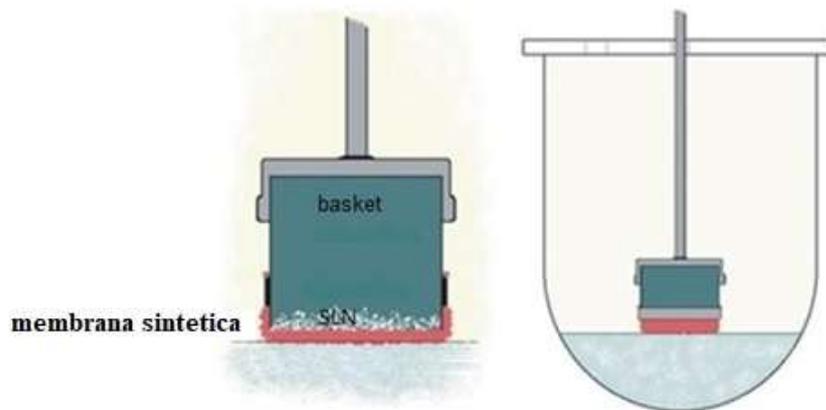


Figura 3. Dissolutore multiplo usato per la permeazione.

2.8 Studi *in vitro* riguardanti la formazione di chilomicroni

I chilomicroni sono lipoproteine costituita da un core lipidico (formato da trigliceridi e colesterolo esterificato), circondato da fosfolipidi, colesterolo e molecole proteiche. Questa sorta di mantello, grazie all'idrosolubilità conferita dalle proteine, aumenta il grado di solubilità del chilomicrone nel mezzo acquoso.

È stata valutata *in vitro* la formazione di strutture micellari di questo tipo studiando le interazioni tra le SLN, rappresentanti i trigliceridi, e gli altri componenti lipidici quali fosfolipide e colesterolo. A 20 ml di tampone fosfato salino (PBS) pH 6,8 sono stati aggiunti 500 µl di SLN bianche (**SLN BX**) e lecitina di soia (fosfolipide) a differenti concentrazioni. Inizialmente è stata valutata una concentrazione di lecitina (p/v) pari a quella del lipide in dispersione, in seguito tale concentrazione è stata raddoppiata.

È stata effettuata un'ulteriore prova nella quale è stato aggiunto il colesterolo in concentrazione uguale a quella del C in dispersione, mantenendo la concentrazione di lecitina il doppio rispetto a quella del lipide.

Le dispersioni ottenute sono state sottoposte ad analisi dimensionale per valutare eventuali variazioni in termini di "particle size": infatti, l'interazione delle SLN con lecitina e colesterolo, potrebbero portare alla formazione di particelle di dimensioni più grandi indicative, seppur in modo generale, della possibile formazione di strutture simil-chilomicroni.

2.9 Test di permeazione *ex-vivo*

Al fine valutare la captazione delle SLN da parte degli enterociti e l'eventuale formazione di chilomicroni, sono state effettuate delle permeazioni *ex-vivo* su porzioni tissutali intestinali duodenali di suino.

In una prima parte del lavoro è stato eseguito uno studio per individuare le condizioni ottimali per il trattamento dell'intestino, valutando attraverso la microscopia ottica la morfologia del tessuto intestinale sottoposto a differenti temperature (ambiente e 37°C) e tempi di conservazione (da 0 a 6h) (tabella 6).

Temperatura		Tempi					
Ambiente	T0	T 1h	T 2h	T 3h	T 4h	T 5h	T 6h
37°C	T0	T 1h	T 2h	T 3h	T 4h	T 5h	T 6h

Tabella 6. Condizioni valutate per la conservazione dell'intestino.

Le porzioni di intestino tenue sono state prelevate da suini regolarmente macellati, nell'arco di 30 minuti dalla soppressione e sono state trasportate in laboratorio in una soluzione di tampone fosfato pH 6,8 (PBS) a 4°C. La mucosa intestinale è stata esposta effettuando un'incisione longitudinale lungo il margine mesenterico e la sierosa è stata asportata attraverso una modica trazione [33, 34]. Il duodeno è stato quindi frazionato in sezioni di circa 1 cm, immediatamente fissate in formalina tamponata al 4% (tempo zero T0), o poste all'interno dei pozzetti di piastre per colture cellulari (Becton Dickinson Labware, France) contenenti PBS. La prima piastra è stata lasciata a temperatura ambiente, la seconda è stata incubata in stufa con temperatura fissa di 37°C. A tempi prestabiliti (T 1 h, T 2h, T 3h, T 4h, T 5h e T 6h) le varie sezioni di intestino sono state prelevate dai pozzetti, fissate in formalina tamponata al 4% e sottoposte a processazione istologica. In particolare, i campioni sono stati disidratati a concentrazioni crescenti di alcoli, inclusi in paraffina, e sezionati, mediante l'utilizzo del microtomo, a 3µm di spessore. Le sezioni sono state poi colorate con ematossilina e eosina (E&E). La valutazione istopatologica delle sezioni intestinali è stata effettuata al microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i) considerando le differenti alterazioni cellulari

attraverso un sistema di grading composito basato su una scala crescente con 4 gradi: +1: nessuna alterazione; +2 grado lieve; +3 grado medio; +4 grado elevato.

A seguito delle valutazioni istologiche e individuate le condizioni ottimali di conservazione dell'intestino, è stata effettuata la permeazione *ex-vivo*. Questo esperimento è stato condotto utilizzando le SLN bianche scelte come leader (**SLN BX**) marcate con fluoresceina, in modo da permetterne una migliore identificazione. L'intestino è stato prelevato come descritto in precedenza, sono state ottenute delle sezioni di circa 5 cm ed è stato trattato con le SLN marcate con fluoresceina (**SLN BXF**), e con una soluzione di fluoresceina di confronto (stessa concentrazione di fluoresceina delle SLN). Inoltre come controllo è stata utilizzata una mucosa intestinale non trattata. La formulazione **SLN BXF** è stata preparata come descritto nel paragrafo 2.3.1 (utilizzando però la sonicazione come tecnica di omogeneizzazione), aggiungendo una soluzione di fluoresceina (10 mg di fluoresceina in 3 ml di acetone) al lipide fuso, prima della formazione delle pre-emulsione O/A. La soluzione di confronto è stata preparata solubilizzando la fluoresceina in acetone e aggiungendola ad una soluzione acquosa di Tween 80 a 85°C. Le sezioni di intestino sono state poste sopra i pozzetti delle piastre contenenti PBS, come mostrato nella figura 4, e la mucosa interna è stata trattata con i vari campioni (200 µl). Nella figura 5 è mostrato il posizionamento dei vari campioni sopra le piastre.

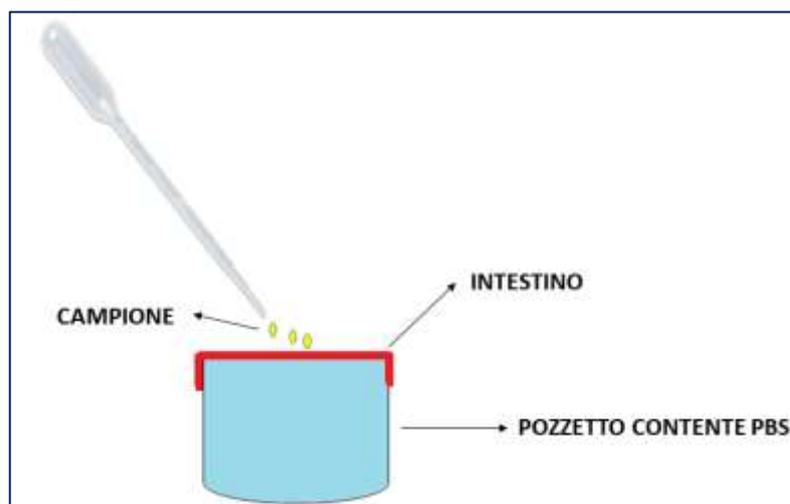


Figura 4. Posizionamento delle sezioni di intestino nei pozzetti per effettuare la permeazione *ex-vivo*.

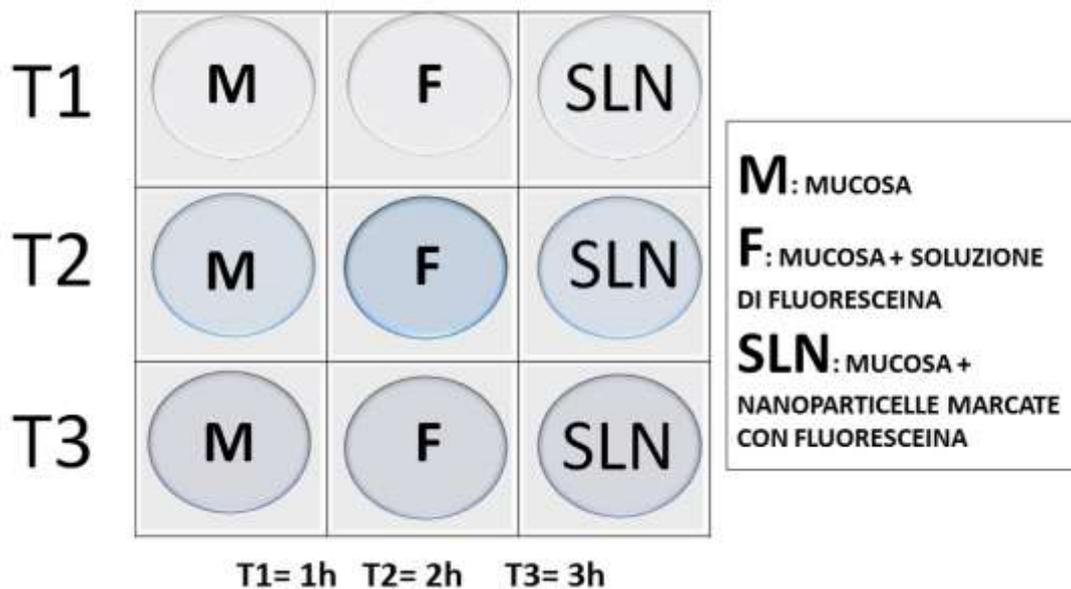


Figura 5. Posizionamento dei campioni sulle piastre per la permeazione ex-vivo.

Immediatamente dopo il trattamento e dopo 1, 2 e 3 ore, le varie porzioni di intestino sono state lavate con PBS, fissate con formalina tamponata al 4% e sottoposte ad analisi istologica e a valutazione attraverso microscopia confocale. Per quest'ultima metodica, sono state ottenute sezioni seriali di 4 μm di spessore, montate su vetrini portaoggetti caricati positivamente (Superfrost, Fisher Scientific), deparafinate e i nuclei controcolorati con Hoechst 33342 (1:1000). Le sezioni sono state quindi valutate al microscopio confocale Leica TCS SP5.

2.10 Analisi statistica

Le differenze statistiche sono state determinate applicando l'analisi ANOVA one-way con un opportuno metodo di "multiple comparison" impiegando il software Graph Pad Prism 6.02 (Graph Pad software Incorporated). Le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

3 Risultati e discussioni

3.1 Studi formulativi

3.1.1 Preparazione della formulazione di riferimento

Per la preparazione della formulazione di riferimento è stato scelto “l’hot homogenization process”. Tale metodo ha portato all’ottenimento del campione **SLN B** con “particle size” di $350 \pm 3,11$ nm e PI di $0,4 \pm 0,03$ utilizzato come riferimento per eseguire i successivi studi formulativi, i quali sono stati condotti variando i seguenti parametri: concentrazione di Tween 80, concentrazione di C, natura dell’emulsione allestita e tempi di sonicazione. Nei paragrafi seguenti sono discusse le variazioni apportate e gli effetti sulle SLN ottenute.

