

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento Farmaceutico

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA**

XX ciclo

Indirizzo: BIOFARMACEUTICO

Coordinatore: Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

**“NANOTECNOLOGIE FARMACEUTICHE
APPLICATE AL RILASCIO MODIFICATO DI
FARMACI ANTITUMORALI NELLA TERAPIA
DEL CANCRO”**

Relatore: Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Dottoranda: CATERINA COMO

Triennio Accademico 2005 - 2007

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. La terapia del cancro	1
1.2. Somministrazione orale ed endovenosa di antitumorali	3
1.3. I farmaci antitumorali e la biodisponibilità	5
1.4. Nanotecnologie farmaceutiche applicate alla terapia del cancro	8
1.5. Tipologie di nanosistemi	15
1.5.1. Liposomi	15
1.5.2. Micelle	16
1.5.3. Nanoparticelle	18
1.6. Trasformazione di nanosistemi in microsistemi	21
1.7. Farmaci modello	23
1.7.1. Paclitaxel	24
1.7.2. Tamoxifene citrato	25
2. SCOPO DELLA RICERCA	27
3. MATERIALI E METODI	29
3.1. Materiali	29
3.2. Preparazione delle nanoparticelle di lecitina/chitosano (NLC)	31
3.2.1. Soluzione di lecitina	31

3.2.2. Soluzione di chitosano	31
3.2.3. Formazione delle nanoparticelle di lecitina/chitosano (NLC)	31
3.3. Preparazione dei liposomi	33
3.4. Preparazione delle micelle	34
3.4.1. Determinazione della minima concentrazione micellare (CMC)	35
3.5. Caratterizzazione chimico-fisica dei nanosistemi	36
3.5.1. Analisi dimensionale	36
3.5.2. Misura del Potenziale Zeta (ζ)	37
3.6. Determinazione quantitativa del paclitaxel in liposomi e micelle	37
3.7. Determinazione quantitativa del tamoxifene citrato in NLC	39
3.7.1. Preparazione dei campioni	39
3.7.3. Analisi del tamoxifene citrato	40
3.8. Caratterizzazione calorimetrica e morfologica di NLC	41
3.8.1. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)	42
3.8.2. Microscopia a Forza Atomica (AFM)	42
3.8.3. Microscopia a trasmissione di elettroni (TEM e cryo-TEM)	43
3.9. Determinazione quantitativa del chitosano	45
3.10. Produzione delle polveri a partire dai nanosistemi NLC	46
3.10.1. Liofilizzazione	46
3.10.1. Spray-Drying (S.D.)	46
3.11. Caratterizzazione delle polveri prodotte da NLC	47
3.11.1. Microscopia a Scansione di Elettroni (SEM)	48

3.11.2. Distribuzione dimensionale delle polveri spray-dried (S.D.)	48
3.11.3. Contenuto d'acqua delle polveri S.D.	49
3.11.4. Perdita in peso delle polveri S.D.	50
3.11.5. Titolo delle polveri S.D.	50
3.12. Rilascio di farmaco dai nanosistemi NLC	50
3.13. Colture cellulari	51
3.14. Saggio di citotossicità	52
3.15. Captazione ed internalizzazione cellulare dei nanosistemi tramite citometria di flusso e microscopia a fluorescenza	54
3.16. Determinazione del grado di apoptosi cellulare con il test della Fluoresceinisotiocianato-Annexina V e ioduro di propile	57
3.17. Analisi statistica	59
4. RISULTATI	60
4.1. Nanosistemi lecitina/chitosano NLC	60
4.1.1. Caratterizzazione dei sistemi NLC-TAM	60
4.1.2. Analisi calorimetrica e morfologica	65
4.1.2.1. AFM	66
4.1.2.2. DSC	68
4.1.2.3. TEM	69
4.1.2.4. Cryo-TEM	72
4.1.3. Determinazione quantitativa del chitosano	73
4.1.4. Produzione di polveri da NLC	74

4.1.4.1. Produzione di polveri mediante liofilizzazione	74
4.1.4.2. Produzione di polveri mediante spray-drying (S.D.)	76
4.1.4.2.1. Analisi dimensionale delle polveri S.D.	78
4.1.4.2.2. Contenuto di acqua delle polveri S.D.	79
4.1.4.2.3. Titolo delle polveri S.D.	80
4.1.4.2.4. Morfologia delle polveri S.D.	81
4.1.5. Inclusione del Tamoxifene nelle β -ciclodestrine	84
4.1.6. Rilascio di tamoxifene citrato	88
4.1.6.1. Rilascio di farmaco da NLC	88
4.1.6.2. Rilascio di farmaco da polveri S.D.	90
4.1.7. Citotossicità dei nanosistemi NLC-TAM e delle polveri S.D.	91
4.1.8. Captazione e internalizzazione nelle CACO2 dei nanosistemi NLC	93
4.2. Nanosistemi per il Paclitaxel	98
4.2.1. Formulazione e caratterizzazione delle micelle	98
4.2.2. Formulazione e caratterizzazione dei liposomi	100
4.2.3. Captazione ed internalizzazione nelle cellule tumorali delle micelle	104
4.2.4. Captazione ed internalizzazione nelle cellule tumorali dei liposomi	107
4.2.5. Citotossicità delle micelle	110
4.2.6. Citotossicità dei liposomi	112
4.2.7. Determinazione della apoptosi	117
5. DISCUSSIONE	122
BIBLIOGRAFIA	129

1. INTRODUZIONE

1.1 La terapia del cancro

Per “tumore” o “neoplasia” si intende la proliferazione incontrollata di un tessuto a seguito di mutazioni a carico delle porzioni di DNA che controllano la crescita cellulare (geni per fattori di crescita e relativi recettori, geni per trasduttori intracellulari, geni per fattori di trascrizione nucleare).