3.1.2 Studi sulla variazione della concentrazione di Tween 80

Le dispersioni ottenute sono state sottoposte ad analisi dimensionale al fine di valutare l’influenza della variazione della concentrazione di Tween 80 sul diametro medio e sull’indice di polidispersione delle SLN.

La figura 6 mostra come, la riduzione della concentrazione di Tween 80 allo 0,3% (p/v) porta a un incremento significativo ($P < 0,05$) delle dimensioni rispetto alle formulazioni con concentrazioni di surfactante maggiori. Effetto che si osserva sia per i campioni che hanno subito un raffreddamento a temperatura ambiente, sia per quelli che sono stati lasciati ricristallizzare in ghiaccio. In termini di PI, invece, è stato osservato un andamento differente (figura 7). Un aumento della concentrazione di Tween 80 da 0,3% a 0,75% e 1% (p/v) causa un incremento dei valori di PI ($P < 0,05$), mentre tra la formulazione **SLN B0,3%** e il campione **SLN B** (contenente 0,5% di Tween 80) non si hanno differenze statisticamente significative ($P > 0,05$). Questo comportamento è stato osservato solo nei campioni raffreddati a temperatura ambiente, mentre le formulazioni raffreddate in ghiaccio non mostrano differenze in termini di omogeneità ($P > 0,05$) indipendentemente dalla quantità di surfactante utilizzato.

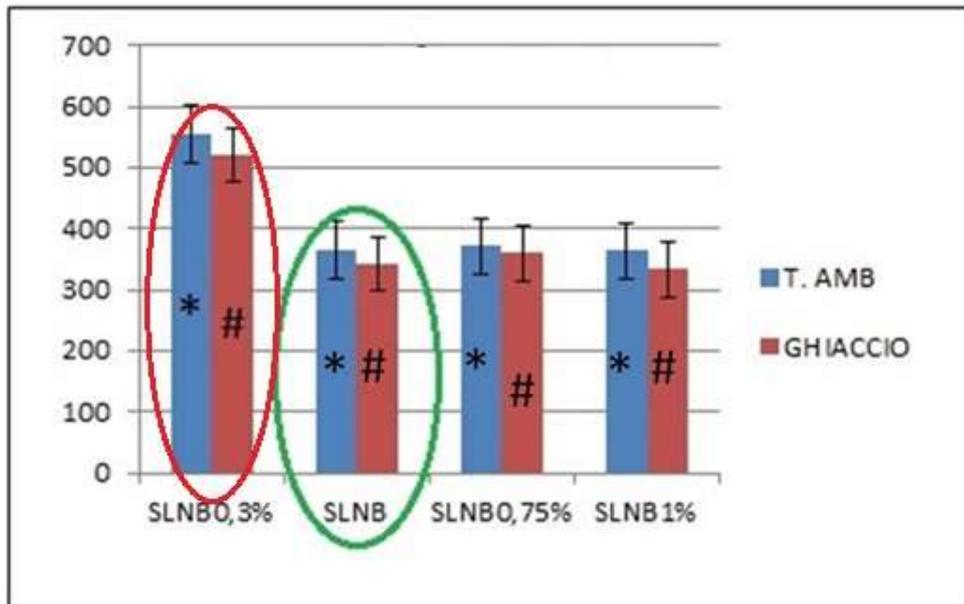


Figura 6. Effetto della variazione della concentrazione di Tween 80 sulle dimensioni. $P < 0,05$: * SLN B0,3% T.amb vs SLN B T.amb , SLN B0,75% T.amb e SLN B1% T.amb; # SLN B0,3% ghiaccio vs SLN B ghiaccio , SLN B0,75% ghiaccio e SLN B1% ghiaccio.

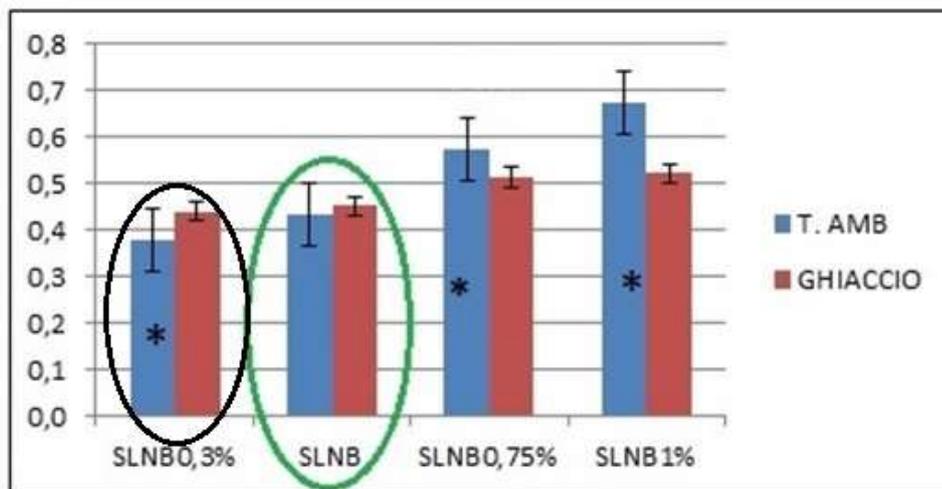


Figura 7. Effetto della variazione della concentrazione di Tween 80 sui valori di PI. $P < 0,05$: * SLN B0,3% T.amb vs SLN B 0,75% T.amb e SLN B1% T.amb.

Sulla base di questi primi risultati Le formulazioni **SLN B** e **SLN B0,3%**, sono state scelte come leader per effettuare ulteriori variazioni dei parametri formulativi. In particolare il campione **SLN B**, costituito da particelle piccole (350 nm) e dimensionalmente omogenee presenta delle caratteristiche tecnologiche ideali per un

trasporto linfatico intestinale. La formulazione **SLN B0,3%**, anche se con dimensioni maggiori (>500 nm), è caratterizzata da particelle omogenee e da una più bassa concentrazione di surfactante. Il Tween 80 è tossico per le cellule in modo concentrazione-dipendente, pertanto sarebbe meglio utilizzare la minima concentrazione necessaria per l'ottenimento di emulsioni omogenee.

3.1.3 Tipologia di emulsione allestita

Le formulazioni **SLN B** e **SLN B0,3%** sono state preparate mediante una emulsione O/A. Una variazione introdotta nei parametri formulativi è stata la modifica del tipo di emulsione utilizzata per preparare le SLN; sono stati così ottenuti i campioni **SLN BA/O** e **SLN B0,3%A/O**. Questi ultimi sono stati analizzati in termini di “particle size” e PI e i risultati ottenuti sono riportati nei grafici seguenti (figura 8).

Confrontando le due formulazioni **SLN B0,3%** e **SLN B0,3%A/O**, si può osservare come modificando l'emulsione da O/A ad A/O si ha una riduzione significativa delle dimensioni, sia effettuando il raffreddamento a temperatura ambiente che in ghiaccio ($P < 0,05$), mentre nel caso dei campioni contenenti Tween 80 allo 0,5% (p/v) (**SLN B** e **SLN BA/O**) non vi sono differenze dimensionali ($P > 0,05$). Per ciò che concerne i valori di PI, la modifica introdotta non porta a variazioni tra i campioni ottenuti con l'emulsione O/A e i corrispettivi preparati con l'emulsione A/O. La figura 8 mostra inoltre come risultato significativa la riduzione del PI nel caso della formulazione **SLN B0,3%A/O** rispetto alla **SLN BA/O** ($P < 0,05$), riconfermando, come già evidenziato nel paragrafo 3.1.2, che la riduzione della concentrazione di surfactante porta all'ottenimento di SLN maggiormente omogenee, indipendentemente dalla tipologia di emulsione utilizzata.

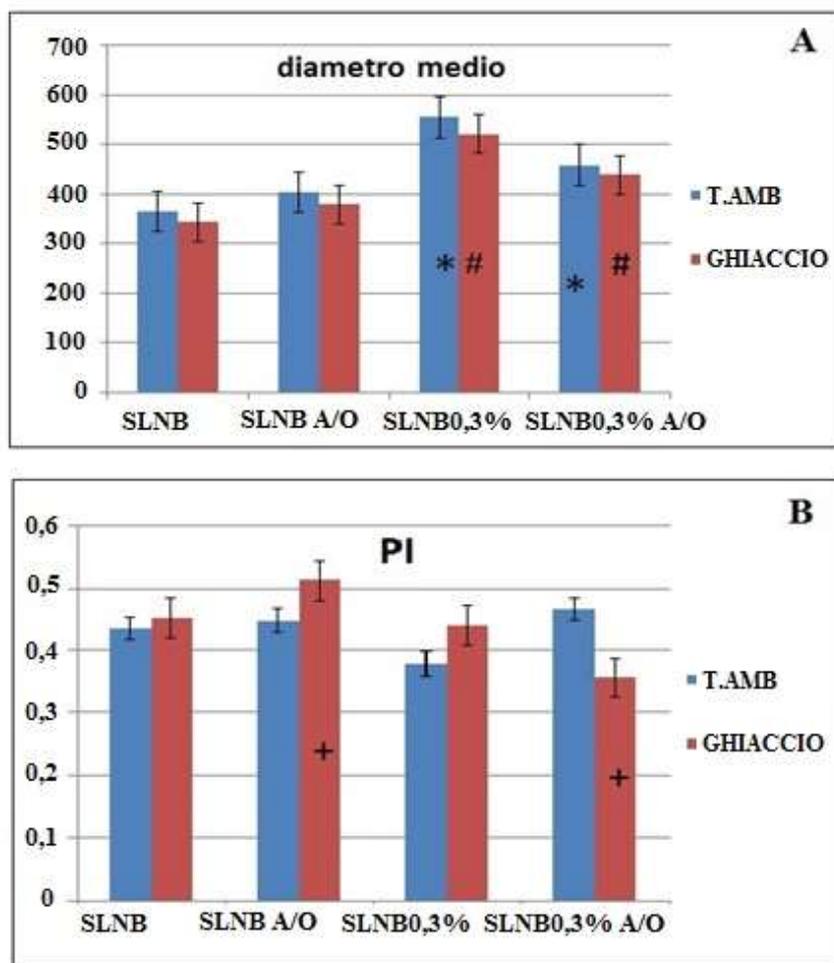


Figura 8. Effetto della tipologia di emulsione sul particle size (A) e sul PI (B). P<0,05: * SLN B0,3% T.amb vs SLN B0,3%A/O T.amb; # SLN B0,3% ghiaccio vs SLN B0,3%A/O ghiaccio; + SLN BA/O ghiaccio vs SLN B0,3%A/O ghiaccio.

3.1.4 Processo di omogeneizzazione: confronto tra Ultra-Turrax e sonda a ultrasuoni

Al fine di migliorare i parametri tecnologici, le formulazioni **SLN B**, **SLN B0,3%**, **SLN BA/O** e **SLN B0,3%A/O** sono state sottoposte a omogeneizzazione mediante l'utilizzo di una sonda a ultrasuoni. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli dei campioni omogeneizzati con l'Ultra-Turrax.