Ulteriori alterazioni possono conferire alle cellule la capacità di degradare i costituenti della lamina basale quali collagene, proteoglicani e glicosaminoglicani, di eludere la sorveglianza del sistema immunitario e di ignorare il contatto con cellule di origine tissutale diversa: in questi casi si realizzano le caratteristiche di *invasività* nei tessuti circostanti e *diffusione* lontano dal sito di insorgenza, tipiche del tumore “maligno” [1].

L'estensione ed il grado di progressione della malattia vengono descritte, per la maggior parte dei tumori, dal sistema di stadiazione TNM [2] messo a punto dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Secondo questo protocollo, per caratterizzare una neoplasia devono essere definiti, tramite una accurata anamnesi e appropriate metodiche di indagine, i seguenti parametri:

→ **T** indica l'estensione del tumore primario

T0 = nessuna evidenza di tumore primario

Tis = carcinoma in situ

T1-4 = grado crescente di aumento delle dimensioni del tumore

- **N** indica il coinvolgimento dei linfonodi
 - N0 = nessuna evidenza di cellule tumorali nei linfonodi
 - N1-3 = interessamento crescente dei linfonodi regionali

- **M** indica la metastatizzazione a distanza
 - M0 = nessuna evidenza di metastasi
 - M1 = presenza di metastasi

Sulla base della designazione TNM il tumore viene classificato in uno stadio da 0 a IV. Questo tipo di caratterizzazione ha un alto valore prognostico e influenza, prima di altri fattori, il tipo di approccio terapeutico.

In genere si può affermare che l'asportazione chirurgica della massa tumorale costituisce il trattamento di prima linea dei tumori solidi localizzati, adiuvata da protocolli radioterapici o chemioterapici per diminuire il rischio di recidive. Questa prassi è denominata *terapia adiuvante* ed è costituita dalla radioterapia o dalla chemioterapia che vengono effettuate dopo l'intervento di resezione chirurgica, al fine di eliminare le micrometastasi eventualmente presenti e migliorare i risultati a lungo termine, apportando un contributo significativo nel ridurre le ricadute post-chirurgiche [3].

La chemioterapia può essere effettuata anche prima dell'intervento chirurgico (*terapia primaria o neoadiuvante*) per permettere di rendere operabili tumori che altrimenti non lo sarebbero. La radioterapia è utile in caso di neoplasie localmente avanzate, meglio se fatta insieme a somministrazione di farmaci radiosensibilizzanti. Negli stadi più avanzati con presenza di metastasi, la chemioterapia è il trattamento d'elezione grazie alla sua azione sistemica. Considerato che, data l'elevata tossicità, essa altera il "performance status" -che è una misura della qualità della vita del paziente- le linee di ricerca attuali sono tese ad individuare protocolli che uniscano

l'efficacia alla tollerabilità del trattamento e che mantengano un buon performance status del paziente [3].

Gli agenti chemioterapici sono tra i farmaci a più basso indice terapeutico, potenzialmente in grado di causare effetti collaterali gravi che da una parte ne limitano l'uso e dall'altra richiedono approfondite conoscenze di farmacocinetica, farmacodinamica e interazioni tra farmaci per poter essere usati con efficacia e sicurezza. È emerso, altresì, che la comparsa di farmacoresistenza rappresenta l'ostacolo maggiore al conseguimento di un maggior numero di guarigioni e che un ruolo importante ha il mantenimento di una adeguata intensità di dose dei farmaci somministrati [3-5].

1.2 Somministrazione orale ed endovenosa di antitumorali

La maggior parte dei farmaci antitumorali sono stati sviluppati e formulati per la somministrazione endovenosa, sia essa bolo o infusione prolungata, per vari motivi, i più importanti fra i quali sono l'immediata disponibilità del farmaco con rapidi effetti farmacodinamici e la possibilità di controllare la somministrazione –in ragione del basso indice terapeutico di questi farmaci- modificando la dose o perfino interrompendo l'infusione, se richiesto. In realtà questa via di somministrazione è associata anche a diversi svantaggi che limitano la sua applicabilità, inclusi l'aumento di morbilità per l'accesso i.v., dovuta a rischio di infezioni catetere-correlate, potenziale trombosi ed extravasazione e presenza di materiale particolato nelle preparazioni infusionali [4].

Vi è stato pertanto un crescente interesse verso lo sviluppo di preparazioni antitumorali somministrate extravascolarmente, dovuto alla maggiore accettabilità da parte del paziente ed alla qualità della vita, che stanno diventando considerazioni centrali nei regimi di trattamento palliativo. In aggiunta, bisogna considerare

l'analisi farmacoeconomica, che è sempre più importante e porta alla ricerca di regimi di trattamento con miglior rapporto costo-efficacia, nel cui ambito rientra – oltre alla scelta del farmaco - anche la scelta della via di somministrazione: ad esempio quella intravenosa comporta costi nettamente più alti rispetto a quella orale. Per contro la via orale unisce al vantaggio economico anche la praticità [4,5].

Già da diversi anni sono disponibili preparazioni per la somministrazione orale di farmaci utilizzati nella terapia tumorale, come ad esempio il tamoxifene, che è impiegato da tempo come trattamento di prima linea nella terapia del tumore alla mammella ormono-dipendente [6], o altri farmaci quali l'etoposide, la ciclofosfamide e nuovi derivati sintetici delle fluoropirimidine (UFT e capecitabina), agenti di coordinazione del platino (JM-216) e alcaloidi della Vinca (come la vinorelbina). Inoltre, il riconoscimento che diversi composti antitumorali richiedono una esposizione prolungata per massimizzarne gli effetti (dovuto al fatto che sono più attivi in determinati momenti del ciclo vitale della cellula) ha condotto allo sviluppo di agenti ciclo cellulare-specifici, quali le camptotecine (topotecan, 9-aminocamptotecina e irinotecan) per la somministrazione orale [5].