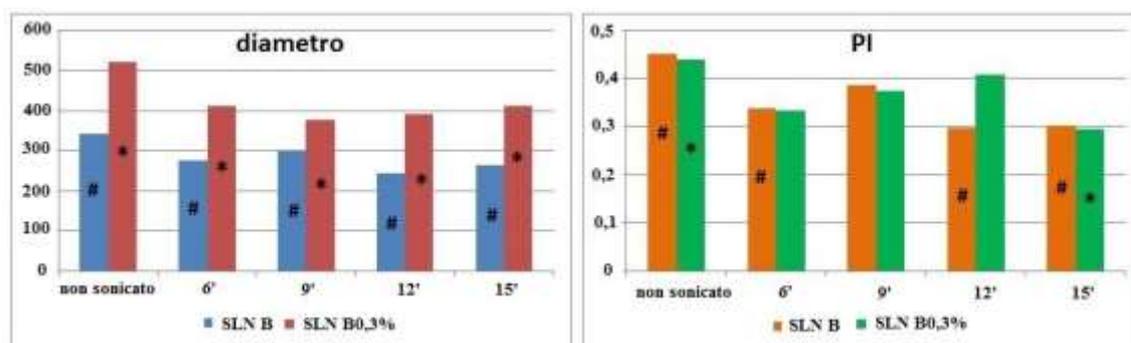


Figura 9. Confronto Ultra-Turrax e differenti tempi di sonicazione: effetto sulle dimensioni e sui valori di PI delle formulazioni SLN B e SLN B0,3%. Diametro, $P<0,05$: # SLN B non sonicato vs SLN B sonicato per 6, 9, 12 e 15 min; * SLN B0,3% non sonicato vs SLN B0,3% sonicato per 6, 9, 12 e 15 min. PI, $P<0,05$: # SLN B non sonicato vs SLN B sonicato per 6, 12 e 15 min; * SLN B0,3% non sonicato vs SLN B0,3% sonicato per 15 min.

Dalla figura 9 si può osservare come, per i due campioni ottenuti con l'emulsione O/A, l'utilizzo della sonda a ultrasuoni, per tutti i tempi testati, permette una riduzione delle dimensioni rispetto alle corrispondenti formulazioni che hanno subito omogeneizzazione con l'Ultra-Turrax ($P<0,05$). La sonda ad ultrasuoni ha avuto degli effetti anche sull'omogeneità delle due dispersioni. Per il campione SLN B già dopo 6 minuti di sonicazione è stato possibile ottenere particelle più omogenee, raggiungendo il valore di PI più basso (0,297) dopo 12 minuti; mentre per la formulazione SLN B0,3% sono stati necessari 15 minuti per avere un sistema più omogeneo di quello non sonicato, passando da un valore di PI di 0,440 a 0,296.

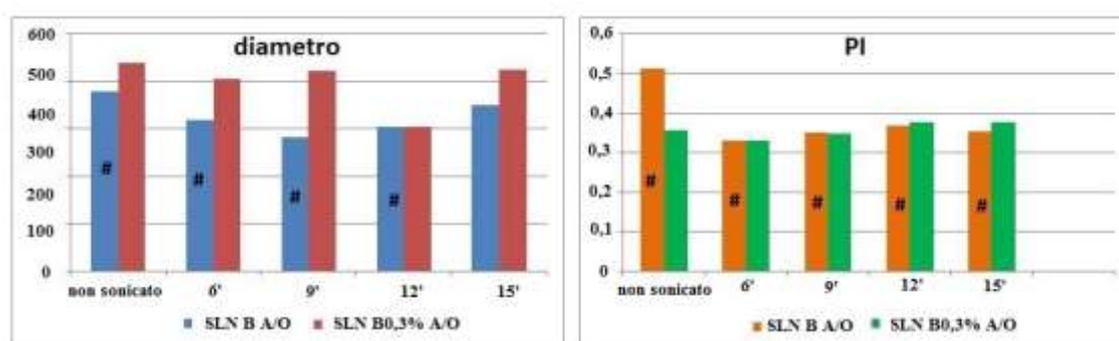


Figura 10. Confronto Ultra-Turrax e differenti tempi di sonicazione: effetto sulle dimensioni e sui valori di PI delle formulazioni SLN BA/O e SLN B0,3%A/O. Diametro, $P<0,05$: # SLN BA/O non sonicato vs SLN BA/O sonicato per 6, 9, e 12

min; PI, P<0,05: # SLN BA/O non sonicato vs SLN BA/O sonicato per 6, 12 e 15 min.

Diverso è invece l'effetto che la sonicazione ha avuto sui campioni preparati con l'emulsione A/O (figura 10). In particolare nel caso della formulazione **SLN BA/O** le dimensioni si riducono, al di sotto di 379,5 nm, dopo 6, 9 e 12 minuti ($P < 0,05$), mentre a 15 minuti non si ha differenza statisticamente significativa tra il campione sonicato e quello non sonicato ($P > 0,05$), indicando una possibile riaggregazione delle SLN; per tutti i tempi testati sono state invece ottenute dispersioni maggiormente omogenee rispetto a quella di riferimento ($P < 0,05$). Per il campione **SLN B0,3%A/O**, l'uso della sonda a ultrasuoni non porta a nessuna variazione dimensionale rispetto al campione omogeneizzato con l'Ultra-turrax ($P > 0,05$), risultato ottenuto anche in termini di PI.

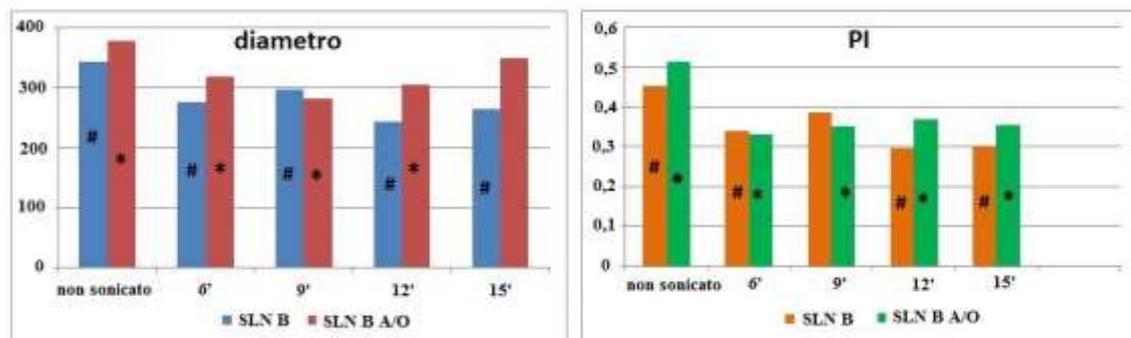


Figura 11. Confronto Ultra-Turrax e differenti tempi di sonicazione: effetto sulle dimensioni e sui valori di PI delle formulazioni SLN B e SLN BA/O. Diametro, P<0,05: # SLN B non sonicato vs SLN B sonicato per 6, 9, 12 e 15 min; * SLN BA/O non sonicato vs SLN BA/O sonicato per 6, 9, e 12 min. PI, P<0,05: # SLN B non sonicato vs SLN B sonicato per 6, 12 e 15 min; * SLN BA/O non sonicato vs SLN BA/O sonicato per 6, 9, 12 e 15 min.

La figura 11 mostra come per le due formulazioni aventi concentrazione di Tween 80 0,5% (**SLN B** e **SLN BA/O**) l'utilizzo della sonda porta a una riduzione delle dimensioni, indipendentemente dal tipo di emulsione utilizzata. L'unica eccezione è rappresentata dalla formulazione **SLN BA/O** a 15 minuti di sonicazione, avente un diametro di 349,8 nm, che non mostra differenze significative ($P > 0,05$) rispetto al campione ottenuto con l'Ultra-turrax (379,3 nm). I valori di PI dopo sonicazione, a prescindere dalla natura dell'emulsione, si riducono significativamente ($P < 0,05$), tranne

che per **SLN B** dopo 9 minuti ($P < 0,05$), mantenendosi comunque sempre al di sotto di 0,4.

Al contrario la tipologia di emulsione utilizzata, influenza i valori di diametro e di PI delle due formulazioni aventi concentrazioni di surfactante 0,3% (p/v), in seguito a sonicazione. I risultati ottenuti sono riportati nei grafici seguenti.

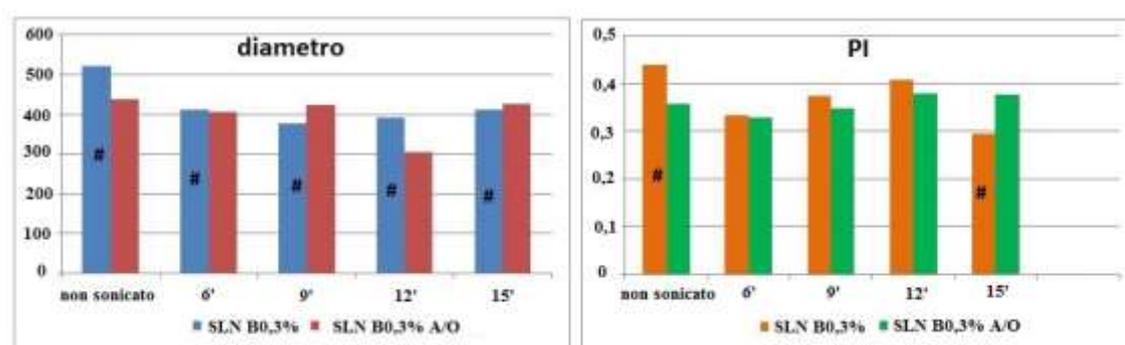


Figura 12. Confronto Ultra-Turrax e differenti tempi di sonicazione: effetto sulle dimensioni e sui valori di PI delle formulazioni SLN B0,3% e SLN B0,3%A/O. Diametro, $P < 0,05$: # SLN B0,3% non sonicato vs SLN B0,3% sonicato per 6, 9, 12 e 15 min; PI, $P < 0,05$: # SLN B0,3%A/O non sonicato vs SLN B0,3%A/O sonicato per 15 min.

La formulazione **SLN B0,3%** mostra per tutti i tempi testati dimensioni dell'ordine di 400 nm, sempre inferiori ($P < 0,05$) rispetto al campione non sonicato avente diametro di 521 nm; mentre per avere un campione maggiormente omogeneo è necessaria una sonicazione di 15 minuti. Per **SLN B0,3%A/O** l'utilizzo della sonda non porta a variazioni dimensionali significative ($P > 0,05$), risultato ottenuto anche in termini di PI.

3.1.5 Variazione della concentrazione di Compritol 888 ATO

L'ultima modifica effettuata durante gli studi formulativi ha riguardato il dimezzamento della concentrazione di lipide in dispersione.

La riduzione della quantità di C utilizzata non ha portato a differenze dimensionali significative rispetto ai campioni nei quali è stata utilizzata una concentrazione di lipide 2% (p/v) ($P > 0,05$), inoltre i risultati ottenuti confermano ancora una volta che la riduzione della concentrazione di surfactante porta ad un aumento dei valori di diametro medio. Per quanto riguarda il PI solamente nel caso del campione contenente lo 0,3% (p/v) di Tween 80 il dimezzamento della quantità di lipide causa un incremento dei

valori ($P < 0,05$); nel campione allo 0,5% non si hanno variazioni dell'omogeneità delle nanoparticelle ($P > 0,05$).