La compliance del paziente è un importante problema di una terapia orale, poiché l'assunzione orale a casa è totalmente dipendente dalla volontà dell'individuo e implica l'impossibilità dello stretto controllo da parte del personale specializzato nell'osservanza del regime terapeutico, con conseguente aumento della probabilità di insuccesso del trattamento e diminuzione della sopravvivenza. Bisogna però considerare che il tipo di patologia rende il paziente molto più attento alla compliance. Questa via di somministrazione quindi è conveniente per il paziente (dato che ne migliora la qualità della vita, rendendo più pratico e meno invasivo il trattamento cronico ed evitando l'ospedalizzazione) e la compliance può anche essere aumentata con l'educazione del paziente ed un supporto psicologico a casa [4,5].

Unitamente a tutti i vantaggi sopraelencati, però, anche la via di somministrazione orale di farmaci antitumorali presenta degli aspetti che devono essere attentamente valutati: perché una terapia orale si dimostri efficace il farmaco deve essere sufficientemente biodisponibile e un ideale chemioterapico dovrebbe avere una bassa variabilità inter-paziente e, soprattutto, intra-paziente nell'assorbimento e nei livelli ematici [5].

1.3 I farmaci antitumorali e la biodisponibilità

La biodisponibilità è una misura della quantità e della velocità con cui un farmaco entra nella circolazione sistemica e raggiunge il sito d'azione.

Nella via endovenosa l'assorbimento del farmaco è per definizione completo e immediato e la sua concentrazione plasmatica è facilmente prevedibile e controllabile [7].

Per quanto riguarda invece la via orale, l'assorbimento e la biodisponibilità di un farmaco dipendono, oltre che dalle caratteristiche chimico-fisiche della molecola (solubilità, bilancio lipofilo-idrofilo) e dalla velocità di dissoluzione dovuta alla formulazione, da numerosi fattori legati alla complessità del sistema gastrointestinale, quali l'area superficiale, la perfusione ematica dei tessuti e la morfologia dei diversi tratti del GI, i sistemi di trasporto attivo, il metabolismo presistemico, la grande variabilità del pH, la composizione e il volume dei fluidi, la motilità ed il tempo di transito, la presenza di cibo e la possibile interazione dei componenti della dieta con i farmaci, oltre che alla presenza di stati patologici [7-9].

Nella somministrazione di antitumorali bisogna considerare attentamente la biodisponibilità, poichè:

- a. i farmaci antitumorali hanno solitamente un intervallo terapeutico ristretto, per cui si può facilmente raggiungere una concentrazione tossica o restare al di sotto della soglia terapeutica;
- b. sono destinati ad un'azione sistemica, per cui l'assorbimento è un requisito fondamentale per l'attività.

Soprattutto in conseguenza di una somministrazione per os, la mancanza di informazioni e di controllo circa i meccanismi di assorbimento e le condizioni soprariportate può portare ad effetti collaterali e reazioni avverse imprevedibili o ad un'esposizione al farmaco sub-ottimale, con difficoltà nella valutazione clinica [4,5].

I livelli plasmatici dopo una somministrazione orale sono generalmente più variabili di quelli che seguono ad una somministrazione intravena e purtroppo la maggior parte dei farmaci anticancro ha una biodisponibilità orale bassa e variabile. Una adeguata biodisponibilità orale è importante anche nel momento in cui, come è già stato evidenziato precedentemente, il tempo di esposizione al farmaco è determinante in una terapia antitumorale [9].

I principi attivi che hanno problemi di biodisponibilità possiedono, in genere, una o più delle seguenti caratteristiche [8]:

- ✓ elevata lipofilia e difficoltà di solubilizzazione nei fluidi fisiologici acquosi;
- ✓ bassa permeabilità;
- ✓ dipendenza dell'assorbimento da un processo di trasporto facilitato o attivo saturabile;
- ✓ instabilità metabolica enzimatica o idrolitica dovuta al pH in determinati comparti del tratto GI.

Queste difficoltà lasciano prevedere che la biodisponibilità di un preparato di un farmaco antitumorale passi attraverso una attenta formulazione. E' noto come gli sviluppi moderni della tecnologia farmaceutica abbiano portato a preparazioni che aumentano la solubilità nei fluidi fisiologici dei farmaci scarsamente solubili e a formulazioni a rilascio modificato, che sono in grado cioè di alterare il tempo e/o il sito di rilascio dei principi attivi in esse contenuti.

Tra le varie possibilità di migliorare la biodisponibilità, sono stati fatti anche studi sull'aumento dell'assorbimento intestinale bloccando i trasportatori transmembrana ATP-dipendenti (ad es. co-somministrando la ciclosporina A, che è un inibitore della glicoproteina P), oppure inibendo l'attività degli enzimi gastrointestinali ed epatici, particolarmente il sistema del citocromo P-450, per diminuire la variabilità interindividuale negli effetti di un farmaco e per massimizzarne l'assorbimento [9].

Conoscendo quindi i punti deboli nel percorso tra la somministrazione ed il raggiungimento del sito di azione, si può agire utilizzando sistemi a rilascio modificato che permettano di ovviare a questi problemi attraverso diverse soluzioni, che possono essere: migliorare la solubilizzazione, incrementare la permeazione e/o evitare la saturazione dei trasportatori che mediano l'assorbimento, attuare una protezione del farmaco che subisce metabolismo esteso o, ancora, realizzare un rilascio mirato ai tessuti bersaglio, per migliorare l'efficacia e diminuire la tossicità e gli effetti collaterali, anche in conseguenza di una diminuzione delle dosi [7,10].