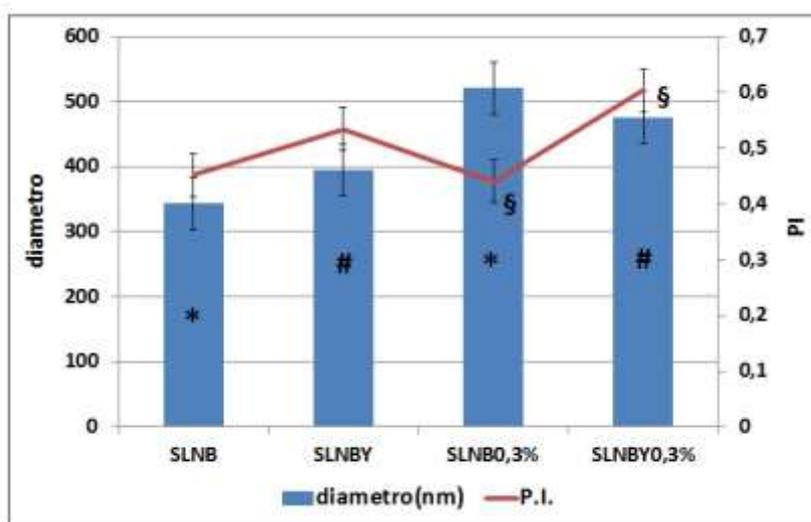


Figura 13. Effetto della concentrazione di compritol sull'analisi dimensionale delle formulazioni. Diametro, $P < 0,05$: *SLN B vs SLN B0,3%; #SLN BY vs SLN BY0,3%; PI, §SLN B0,3% vs SLN BY0,3%.

3.2 Preparazione delle SLN di GEN

I risultati degli studi formulativi illustrati nei paragrafi precedenti hanno permesso di individuare i parametri formulativi ideali per la preparazione di SLN da caricare con la GEN. I campioni carichi sono stati preparati utilizzando "l'hot homogenization process" con i seguenti parametri di lavoro:

- Concentrazione di Tween 80: 0,5% (p/v). Tra le varie concentrazioni testate, i campioni ottenuti con una quantità di surfactante pari a 0,5% (p/v) si sono dimostrati essere quelli con valori di diametro medio e PI migliori per lo scopo di questo lavoro. Infatti, la formulazione contenente Tween 80 allo 0,3% (p/v), benché maggiormente omogenea rispetto alla precedente e caratterizzata da una minore concentrazione di surfactante, ha mostrato sempre proprietà dimensionali non idonee, cioè valori di diametro sempre maggiori di 400 nm.
- Concentrazione di compritol: 2% (p/v). La riduzione della quantità di lipide in dispersione non ha portato a un miglioramento delle caratteristiche tecnologiche della dispersione, pertanto non è stata modificata.

- Tipologia dell'emulsione utilizzata: O/A. Per la formulazione con lo 0,5% di surfactante l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative, in termini di diametro e omogeneità, in seguito alla modifica dell'emulsione preparata. Pertanto è stata scelta l'emulsione O/A poiché più vantaggiosa da un punto di vista tecnologico. Consente, infatti, di ottenere le SLN in modo più semplice e rapido.
- Raffreddamento: cristallizzazione in ghiaccio. Considerazioni simili a quelle effettuate per la tipologia di emulsione possono essere fatte per il processo di raffreddamento. Considerando che nel caso della formulazione scelta, le proprietà dimensionali non sono influenzate significativamente dal tipo di raffreddamento, la cristallizzazione in ghiaccio è preferibile in quanto consente di ottenere una dispersione acquosa di SLN in modo più rapido rispetto a un raffreddamento effettuato a temperatura ambiente.

3.2.1 Capacità di caricamento del farmaco nelle SLN

La capacità massima di caricamento della GEN nelle SLN è stata valutata testando differenti concentrazioni di farmaco (1, 1,5, 2 e 3% (p/p)). Dai risultati è emerso che le formulazioni riescono a caricare una quantità di GEN pari all'1- 1,5% (p/p); infatti, nei campioni contenenti il 2% e il 3% (p/p) di farmaco si osserva la formazione di un precipitato giallo rappresentato dalla GEN in eccesso (figura 14 A e B). Infatti la GEN, essendo scarsamente solubile in acqua, quando non incorporata nelle SLN dà luogo a fenomeni di precipitazione.



Figura 14. Formulazioni caricate con la GEN: A) campioni contenenti GEN 1% e 1,5% (p/p); B: formulazioni con GEN 2% e 3% (p/p).

Tale risultato è stato comprovato tramite analisi HPLC del precipitato; nel cromatogramma ottenuto è evidente il picco della GEN pura (figura 15).

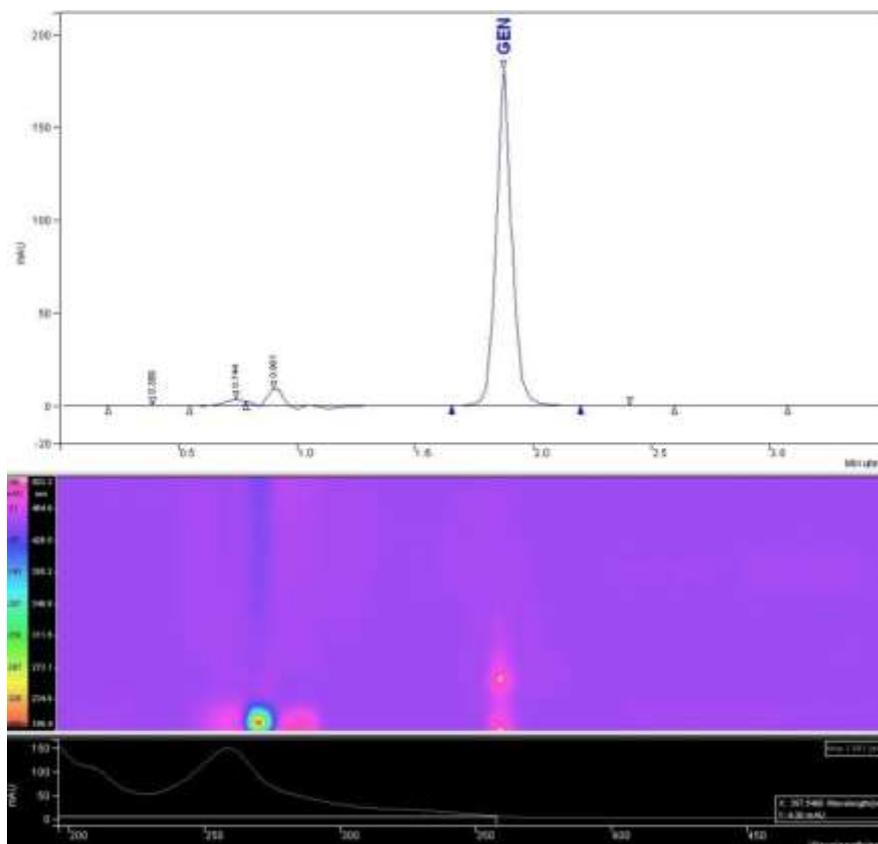


Figura 15. Cromatogramma del precipitato ottenuto durante il processo di caricamento delle SLN con concentrazione di GEN 2% e 3% (p/p).

Sulla base di questi risultati, le due formulazioni contenenti 1% e 1,5% (p/p) di GEN (SLN G1% e SLN G1,5%) sono state selezionate per gli ulteriori studi riportati di seguito.

3.3 Caratterizzazione chimico-fisica delle formulazioni

3.3.1 Analisi dimensionale

Le formulazioni cariche sono state sottoposte ad analisi dimensionale e i risultati ottenuti sono stati comparati con quelli del corrispettivo campione bianco.

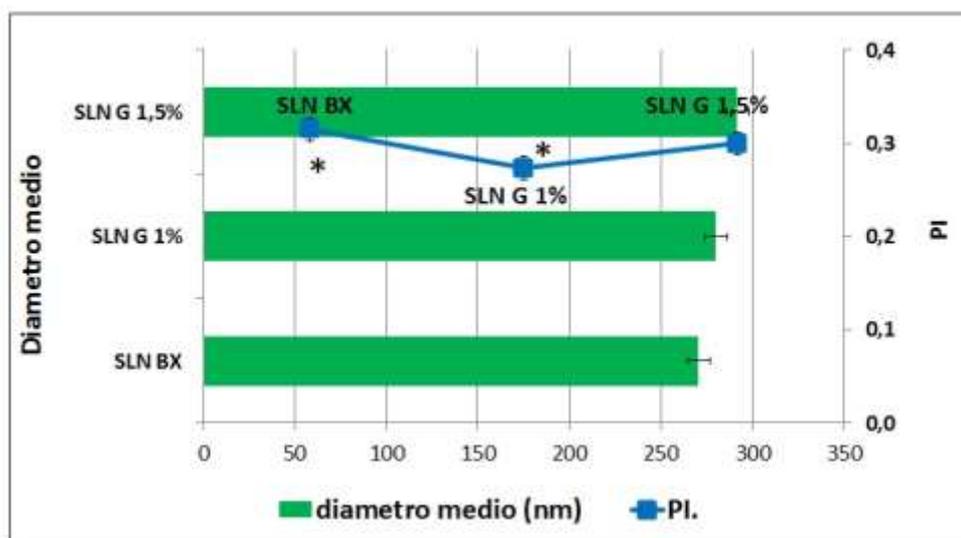


Figura 16. Confronto in termini di diametro e PI tra SLN bianche e cariche. $P < 0,05$: *SLN BX vs SLN G1% e SLN G1,5%.

La figura 16 mostra come il processo di caricamento del farmaco non modifichi i valori di “particle size” delle SLN ($P > 0,05$), indipendentemente dalla quantità di farmaco caricata; infatti le particelle mostrano un diametro medio dell’ordine di 300 nm. Al contrario, l’introduzione nel sistema di una concentrazione di farmaco pari all’1% (p/p) rende le particelle più omogenee poiché il valore di PI passa da 0,31 a 0,27 ($P < 0,05$), risultato non ottenuto nel caso di caricamento con una quantità superiore di GEN ($P > 0,05$).

3.3.2 Test di stabilità

Le formulazioni **SLN BX**, **SLN G 1%**, **SLN G 1,5%** sono state sottoposte ad un test di stabilità per un periodo di tempo predefinito di 30 giorni. I risultati ottenuti sono riportati nella figura 17. Le formulazioni **SLN BX** e **SLN G 1,5%** subiscono un incremento dei valori di diametro nell’arco dei 30 giorni ($P < 0,05$), rimanendo però omogenee ($P > 0,05$). Il campione **SLN G 1%** presenta un andamento opposto, i valori di PI aumentano in maniera significativa ($P < 0,05$), mentre in termini dimensionali le SLN si mantengono stabili ($P > 0,05$) nel periodo di tempo considerato. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che al tempo zero la formulazione **SLN G 1%** è costituita da un’unica popolazione con diametro medio dell’ordine di 280 nm, mentre dopo 30 giorni si ha la comparsa di popolazioni di SLN più piccole. Come conseguenza di ciò, non si ha una

variazione in termini di diametro medio, ma una riduzione dell'omogeneità dovuta alla presenza di più popolazioni.