Tuttavia nelle fasi iniziali di studio di un farmaco o di una formulazione rimane la maggior complessità della via orale, rispetto a quella endovenosa, anche per la difficoltà di prevedere la biodisponibilità, utilizzando dei modelli *in vitro* che abbiano una buona capacità di predizione e correlazione con la condizione *in vivo* [11-13].

1.4 Nanotecnologie farmaceutiche applicate alla terapia del cancro

La grande possibilità di utilizzo in medicina di sistemi colloidali sia come sistemi di rilascio modificato di farmaci, sia come vettori per acidi nucleici e per agenti diagnostici ha portato ad una crescente attenzione verso le nanotecnologie. L'applicazione delle nanotecnologie per la diagnosi, il monitoraggio, il trattamento ed il controllo dei sistemi biologici è oggi chiamato “*nanomedicina*” [14].

I nanosistemi farmaceutici sono in grado di mascherare e correggere caratteristiche fisico-chimiche sfavorevoli delle molecole veicolate [15,16]. Sono infatti utilizzati per:

1. aumentare la solubilità di farmaci scarsamente solubili in ambienti acquosi (quali i sistemi fisiologici);
2. proteggere molecole labili dalla inattivazione e dalla degradazione enzimatica e chimica (come per esempio proteine e acidi nucleici);
3. aumentare la biodisponibilità;
4. aumentare la frazione di farmaco che raggiunge il sito d'assorbimento o d'azione;
5. ridurre o evitare reazioni avverse e/o effetti collaterali indesiderati.

Esiste una grande varietà di sistemi colloidali, pochi dei quali sono attualmente in commercio e molti in fase di sviluppo, come ad esempio: liposomi, nanoparticelle (polimeriche, lipidiche solide, metalliche), micelle, lipoproteine, lipoplexi, niosomi, dendrimeri, etc... [15,17,18].

Come abbiamo già visto, farmaci che hanno una bassa solubilità in acqua sono spesso scarsamente assorbiti e quindi hanno una bassa biodisponibilità, specialmente dopo somministrazione orale [19].

D'altra parte però l'idrofobicità e la bassa solubilità in acqua sembrano essere caratteristiche intrinseche di molti farmaci (inclusi agenti antitumorali come camptotecine, taxani, tamoxifene) che aiutano la penetrazione delle membrane cellulari per raggiungere importanti target intracellulari, quali recettori citoplasmatici, nucleo, mitocondri e microtubuli [15,20].

La possibilità di aumentare la solubilità e la capacità di superare meglio le barriere fisiologiche realizzando nel contesto una protezione del farmaco dalla degradazione e dalla inattivazione metabolica, può portare dunque ad una maggiore biodisponibilità.

Idealmente un nanosistema farmaceutico dovrebbe essere biodegradabile, poco costoso e facile da preparare, possedere dimensioni ridotte, un elevato caricamento di farmaco, dimostrare una prolungata emivita nella circolazione sanguigna in seguito a somministrazione i.v. e possibilmente accumularsi specificamente nelle aree del corpo affette dalla patologia che si vuole trattare [15].

E' noto che la vascolatura di aree patologiche, contrariamente ai normali vasi sanguigni sani, è compromessa, ovvero discontinua, con aperture attraverso cui possono extravasare ed accumularsi nello spazio interstiziale sia grandi molecole sia particolato di piccole dimensioni. Questo accumulo può essere facilitato da una potenziale carenza del sistema linfatico che normalmente è responsabile del drenaggio delle macromolecole dai tessuti sani [21].

Questo fenomeno dell'accumulo preferenziale in determinati siti bersaglio dei nanocarrier farmaceutici è un *direzionamento passivo* e prende il nome di effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR = enhanced permeability and retention effect), basato sulla facilitata penetrazione di macromolecole e carrier particolati per

farmaci a lunga circolazione nell'intertizio attraverso la vascolatura compromessa. Questa è una caratteristica dei tumori solidi, delle zone infartate e dei tessuti infiammati e l'effettivo diametro dei pori dell'endotelio dei vasi sanguigni nei tumori umani sembra essere compreso in un range tra 200nm e 600nm [15,21-23].

Chiaramente, la circolazione prolungata di nanosistemi (come ad esempio i liposomi PEGilati) facilitano l'accumulo EPR-mediato nelle regioni bersaglio, poiché fornisce maggiori opportunità di raggiungere ed interagire col sito d'azione. E' stata osservata infatti una diretta correlazione tra la longevità di questi colloidali e la loro capacità di raggiungere e di accumularsi nei siti bersaglio [15,24].

Accanto al direzionamento passivo, con questi nanocarrier è inoltre possibile realizzare un *targeting attivo*, funzionalizzandoli con porzioni che conferiscano la capacità di :

- a. riconoscere e legarsi specificatamente a ligandi o recettori di superficie di determinati tessuti (es. anticorpi monoclonali o frammenti Fab, folato, transferrina);
- b. rispondere a stimoli locali caratteristici dell'area patologica, come cambiamenti di pH o stimoli chimici; od anche ad applicazione di una fonte di calore esterna (utilizzo di sistemi pH o temperatura-dipendenti);
- c. penetrare dentro alle cellule superando la degradazione lisosomiale e permettere al farmaco o al DNA di raggiungere il proprio target intracellulare (proteine o peptidi che aumentano la capacità di penetrazione cellulare) [15].

Il direzionamento attivo, ottenuto legando sulla superficie molecole che siano direzionate verso siti specifici, aumenta attivamente la captazione di questi nanosistemi da parte delle cellule o dei tessuti bersaglio. Gli anticorpi monoclonali riconoscono antigeni di superficie specifici presenti su determinate cellule e vi si legano incrementando l'accumulo dei nanocarrier nel sito d'azione [22,25], mentre

L'utilizzo di piccole molecole come il folato si basa sull'iper-espressione di recettori specifici in certe cellule tumorali, che sono in rapida crescita e necessitano di queste molecole che sono essenziali per i processi di crescita e divisione cellulare [26].

L'impiego di sistemi pH-dipendenti sembra realizzabile in virtù della differenza di pH tra le zone sane e quelle malate, poichè nel tessuto tumorale, il pH è più acido [27,28].

Una volta che il veicolo ha raggiunto il bersaglio, poi, deve penetrare nelle cellule e rilasciare il carico, ovvero il farmaco, dentro al citoplasma dove per espletare la sua azione terapeutica deve raggiungere il bersaglio, che può essere il nucleo, specifici organelli, quali i lisosomi e i mitocondri o il reticolo endoplasmatico.

Un nuovo approccio per il rilascio intracellulare di diverse molecole e nanoparticelle prevede la loro modificazione con proteine e peptidi che hanno la capacità di penetrare nelle cellule (CPPs = cell-penetrating peptides and proteins) semplicemente traslocando attraverso la membrana cellulare, senza coinvolgere meccanismi di endocitosi [29,30].

In questi ultimi anni, sono state individuate diverse proteine e peptidi con questa capacità di passare attraverso le membrane cellulari. Uno dei più studiati è la proteina derivante dall'HIV-1 di 86 residui chiamata TAT (*trans-activating transcriptional activator*), che è stato dimostrato viene efficientemente captata da diversi tipi di cellule quando aggiunta al mezzo circostante [31,32].

I CPP possono essere divisi in due categorie: la prima consiste di peptidi elicoidali anfipatici, dove la lisina è il maggior contribuente alla carica positiva; la seconda classe include i peptidi ricchi in arginine, come il TAT [29].

La loro capacità di traslocare attraverso la membrana plasmatica è confinata ad una corta sequenza di meno di 20 aminoacidi che sono molto ricchi in residui basici.

Questi peptidi sono stati usati per il rilascio intracellulare di vari carichi di molecole con peso di diverse volte maggiore del loro stesso [33].

I CPP possono essere anche utilizzati con successo per il rilascio intracellulare di farmaci [34], e sistemi carrier quali liposomi, micelle e nanoparticelle [29]. E' stato riportato che liposomi sia normali sia rivestiti con PEG di dimensioni relativamente grandi di circa 200nm possono essere captati da diverse cellule grazie alla funzionalizzazione con diverse molecole di TAT peptide (TATp) attaccati alla loro superficie tramite un braccio spaziatore di PEG-fosfatidiletanolamina (TATp-liposomi) [35].

L'opportunità quindi di operare un rilascio modificato del farmaco e di realizzare un direccionamento passivo e/o sito-specifico, incrementando la frazione di farmaco che si accumula nell'area patologica, è in grado di migliorare l'efficacia terapeutica e diminuire le reazioni avverse e gli effetti collaterali [34]. Questo è di massima importanza per farmaci molto tossici come i farmaci antitumorali, che hanno una stretta finestra terapeutica, ovvero la soglia di efficacia e quella tossica sono molto vicine.

Per superare l'ostacolo della bassa solubilità dei farmaci, varie soluzioni sono state tentate: la formazione di sali o gli aggiustamenti di pH in alcuni casi può facilitare la dissoluzione di farmaci scarsamente solubili, ovviamente nel caso in cui contengano gruppi ionizzabili [36]; oppure si possono utilizzare nelle formulazioni certi solventi organici clinicamente accettabili, come il Cremophor[®] EL (olio di ricino poliossietilenato) anche se presenta diverse reazioni avverse ed effetti collaterali, oppure alcuni surfattanti [37].

Tuttavia, la somministrazione di molti co-solventi o surfattanti può causare tossicità o altri effetti indesiderati [38].

Per tali ragioni una alternativa molto studiata è l'utilizzo di nanosistemi.

Le caratteristiche fondamentali di questi sistemi colloidali nella terapia antitumorale sono quindi solubilizzazione e la protezione del principio attivo, con l'accumulo preferenziale di tali vettori nel tessuto tumorale, dovuto allo scarso drenaggio linfatico ed all'elevata permeabilità del tessuto vascolare formatosi per angiogenesi nei carcinomi a rapida crescita. Inoltre, la captazione da parte del fegato e dagli altri organi del RES dipende dalle caratteristiche della superficie del vettore (bilancio idrofobo-idrofilo e carica). In conseguenza di una somministrazione endovenosa di nanosistemi si ha una distribuzione nell'organismo dipendente dalle dimensioni dei vettori e dalle caratteristiche di superficie, che ne determinano il tempo di circolazione, ottenendo un accumulo nelle aree patologiche grazie all'effetto EPR [15,16,39].

Questo accumulo selettivo mediato dall'effetto EPR di nanosistemi nelle aree patologiche è stato però dimostrato solo per via endovenosa. Quando si passa alla via orale tutto si complica e bisogna prima considerare la fase di assorbimento e poi prendere in considerazione gli eventi post-assorbimento [40].