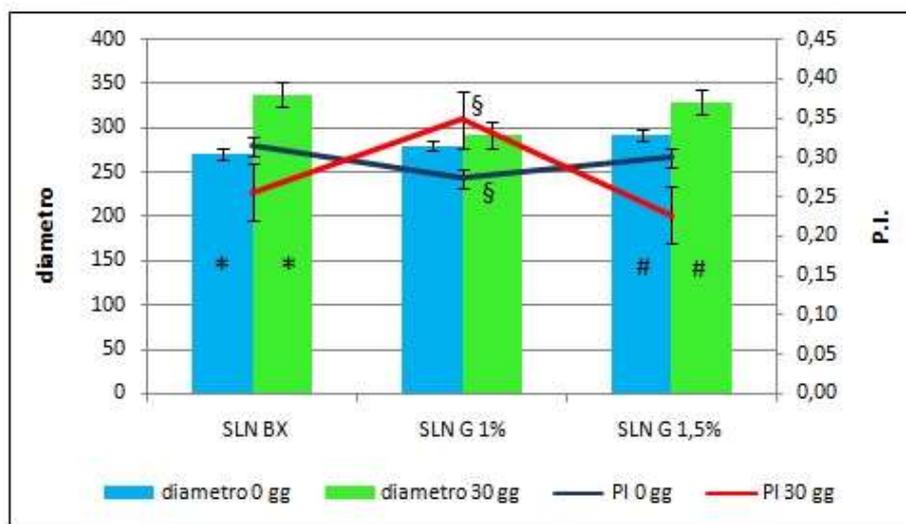


Figura 17. Stabilità delle formulazioni bianche e cariche nell'arco di tempo selezionato (30 giorni). $P < 0,05$: * SLN BX 0 gg vs SLN BX 30gg; # SLN G1,5% 0 gg vs SLN G1,5% 30 gg; § SLN G1% 0 gg vs SLN G1% 30 gg.

3.3.3 Determinazione del contenuto di GEN

Mediante analisi HPLC è stato possibile determinare la quantità di GEN presente nella dispersione di SLN rispetto a quella teorica. L'analisi è stata effettuata solo sulle formulazioni SLN G 1% e SLN G 1,5% poiché capaci di incorporare la GEN caricata. Nella tabella seguente sono riportati i risultati ottenuti, i quali mostrano come, indipendentemente dalla quantità caricata, circa il 100% di farmaco è stato ritrovato nelle formulazioni.

Formulazione	GEN teorica (mg)	GEN nella dispersione di SLN (mg)	Gen nella dispersione di SLN (%)
SLN G 1%	6,9	6,3	100
SLN G 1,5%	9,26	9,4	97

Tabella 7. Quantità di GEN ritrovata nelle dispersioni di SLN mediante analisi HPLC.

3.4 Test di dissoluzione *in vitro*

Il test di dissoluzione *in vitro* è stato effettuato sulla formulazione **SLN G1,5%** (con maggiore quantità di GEN); i profili di rilascio delle SLN cariche e di una dispersione di GEN in FIS con la stessa quantità di farmaco, usata come confronto, sono riportati in figura 18.

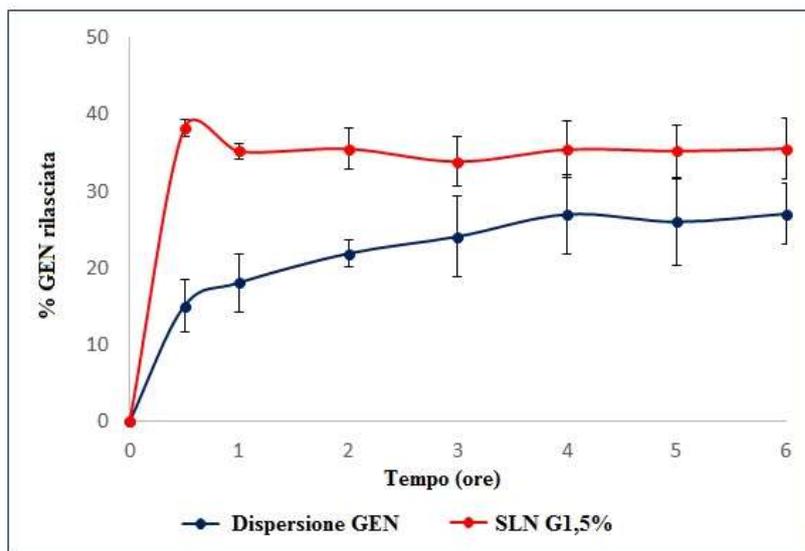


Figura 18. Profilo di rilascio *in vitro* della GEN.

La formulazione ha mostrato un rilascio di farmaco superiore (circa 40%) entro i primi 30 min, rispetto alla dispersione di confronto (10%). Successivamente il rilascio di GEN è rimasto costante nel tempo. La ragione dell'immediato rilascio di GEN da parte delle SLN potrebbe essere ricercata nella presenza di farmaco libero sulla superficie delle particelle, il resto della GEN è invece probabilmente incorporato all'interno della matrice lipidica. Questo comportamento è indice di una buona stabilità delle SLN di C nel mezzo di rilascio. Inoltre è interessante osservare che, per tutti i tempi analizzati, la quantità di GEN rilasciata dalla formulazione è superiore rispetto a quella della dispersione di GEN, pertanto le SLN hanno portato ad un aumento di solubilità del farmaco nel mezzo intestinale.

3.5 Studi di permeazione *in vitro*

Il test di permeazione è stato eseguito al fine di valutare la quantità di GEN capace di attraversare una membrana sintetica simulante la mucosa intestinale. Durante tale test

sono state effettuate due prove differenti per individuare il sistema migliore per l'ottenimento dello scopo prefissato.

Nella prima prova è stato utilizzato un sistema a celle messo a punto nel nostro laboratorio, però i risultati ottenuti hanno dimostrato come tale apparato non sia idoneo per il test, infatti, dalle analisi eseguite sia sul liquido accettore sia sulle membrane è stato possibile recuperare solamente il 50% della GEN presente nella formulazione. Questo è probabilmente dovuto a delle interazioni del farmaco con i materiali dei differenti elementi del sistema.

La seconda prova è stata eseguita con un dissolvente multiplo. I risultati ottenuti sono riportati nei grafici seguenti.

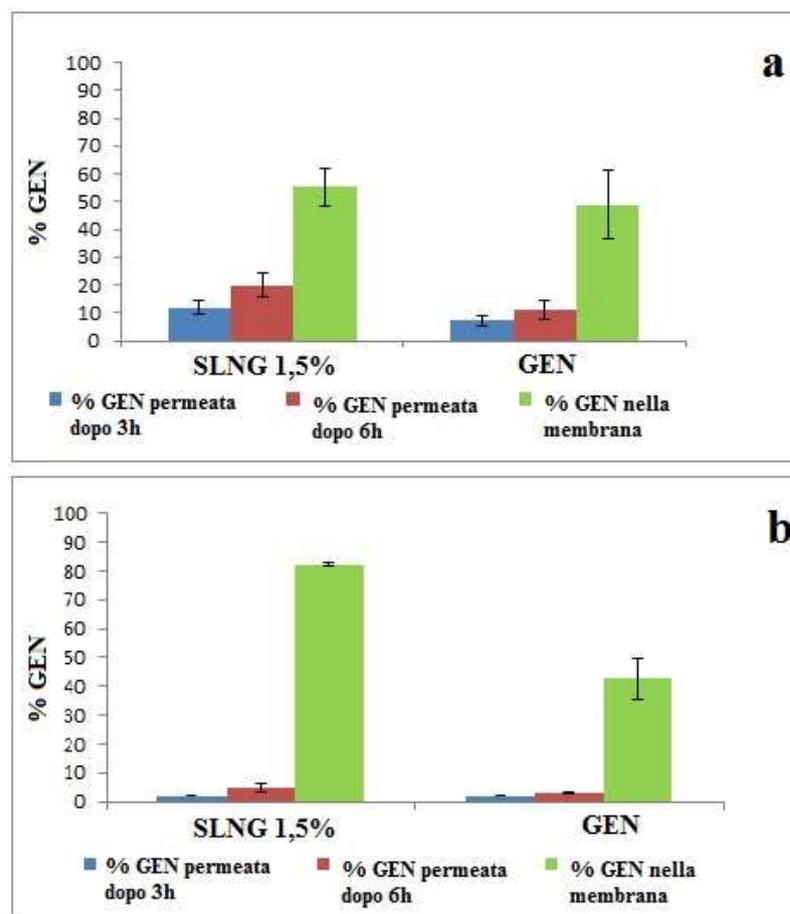


Figura 19. Risultati ottenuti dalla permeazione effettuata utilizzando membrane di cellulosa rigenerata (a) e di nylon (b).

Si può osservare come, nel caso della membrana di cellulosa rigenerata la percentuale di GEN ritrovata nel liquido accettore dopo 6 h di permeazione, è superiore rispetto a quella ritrovata con la membrana di nylon, indicando quindi una maggiore permeazione del farmaco. In particolare, confrontando la formulazione con la dispersione di GEN pura, i risultati mostrano come, utilizzando la membrana di cellulosa, la quantità di farmaco permeata dal campione, sia superiore del 10%, in entrambi i tempi testati, rispetto alla quantità permeata dalla dispersione di GEN, pertanto la formulazione **SLN G1,5%** mostra una migliore capacità di permeazione rispetto alla GEN pura. La membrana di nylon ha un comportamento differente, infatti, oltre a non permettere la permeazione della GEN, circa un 85% di farmaco è estratto dalla membrana dopo analisi del campione, rispetto a un 45% ritrovato dopo analisi della GEN pura. Questo può essere spiegato con una maggiore interazione delle SLN con la membrana stessa. I risultati ottenuti da tale test possono essere considerati preliminari, poiché i sistemi hanno mostrato delle interazioni con la GEN, inoltre la quantità di farmaco permeata si è rivelata essere molto bassa, pertanto successivi studi devono essere effettuati.

3.6 Studi *in vitro* riguardanti la formazione di chilomicroni

La formazione dei chilomicroni *in vitro* è stata studiata attraverso prove preliminari, al fine di valutare le interazioni tra le SLN, la lecitina, che rappresentano rispettivamente i trigliceridi e la componente fosfolipidica dei chilomicroni, e il colesterolo. Tali interazioni portano alla formazione di micelle che possono essere rilevate attraverso un incremento dimensionale delle SLN. Dai risultati ottenuti si può osservare come l'aggiunta di lecitina in concentrazione paragonabile a quella del C porta a un lieve aumento dimensionale, mentre in una seconda prova nella quale è stata raddoppiata la quantità di fosfolipide, le dimensioni aumentano maggiormente. L'analisi dimensionale ha, infatti, messo in evidenza come il diametro medio delle SLN (280 nm) aumenti a 390 nm aggiungendo il fosfolipide in concentrazione uguale al C, mentre il raddoppiamento della lecitina porta a valori di particle size di 500 nm. Combinando l'aggiunta di lecitina, in concentrazione doppia, e di colesterolo, in concentrazione uguale a quella del C1, il diametro medio è di 389 nm.



Figura 20. Probabile formazione di una struttura simi-chilomicronica.

Per valutare l'effettiva formazione di strutture micellari di questo tipo i sistemi saranno sottoposti ad analisi morfologiche mediante microscopia a trasmissione elettronica (TEM).

Si è pensato di mimare questa interazione tra SLN e componenti lipidiche dei chilomicroni in quanto, come spiegato nell'introduzione di questo lavoro, i nostri sistemi dovrebbero subire il fisiologico processo di assorbimento dei lipidi. Pertanto una volta all'interno degli enterociti, l'interazione con fosfolipidi e colesterolo darà luogo ai chilomicroni, i quali saranno immessi nel circolo linfatico.