E' stato dimostrato che la somministrazione orale di nanoparticelle porta ad un assorbimento delle stesse da parte delle cellule del tratto gastrointestinale per entrare nella circolazione sistemica ed esplicare la loro azione anche in altri distretti dell'organismo. E' stato trovato che la dimensione delle nanoparticelle gioca un ruolo fondamentale nell'assorbimento attraverso il tratto G.I. e sono stati proposti tre possibili meccanismi coinvolti in questo processo [10,39,41]:

- A. passaggio paracellulare tra le cellule dell'epitelio intestinale, per le particelle di dimensioni estremamente ridotte (< 50nm)
- B. passaggio transcellulare dovuto all'endocitosi ad opera degli enterociti (per particelle fino a 500nm)

- C. captazione da parte delle cellule M delle placche di Peyer (particelle di dimensioni $< 5\mu\text{m}$)

Il tutto è rappresentato in Figura1 (fonte adattata da [39]).

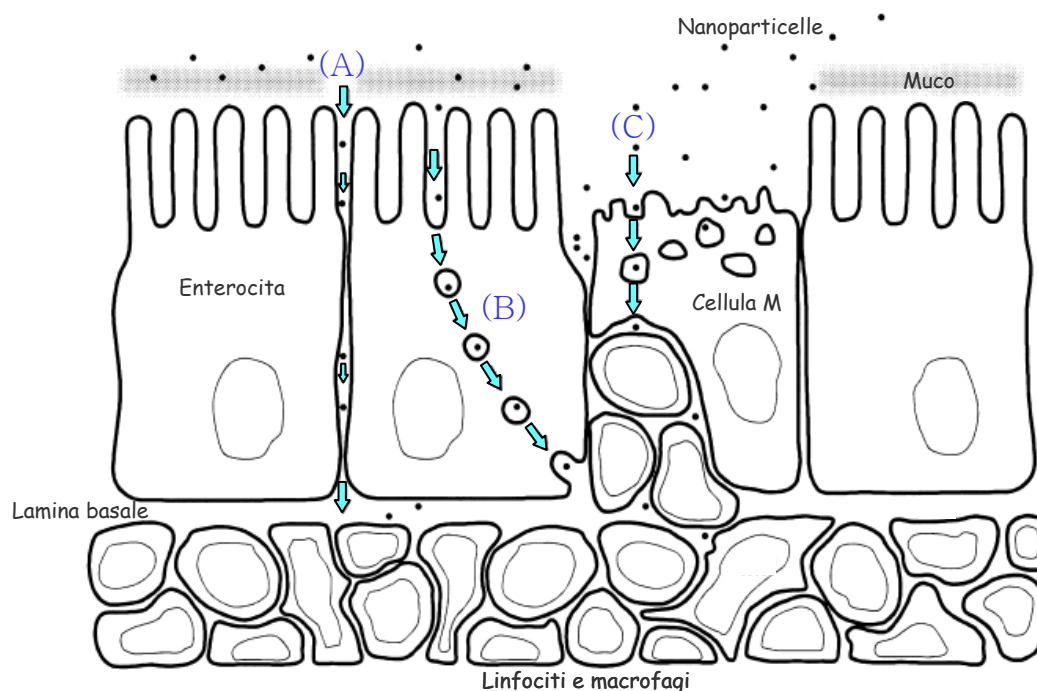


Figura1. Meccanismi di assorbimento di nanoparticelle da parte di vari tipi di cellule intestinali.

Alla luce di quanto visto, dunque, si può dedurre che la veicolazione in liposomi, micelle e nanoparticelle, possa aumentare la biodisponibilità di farmaci antitumorali e la captazione da parte delle cellule bersaglio. Questi sistemi colloidali mascherano le proprietà chimico fisiche sfavorevoli dei farmaci, riuscendo a far superare le barriere fisiologiche, evitare quelle metaboliche (come ad esempio il complesso del citocromo P-450 nella via orale) ed operando anche un direccionamento, grazie alle loro dimensioni, alla composizione ed all'eventuale rivestimento [10,39].

1.5 Tipologie di nanosistemi

I sistemi colloidali appartengono alla grande famiglia dei sistemi dispersi consistenti di materiale particolato (denominato “fase dispersa”) distribuito in un mezzo di dispersione (chiamato “fase continua”) [7].

In questo studio sono stati presi in considerazione tre diverse categorie di colloidali: liposomi, nanoparticelle e micelle.

1.5.1 Liposomi

I liposomi, scoperti negli anni '60 [42], rappresentano uno dei sistemi maggiormente studiati sia come modelli di membrane cellulari sia come veicoli per farmaci o altre sostanze.

I liposomi sono ampiamente utilizzati in virtù dei loro semplici metodi di preparazione e della loro versatilità. Infatti essi possono sia incorporare molecole lipofile nel doppio strato fosfolipidico sia incapsulare nel core acquoso composti idrofili che necessitano di protezione dalla degradazione (come per esempio proteine ed acidi nucleici), o tossici (la doxorubicina incapsulata in liposomi a lunga circolazione ha visto modificata considerevolmente la farmacocinetica, e migliorata l'efficacia e la tossicità) [43,44]. I liposomi sono soprattutto utilizzati nelle preparazioni farmaceutiche anche per via della loro bassa tossicità, dato che nella maggior parte dei casi la composizione contiene fosfolipidi e steroli presenti in natura ed è molto simile alle membrane cellulari. Essi sono facilmente funzionalizzabili ed i più comunemente impiegati sono i liposomi rivestiti con polietilenglicole (PEG), detti PEGilati o *stealth*, che grazie ad un intorno idrofilo e non carico presentano un meccanismo di protezione, anche di tipo repulsivo-meccanico, verso l'opsonizzazione da parte del reticolo endoteliale [15]. Le uniche

preparazioni colloidali presenti in commercio per la veicolazione di farmaci antitumorali e non sono di tipo liposomiale (Ambisome[®] farmaco antifungino, Amfotericina B, formulato in liposomi PEGilati, Daunosome[®] antitumorale Daunorubicina in liposomi semplici, Doxil[®] e Caelix[®] formulazioni di Doxorubicina in liposomi stealth).

In questa ricerca sono stati studiati liposomi di diversa composizione lipidica, funzionalizzati e non con molecole di TAT-peptide coniugato alla superficie tramite un braccio spaziatore di PEG-fosfatidiletanolamina, per la veicolazione di farmaci antineoplastici e la comparazione dell'efficacia nell'azione antitumorale tra i liposomi normali e quelli funzionalizzati.

1.5.2 Micelle

Le micelle appartengono al gruppo dei colloidali, che si formano spontaneamente sotto certe condizioni di concentrazione e temperatura da molecole anfifiliche o agenti surfattanti. Tali molecole contengono due distinte regioni con affinità opposte verso i solventi utilizzati. A basse concentrazioni in un mezzo acquoso tali molecole anfifiliche esistono separatamente; qualora la concentrazione aumenti, avviene l'aggregazione dei monomeri in strutture sopramolecolari chiamate micelle (questo fenomeno di aggregazione si realizza in uno stretto intervallo di concentrazione). La concentrazione a cui compaiono le micelle è detta "concentrazione micellare critica" (CMC) [18,45].

La formazione delle micelle è guidata dalla diminuzione dell'energia libera del sistema, dal momento che, quando le molecole si trovano in un ambiente acquoso, le porzioni idrofobiche interagiscono con altre regioni idrofobe e vengono nascoste dalle porzioni idrofile, risultando così sottratte all'interazione col solvente. Il risultato è di sottrarre le parti idrofobe all'interazione col solvente. Una ulteriore

forza che favorisce la comparsa delle micelle è data dalla formazione di legami di Van der Waals fra i blocchi idrofobi che costituiscono il core delle micelle. Le porzioni idrofile, invece formano la corona esterna delle stesse [46,47].

Le micelle possono venire impiegate come veicoli per farmaci scarsamente solubili in mezzi acquosi, poiché le micelle sono in grado di solubilizzare tali farmaci accogliendoli nel proprio core apolare, mentre molecole più polari possono essere adsorbite sulla superficie delle micelle e sostanze con polarità intermedia possono distribuirsi lungo le catene dei surfattanti in una posizione intermedia [45].

Alle catene dei monomeri formanti le micelle, come anche per gli altri nanosistemi [15,16], si possono attaccare porzioni che impartiscono caratteristiche particolari, come ad esempio la coniugazione con porzioni utilizzate per imaging in diagnostica o la coniugazione con anticorpi monoclonali o altre porzioni che riconoscano o siano captate specificamente da tessuti bersaglio [44,45].

L'assemblamento spontaneo e l'incorporazione di farmaci più o meno idrofobi può essere schematizzata come in Figura 2.

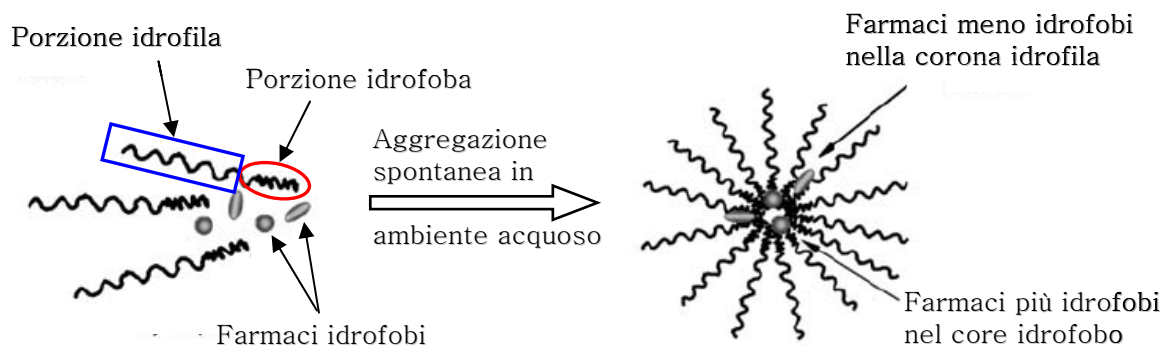


Figura2. Micelle farmaceutiche: formazione spontanea di micelle da molecole anfipatiche in un mezzo acquoso e caricamento con farmaci di diversa idrofobicità. (Fonte modificata da [45]).

Le micelle oggetto di studio in questo lavoro sono costituite da un coniugato del PEG2000 con una fosfatidiletanolamina: 1,2-Distearoil-*sn*-Glicerolo-3-fosfoetanolamina-N-[metossi(polietilenglicol)-2000] (PEG2000-PE) (Figura3).

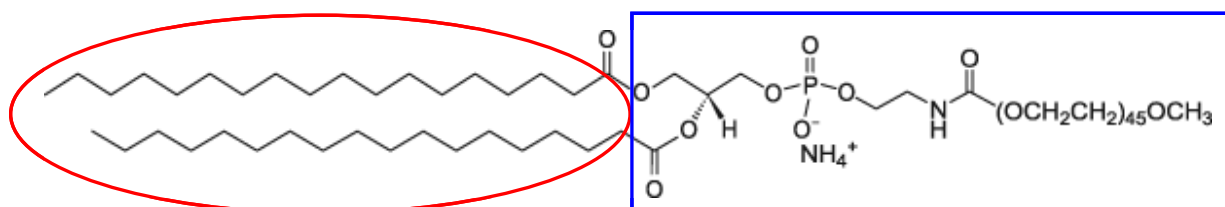


Figura3. Struttura del monomero PEG2000-PE.