3.7 Test di permeazione ex-vivo

Durante la prima parte dell'esperimento è stata valutata la morfologia del tessuto intestinale sottoposto a differenti temperature (ambiente e 37°C) e tempi di conservazione (da 0 a 6h)

- T0: la valutazione microscopica al T0 delle varie sezioni esaminate è caratterizzata dalla diffusa espansione della lamina propria e dal sollevamento dell'epitelio intestinale da un grave infiltrato infiammatorio costituito prevalentemente da linfociti e plasmacellule e da più rari macrofagi e granulociti eosinofili. Nel complesso i villi appaiono appiattiti, talora con fusione degli apici e delimitate da cellule epiteliali aumentate di volume, raramente con aumento di linfociti intraepiteliali (figura 21).

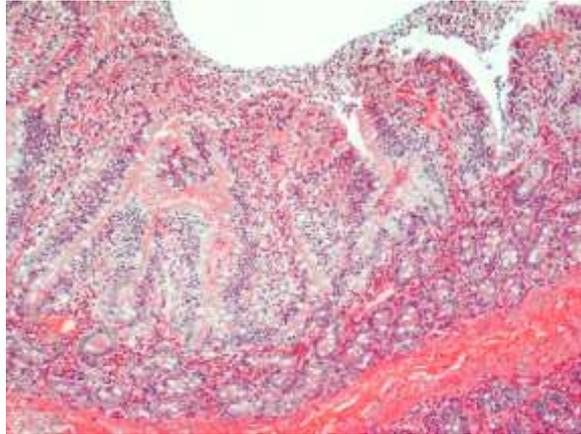


Figura 21: Intestino T0: Grave, diffusa enterite linfoplasmocellulare cronica con fusione degli apici dei villi e moderata atrofia. Ematossilina Eosina; 10x.

Il riscontro di un grave infiltrato infiammatorio, associato alla alterazione dei villi, è certamente un aspetto di interesse considerando la verosimile alterazione della capacità di assorbimento degli stessi, e il conseguente ridotto uptake delle SLN

- Conservazione a temperatura ambiente: l'analisi istologica effettuata sui campioni intestinali conservati a temperatura ambiente è caratterizzata da una morfologia tissutale e cellulare sovrapponibile a T0 sino a T 3h. A partire da T 4h si osserva una progressiva degenerazione cellulare caratterizzata dalla presenza di vacuoli intra-citoplasmatici debolmente eosinofili e di dimensioni variabili, multifocali rotture della membrana plasmatica e frammentazione della cromatina. Inoltre, la lamina propria, oltre al descritto infiltrato infiammatorio, è caratterizzata da diffuso edema e dalla presenza di numerosi globuli rossi extravasati (figura 22 A, B, C).

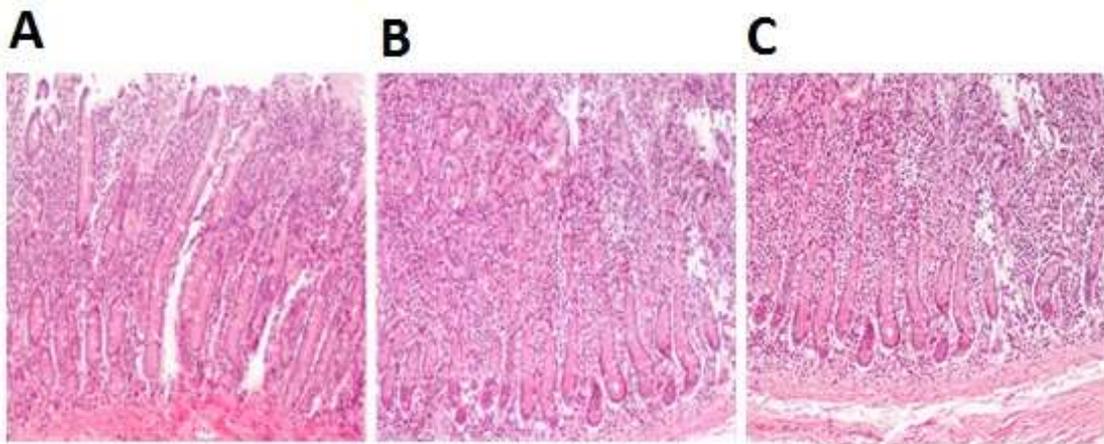


Figura 22. Valutazione istologica dell'intestino conservato a temperatura ambiente effettuata a: tempo zero (A), 2 (B) e 3 (C) ore. Ematossilina Eosina; 10x.

- Conservazione a 37 °C: a differenza di quanto osservato nei campioni conservati a temperatura ambiente, i campioni conservati a 37°C sono caratterizzati istologicamente da diffuse alterazione morfologiche a partire dal T 2 h, indicando una minore stabilità dell'intestino a temperature superiori rispetto a quella ambiente (figura 23 A, B, C).

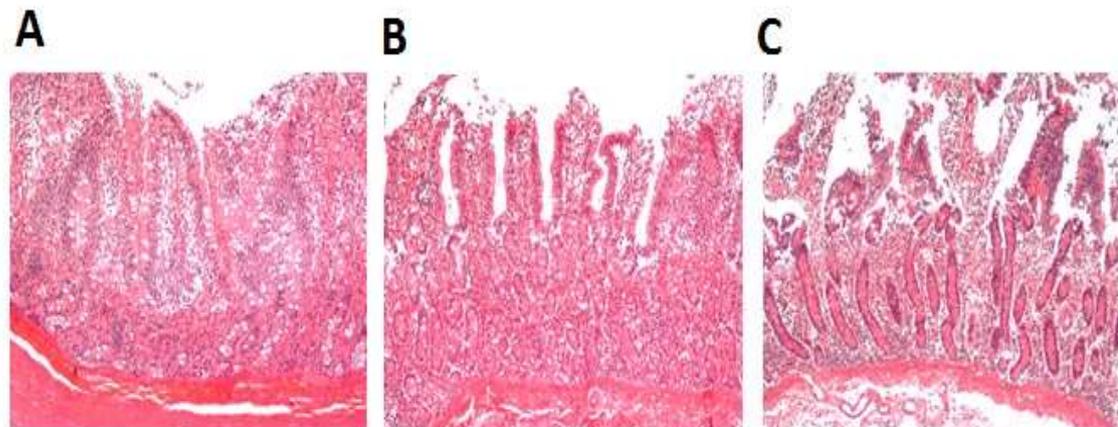


Figura 23. Valutazione istologica dell'intestino conservato a 37°C effettuata a: tempo zero (A), 2 (B) e 3 (C) ore. Ematossilina Eosina: 10x.

Sulla base di questi risultati è quindi fondamentale prendere in considerazione il fatto che, dopo il prelievo, è possibile mantenere una buona morfologia cellulare intestinale per circa 3 h conservandolo a temperatura ambiente e in PBS.

In generale, quando si eseguono dei test *ex-vivo*, l'aspetto relativo alla conservazione e agli eventuali processi degenerativi viene considerato marginale. Tuttavia, le alterazioni della mucosa intestinale che si verificano nel corso del tempo, così come la presenza di una infiammazione da considerarsi come "background lesion" potrebbero inficiare la buona riuscita dei test, pertanto sarebbe opportuno eseguire delle analisi istologiche preliminari in grado di escludere eventuali "bias" intrinseci all'esperimento.

Il test di permeazione *ex-vivo* è stato effettuato su sezioni di intestino opportunamente conservate sulla base delle condizioni ottimali individuate nell'esperimento precedentemente. L'intestino è stato trattato con le SLN marcate con fluoresceina e con la soluzione di fluoresceina di confronto, inoltre è stata utilizzata una mucosa intestinale non trattata come confronto.

Anche in questo caso l'analisi istologica della mucosa intestinale non trattata al tempo zero ha messo in evidenza la presenza di un grave infiltrato infiammatorio.

Nei campioni analizzati al tempo zero (figura 24) si osserva una fluorescenza diffusa sia nella mucosa trattata con la soluzione di fluoresceina (figura 24 B) che in quella trattata con le SLN marcate (figura 24 C). Questo dato è verosimilmente attribuibile alla captazione da parete degli enterociti e/o delle cellule infiammatorie presenti nella lamina propria sia della fluoresceina libera che delle SLN marcate.

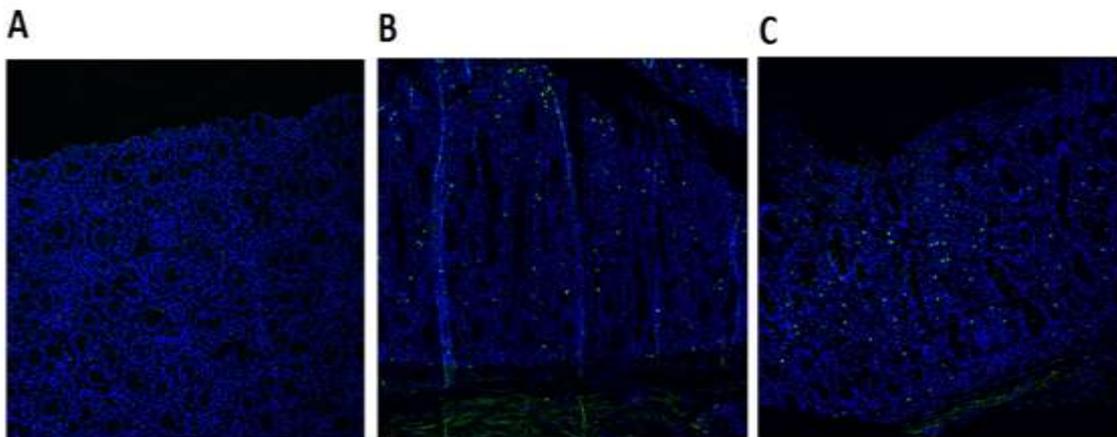


Figura 24. Valutazione della fluorescenza effettuata al tempo zero: (A) mucosa non trattata, (B) mucosa trattata con soluzione di fluoresceina di confronto, (C) mucosa trattata con SLN marcate. Fluoresceina (verde) / nuclei (blue di Hoechst 33342).

Nei campioni analizzati al tempo T 1 h (figura 25) si osservata fluorescenza sia nella mucosa non trattata di controllo che nei tessuti trattati con fluoresceina che con le SLN. Risultati simili sono stati ottenuti anche con l'analisi istologica effettuata al tempo T 2h e T 3h. In particolare, il riscontro di fenomeni di autofluorescenza nella mucosa non trattata potrebbe essere attribuibile all'elevato infiltrato infiammatorio costituito, oltre che da linfociti e plasmacellule, anche da cellule macrofagiche in grado di fagocitare detriti cellulari o prodotti di degradazione quali ad esempio le lipofuscine, che per la loro intrinseca natura, potrebbero emettere fluorescenza [35].

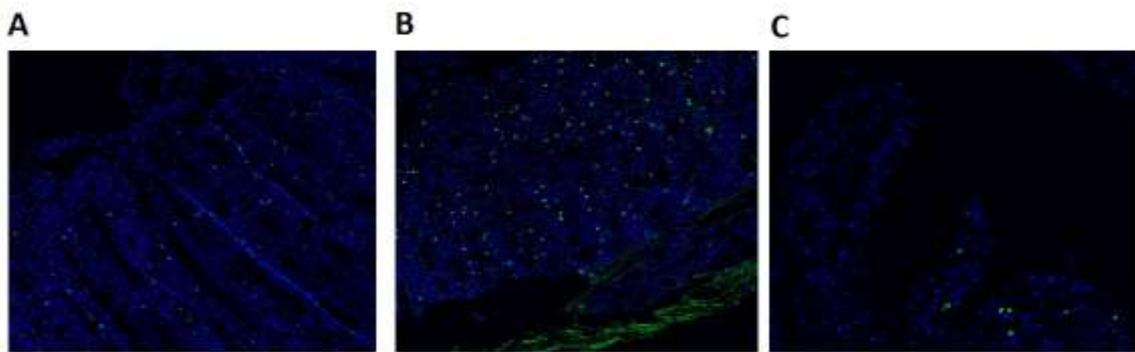


Figura 25. Valutazione della fluorescenza al tempo T 1h: (A) mucosa non trattata, (B) mucosa trattata con soluzione di fluoresceina di confronto, (C) mucosa trattata con SLN marcate. Fluoresceina (verde) / nuclei (blue di Hoechst 33342).

Questi risultati devono essere considerati preliminari in quanto hanno messo in evidenza alcune problematiche. La presenza di fluorescenza nei campioni trattati con la soluzione di confronto indica un “uptake” della fluoresceina libera da parte degli enterociti, pertanto è difficile stabilire se la fluorescenza riscontrata nei campioni trattati con le SLN sia dovuta effettivamente alle SLN marcate oppure alla frazione di fluoresceina libera rimasta nella dispersione di nanoparticelle. Infatti, è probabile che non tutta la fluoresceina utilizzata per marcare le particelle sia stata incorporata all'interno delle SLN e quindi una piccola frazione potrebbe essere in dispersione. Pertanto è necessario effettuare degli ulteriori esperimenti per meglio capire la natura della fluorescenza osservata.

4 Conclusioni e prospettive future

Questo lavoro è stato caratterizzato da studi formulativi aventi come scopo la definizione di parametri tecnologici atti all'ottenimento di SLN di C, destinate ad un target linfatico intestinale. In particolare da tali studi è emerso che l'utilizzo di una concentrazione di lipide al 2%, di surfactante (Tween 80) allo 0,5% e della sonda ad ultrasuoni permette di formulare SLN omogenee e con dimensioni comprese tra 250 e 300 nm, ideali per il raggiungimento del target stabilito. Le formulazioni preparate permettono di caricare una quantità massima di GEN pari all'1,5% (p/p) e hanno una buona capacità di "drug loading". Inoltre è stato osservato come le SLN consentano di aumentare la solubilità della GEN nel mezzo intestinale, indicando quindi un probabile incremento della biodisponibilità orale. La formazione di strutture micellari *in vitro* è stata studiata attraverso prove preliminari, valutando le interazioni tra le SLN e le componenti lipidiche dei chilomicroni in quanto, questi sistemi dovrebbero subire il fisiologico processo di assorbimento dei lipidi. I risultati ottenuti dell'analisi dimensionale confermano la comparsa di un'interazione che potrebbe indicare la formazione di strutture simil-chilomicroni. Per valutare l'effettiva formazione di sistemi micellari di questo tipo dovranno essere effettuati ulteriori studi quali analisi morfologiche mediante microscopia a trasmissione elettronica (TEM).

Il lavoro ha permesso anche d'individuare le condizioni ottimali per tenere in vita l'intestino per il maggior tempo possibile dopo il prelievo dal macello, al fine di effettuare al meglio il test di permeazione *ex-vivo*. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per meglio capire il processo di permeazione delle SLN nell'intestino.

In conclusione le SLN ottenute, aventi dimensioni idonee e capacità di veicolare la GEN, possono essere proposte come sistemi per veicolare molecole idrofobe nel sistema linfatico associato all'intestino.

5 Bibliografia

1. Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Del Review*. 2001; 50:3-20.

2. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001; 7:192-198.
3. Cho HY, e Lee YB. Nano-sized Drug Delivery Systems for Lymphatic Delivery. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014; 14:868-880.
4. Xie Y, Bagby TR, e Forrest ML. Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009; 6:785-792.
5. Zhang XY, e Lu WY. Recent avances in lymphatic targeted drug delivery system for tumor metastasis. *Cancer Biol Med.* 2014; 11:247-254.
6. Cai S, Yang Q, Bagby TR., et al. Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63:901-908.
7. Cohen MS, e Forrest ML. Lymphatic drug delivery: therapy, imaging and nanotechnology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63:865-866.
8. Hultin M, Olivercrona T. Conversion of chylomicrons into remnants. *Atherosclerosis.* 1998; 141:s25-s29.
9. Chaudhary S, Gang T, Murthy RSR, et al. Recent approaches of lipid-based delivery system for lymphatic targeting via oral route. *J Drug Target.* 2014; 22(10):871-882.
10. Singh I, Swami R, Khan W, et al. Lymphatic system: a prospective area for advanced targeting of particulate drug carriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11(2): 211-229.
11. Mehnert W, e Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 47:165-196.
12. Khan AA, Mudassir J, Mohtar N, et al. Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipidi-based nanoformulations. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:2733-2744.
13. Hu L, Tang X, e Cui F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2004; 56:1527-1535.
14. Porter CJH. e Charm WN. Intestinal lymphatic drug transport: an update. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50:61-80.
15. Aji Alex MR., Chacko AJ, Jose S, et al. Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 42:11-18.
16. Chalikwar SS, Belgamwar VS, Talele VR, et al. Formulation and evaluation of Nimodipine-loaded solid lipid nanoparticles delivered via lymphatic transport system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012; 97:109-116.

17. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, et al. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res.* 1997; 26:63-70.
18. Tang J, Xu N, Ji H, et al. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. *Int J Nanomed.* 2011; 6:2429-2435.
19. Sarkar FH, e Li Y. Mechanism of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastas Rev.* 2002; 21:265-280.
20. Banerjee S, Li Y, Wang Z, et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer letters.* 2008; 269:226-242.
21. Shehata EMM, Elnaggar YSR., Galal S, et al. Self-emulsifying phospholipid pre-concentrates (SEPPs) for improve oral delivery of the anti-cancer genistein: Development, appraisal and ex-vivo intestinal permeation. *Int J Pharm.* 2016; 511:745-756.
22. Motlekar N, Khan MA, e Youan BBC. Preparation and characterization of genistein containing poly (ethylene glycol) microparticles. *J Appl Polym Sci.* 2006; 101:2070-2078.
23. Kwon SH, Kim SY, Ha KW, et al. Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery. *Arch Pharm Res.* 2007; 30:1138-1143.
24. Crupi V, Ficarra R, Guardo M, et al. UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complex of genistein with β -cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44:110-117.
25. Marquez Andrade L, de Fatima Reis C, Maione-Silva L, et al. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014; 88:40-47.
26. Müller RH, Mäder K, e Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50(1):161-177.
27. Mehnert W, e Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 47(2):165-196.
28. Ghosh S, e Roy T. Nanoparticulate drug-delivery systems: lymphatic uptake and its gastrointestinal applications. *J App Pharm Sci.* 2014;.4(06):123-130.
29. Makwana V, Jain R, Patel K, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) of Efavirenz as lymph targeting drug delivery system: Elucidation of mechanism of uptake using chylomicron flow blocking approach. *Int J Pharm.* 2015; 495(1):439-446.
30. Vitorino C, Carvalho FA, Almeida AJ, et al. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 84:117-130.

31. De Zampieri ALTC, Ferreira FS, Resende EC, et al. Biodegradable polymeric nanocapsules based on poly (DL-lactide) for genistein topical delivery: obtention, characterization and skin permeation studies. *J Biomed Nanotech* 2013; 9(3):527-534.
32. Gavini E, Spada G, Rassu G, et al. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β -cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63(4):472-482.
33. Van de Kerkhof E, de Graaf I, Groothuis G. In vitro methods to study intestinal drug metabolism. *Curr Drug Metab.* 2007; 8(7):30-66.
34. Zheng Y, Zuo Z, Chow AHL. Lack of effect of β -cyclodextrin and its water-soluble derivatives on in vitro drug transport across rat intestinal epithelium. *Int J Pharm.* 2006; 309:123-128.
35. Di Guardo, G. Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *Eur J Histochem.* 2015; 59(1).

CAPITOLO V

Utilizzo di microsfere come “drug delivery systems”

Durante il dottorato di ricerca, in concomitanza con lo sviluppo del filone di ricerca principale, riguardante la preparazione di nanoparticelle, è stato effettuato anche uno studio della recente letteratura relativa all'impegno di sistemi microparticellari come "drug delivery systems".

Con il termine microparticelle si indicano in generale particelle di dimensioni comprese tra 1 e 800 μm . In base alla loro struttura si possono classificare in microcapsule e microsfele. **Microcapsule**: sono costituite da un nucleo centrale (contenente il farmaco, in forma liquida o solida) circondato da una membrana polimerica (parete) di rivestimento. **Microsfele**: hanno una struttura monolitica, sono cioè costituite da una matrice polimerica in cui il farmaco è omogeneamente disperso.

Allo stato attuale i sistemi microparticellari sono idonei o potenzialmente idonei alla somministrazione tramite diverse vie e sono ampiamente utilizzati come "drug delivery systems" in quanto offrono molti vantaggi: protezione del farmaco incapsulato dalla degradazione enzimatica, possibilità di controllare in maniera accurata il rilascio dei farmaci nel tempo (ore o mesi) e semplice somministrazione (se confrontati con altri sistemi parenterali per il rilascio controllato di farmaci come i micro-impianti).

Questo studio ha portato alla pubblicazione delle seguenti review:

- Biodegradable microspheres as intravitreal delivery systems for prolonged drug release. What is their eminence in the nanoparticles era? (Current drug delivery, 2918, 15.
- Hydroxypropil-B-cyclodextrin formulated in nasal chitosan microspheres as candidate therapeutic agent in Alzheimer's disease. (Current drug delivery, 2918, 15.

Gli argomenti trattati nelle due review sono stati brevemente discussi nelle pagine seguenti.

Microsfere biodegradabili come sistemi di somministrazione intravitreali per un rilascio prolungato di farmaci. La loro importanza “nell’era delle nanoparticelle”

Il bulbo oculare può essere anatomicamente suddiviso in segmento anteriore e posteriore. Numerose patologie possono colpire il segmento posteriore come la degenerazione maculare legata all’età, la retinopatia diabetica, retiniti virali e l’uveite posteriore [1]. Molte di queste, se non opportunamente trattate possono portare a cecità. Le terapie per queste patologie presentano numerose problematiche. Innanzitutto dovrebbero essere iniziate in uno stato precoce della malattia, inoltre la somministrazione di farmaci in questa sede anatomica viene ostacolata dalle caratteristiche fisiologiche e dalle barriere anatomiche. Di conseguenza si ha una ridotta biodisponibilità dei farmaci somministrati, con cronicizzazione della patologia. Perciò, per ottenere dei buoni risultati è necessario eseguire delle somministrazioni ripetute di farmaci.

Le formulazioni oculari tradizionali e la somministrazione topica, spesso non sono efficaci e la veicolazione dei farmaci nel segmento posteriore dell’occhio deve essere effettuata direttamente attraverso delle iniezioni intravitreali [2]. Un’iniezione intravitreale consiste nella somministrazione diretta di formulazioni contenenti farmaci, come soluzioni, sospensioni o impianti nel segmento posteriore, superando la barriera emato-oculare. Attualmente, la somministrazione intravitreale può essere considerata la via più efficiente per il raggiungimento del segmento posteriore in quanto consente di migliorare la biodisponibilità intraoculare superando le barriere anatomiche grazie all’iniezione diretta [3]. Tuttavia questa via di somministrazione presenta alcuni problemi: è una via molto invasiva, di conseguenza si ha una bassa compliance da parte del paziente e non è possibile una auto somministrazione. Inoltre c’è il problema legato alla clearance del vitreo. L’eliminazione dei farmaci dal vitreo è un processo che avviene in poche ore, pertanto sono spesso necessarie delle iniezioni ripetute, di conseguenza si possono verificare importanti effetti collaterali come emorragie, distacco della retina, formazione di cataratta e aumento della pressione intraoculare [4]. Per ridurre il numero di somministrazioni, al fine di migliorare la compliance dei pazienti e limitare gli effetti collaterali, sono necessari dei sistemi che consentano un

rilascio controllato/prolungato dei farmaci. Sono state sviluppate varie formulazioni capaci di rilasciare il farmaco per un periodo di tempo prolungato come microsfele, nanoparticelle e dendrimeri [5].

Tra le varie formulazioni proposte le microsfele hanno un ruolo importante. Per le iniezioni intravitreali vengono preparate delle sospensioni disperdendo le microsfele in un opportuno mezzo liquido iniettabile, in genere si usano delle soluzioni isotoniche di tampone fosfato a pH 7,4. Poiché le sospensioni sono iniettate direttamente nel corpo dell'occhio, devono essere utilizzati dei polimeri biodegradabili e biocompatibili. In questo modo, una volta all'interno dell'occhio le microsfele si degradano gradualmente durante il processo di rilascio del farmaco, e non sono necessarie ulteriori operazioni per eliminarle. Le microsfele possono essere utilizzate per veicolare sia farmaci idrofili che lipofili.

Tra i polimeri comunemente utilizzati per la preparazione di microsfele rientrano l'acido polilattico (PLA) e l'acido poli (lattico-co-glicolico) (PLGA) dei poliesteri biodegradabili. Il primo esempio di lavoro riguardante la preparazione di microsfele di PLGA e PLA è comparso in letteratura agli inizi degli anni '90 [6], a partire da questo periodo è stato pubblicato un numero crescente di "papers" relativi alla preparazione di questi sistemi polimerici. Molti di questi lavori sono accumulati dal fatto che suggeriscono le microsfele di PLA e PLGA per la somministrazione intravitreale dell'Aciclovir, un antivirale utilizzato per il trattamento della necrosi retinica acuta [7, 8]. Queste microsfele polimeriche sono state proposte anche per le iniezioni intravitreali di altre sostanze come i corticosteroidi, utilizzati per molte infiammazioni oculari, anticorpi monoclonali, farmaci antiangiogenici e il fattore neurotrofico derivato dalla linea delle cellule gliali, utilizzato nel caso di danno neuronale con morte delle cellule gangliari della retina.

Recentemente sono stati proposti anche dei sistemi "ibridi". Ad esempio una formulazione costituita da nanoparticelle caricate all'interno di microsfele è stata preparata per ottenere un sistema intravitreale capace di rilasciare il Bevacizumab per un periodo di tempo prolungato [9]. Osswald et al. hanno invece preparato delle microsfele di PLGA veicolanti Ranibizumab sospese all'interno di un idrogel [10].

Altri polimeri biodegradabili usati per la preparazione di microsfere per iniezioni intravitreali sono il chitosano, il polidrossibutirrato, il poli (estere ammidico) e il silicone poroso.

Gli studi riportati in questa review hanno mostrato che le microsfere possono aumentare l'emivita intravitreale e quindi la biodisponibilità di molti farmaci proteggendoli dalla degradazione. Quindi in quella che viene definita "l'era delle nanoparticelle", le microsfere hanno ancora un ruolo chiave tra i sistemi destinati a somministrazione intravitreale per rilascio prolungato di farmaci.

Bibliografia

1. Lens A, Nemeth SC, e Ledford JK. Ocular anatomy and physiology. Slack Incorporated. 2008.
2. Kaur IP, e Kakkar S. Nanotherapy for posterior eye diseases. *J Control Release*. 2014; 193:100-112.
3. Sarao V, Veritti D, Boscia F, et al. Intravitreal steroids for the treatment of retinal diseases. *Sci World J*. 2014; 14:1-14.
4. Falavarjani KG, Nguyen QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye*. 2013; 27(7):787-798.
5. Patel A, Cholkar K, Agrahari V, et al. Ocular drug delivery systems: an overview. *World J Pharm*. 2013; 2(2):47.
6. Khoobehi B, Stradtman MO, Peyman GA, et al. Clearance of sodium fluorescein incorporated into microspheres from the vitreous after intravitreal injection. *Ophthalmic Surg*. 1991; 22(3):175-180.
7. Conti B, Bucolo C, Giannavola C, et al. Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: in vitro/in vivo evaluation. *Eur J Pharm Sci*. 1997; 5(5):287-293.
8. Martinez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, e Negro S. Poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives. *J microencapsul*. 2003; 20(6):799-810.
9. Yandrapu SK, Upadhyay AK, Petrash JM, et al. Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab. *Mol Pharm*. 2013; 10(12):4676-4686.

10. Osswald CR, e Kang-Mieler JJ. Controlled and extended in vitro release of bioactive anti-vascular endothelial growth factors from a microsphere-hydrogel drug delivery system. *Curr Eye Res.* 2016; 41(9).1216-1222.

Microsfere di chitosano per somministrazione nasale contenenti idrossipropil β -ciclodestine come agente terapeutico per l'Alzheimer

L'idrossipropil β -ciclodestina (HP-CD) è un derivato delle β -ciclodestrine, degli oligosaccaridi ciclici capaci di formare dei complessi di inclusione con molti farmaci e biomolecole. L'HP-CD è classificata come eccipiente, viene infatti utilizzata per aumentare la solubilità in acqua delle sostanze. Tuttavia, in Europa e negli Stati Uniti è stata designata come farmaco orfano in quanto viene utilizzata in pazienti affetti dalla malattia di Niemann-Pick di tipo C, una patologia neurologica caratterizzata da un eccessivo accumulo di colesterolo all'interno delle cellule nervose, con conseguente neurodegenerazione [1].

L'HP-CD riduce i livelli di colesterolo totale, probabilmente attraverso dei meccanismi di estrazione e redistribuzione dalle membrane cellulari verso i compartimenti cellulari [2]. In molti studi è stato riportato che elevati livelli di colesterolo inducono l'accumulo della proteina beta-amiloide, una sostanza coinvolta nello sviluppo della malattia di Alzheimer, in sistemi cellulari e in molti modelli animali. L'HP-CD, riducendo i livelli di colesterolo e quindi la produzione di beta amiloide può essere utile nel trattamento dell'Alzheimer.

Tuttavia, questo derivato delle ciclodestrine non è assorbito nell'intestino umano dopo somministrazione orale e mostra una scarsa capacità di attraversamento della barriera ematoencefalica, quindi viene somministrata ai pazienti per via parenterale oppure direttamente all'interno dell'encefalo attraverso delle iniezioni intratecali o intracerebroventricolari [3].

La somministrazione nasale è un metodo non invasivo che permette ai farmaci di raggiungere l'encefalo superando la barriera ematoencefalica, attraverso l'epitelio olfattorio, l'unico punto del sistema nervoso centrale in contatto diretto con l'ambiente esterno [4].

Le microsfere hanno proprietà che le rendono idonee per una somministrazione nasale, pertanto sono state proposte come sistemi per un trasporto diretto naso-encefalo dell'HP-CD. I polimeri mucoadesivi più utilizzati per la preparazione delle microsfere sono il chitosano e l'alginato [5]. La mucoadesione è fondamentale in quanto aumenta il

tempo di persistenza nella cavità nasale riducendo la clearance muco-ciliare delle formulazioni. È stato dimostrato che dopo somministrazione nasale di microsfele in modelli animali della malattia di Alzheimer, l'HP-CD ha svolto un'azione protettiva nei confronti della tossicità causata dalla proteina beta-amiloide [6].

In questo lavoro è stato messo in evidenza che l'HP-CD può essere considerata un possibile candidato per la prevenzione e il trattamento dell'Alzheimer. Infatti, microsfele di HP-CD somministrate per via nasale hanno una potenziale azione neuroprotettiva.

Bibliografia

1. Coisne C, Tilloy S, Monflier E, et al. Cyclodextrins as emerging therapeutic tools in the treatment of cholesterol-associated vascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2016; 21(12):1748.
2. Di Paolo G, e Kim TW. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12(5):284.
3. A Ottinger E, L Kao M, Carrillo-Carrasco N, et al. Collaborative development of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for the treatment of Niemann-Pick type C1 disease. *Curr Top in Med Chem*. 2014; 14(3):330-339.
4. Illum L. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. *J Control Release*. 2003, 87(1-3):187-198.
5. Gavini E, Rassa G, Haukvik T, et al. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of cyclodextrins. *J Drug Target*. 2009; 17(2):168-179.
6. Yalcin A, Soddu E, Bayrakdar ET, et al. Neuroprotective Effects of Engineered Polymeric Nasal Microspheres Containing Hydroxypropyl- β -cyclodextrin on β -Amyloid (1-42)-Induced Toxicity. *J Pharm Sci*. 2016, 105(8):2372-2380.

Conclusioni generali

Nella mia tesi di dottorato è stato confermato l'elevato potenziale delle nanoparticelle come sistemi per la diagnosi e il trattamento dei tumori.

Il cancro è una tra le patologie più diffuse e una delle principali cause di morte a livello mondiale. La ricerca ha fatto grandi passi avanti nella diagnosi e nella cura delle neoplasie, la strada è però ancora lunga e non per tutti i tumori sono state trovate delle cure che ne consentano la totale eradicazione e delle strategie di diagnosi che permettano di individuare precocemente le cellule tumorali presenti nell'organismo umano. Le nanoparticelle, grazie a particolari caratteristiche si sono rivelate essere dei promettenti sistemi per il raggiungimento di questi obiettivi.

L'importanza che le nanoparticelle hanno nel trattamento e nella diagnosi delle metastasi linfatiche è stata ampiamente confermata.

Le nanoparticelle polimeriche preparate durante il dottorato hanno mostrato azione antitumorale e si sono rivelate capaci di trasportare all'interno delle cellule cancerogene molecole, come il Verde Indocianina, utilizzate per la diagnosi dei tumori.

Gli altri studi effettuati durante questo percorso hanno portato all'ottenimento di un sistema idoneo per il trasporto attraverso il sistema linfatico associato all'intestino di molecole con azione antitumorale il cui utilizzo è ostacolato da alcuni svantaggi come la ridotta biodisponibilità dopo somministrazione orale, problema comune a molti farmaci antineoplastici.

I risultati ottenuti consentono di avere una visione più ampia delle applicazioni delle nanoparticelle in ambito tumorale e forniscono una valida linea di ricerca su cui proseguire attraverso eventuali studi *in vivo* e clinici.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro. In particolare il Prof. Giunchedi guida nella progettazione e sviluppo di tutto il lavoro, la Prof.ssa Elisabetta Gavini e la Prof.ssa Giovanna Rasso per i consigli e l'aiuto che non mi hanno fatto mai mancare durante i tre anni di dottorato e il Sig. Massimo Cossu per il suo preziosissimo aiuto nella pratica di laboratorio.