Questo monomero amfilico è stato usato anche in combinazione con altri eccipienti da aggiungere alle micelle semplici per formare micelle miste ed aumentare la lipofilia del core ed il caricamento del farmaco idrofobo da incapsulare.

Inoltre, anche le micelle sono state funzionalizzate con molecole di TAT-peptide attaccate al coniugato PEG3400-fosfatidiletanolamina, per confrontare l'efficacia antitumorale sia delle micelle normali sia di quelle contenenti il TATp.

1.5.3 Nanoparticelle

Le nanoparticelle possono essere distinte in due classi morfologiche:

- nanocapsule, sistemi vescicolari costituiti da un nucleo oleoso circondato da una sottile membrana polimerica
- nanosfere, sistemi a struttura meno ordinata di tipo “matrice”.

E' tuttavia importante sottolineare che, a causa delle ridotte dimensioni di questi sistemi, risulta difficile dimostrare se vi sia una matrice continua o una parete ben definita [7,18].

In funzione della composizione si possono distinguere nanoparticelle solide lipidiche [48] e nanoparticelle polimeriche [30,39], ottenibili con una vasta gamma di materiali. Sono sistemi molto versatili per realizzare un rilascio modificato di farmaco. I polimeri possono controllare la velocità di rilascio del principio attivo e, a seconda delle caratteristiche di questi, si può operare un rilascio del farmaco modificato non solo nel tempo ma anche nello spazio [49,50], o addirittura modulare con un unico sistema il rilascio di più farmaci, con anche una cinetica diversa [51].

Oltre ai sistemi sopracitati, si possono anche avere dei complessi di interazione di carica tra molecole con cariche opposte, come ad esempio liposomi contenenti componenti carichi positivamente che creano una interazione elettrostatica con molecole cariche negativamente come il DNA (lipoplexi) [52], liposomi negativi e policationi [53,54] o ancora polimeri carichi che interagiscono con molecole che portano una carica opposta [55].

Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un nanosistema a base di lecitina e chitosano, rivelatosi di notevole interesse [56].

La *lecitina* (figura4) si trova in natura nel rosso d'uovo e nei semi di soia, già usata per formare liposomi e micelle [57,58], ha caratteristiche di tensioattivo e non presenta problemi di tossicità.

La lecitina da noi utilizzata è una miscela di fosfolipidi il cui componente principale è la fosfatidilcolina (47,6%), ma anche fosfatidiletanolamina (16,4%) ed altre sostanze, quali acidi grassi liberi; il tutto dà origine, se posto in ambiente acquoso, a liposomi di piccole dimensioni con carica superficiale negativa.

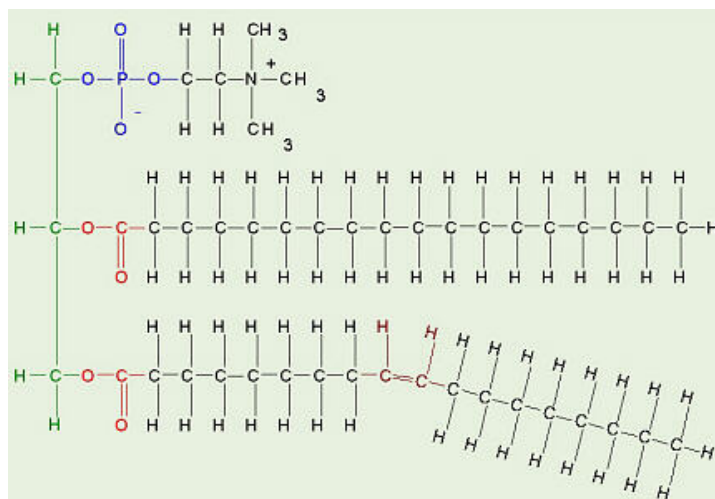


Figura4. Struttura di una fosfatidilcolina.

Il *chitosano* (figura5) è un polisaccaride ad alto peso molecolare, derivato dalla chitina per deacetilazione, e può essere considerato una fibra alimentare cellulosa-simile.

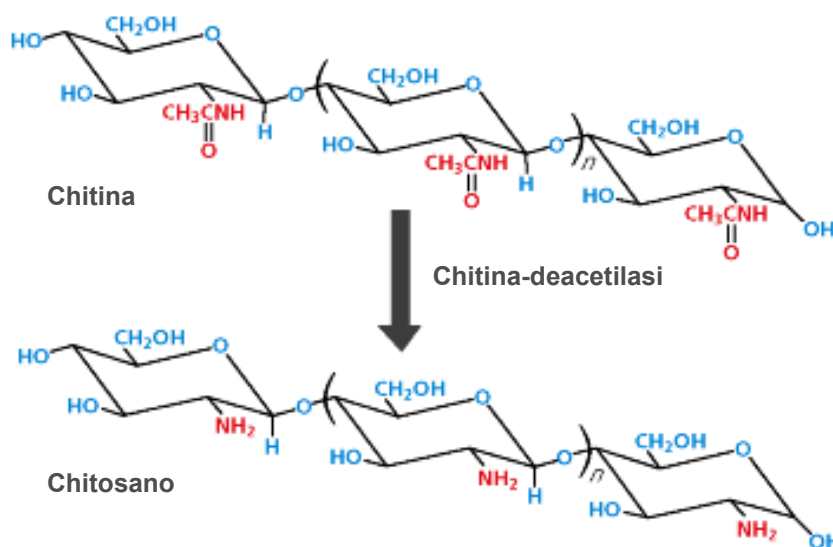


Figura5. Strutture molecolari e processo di deacetilazione della chitina a chitosano.

Il chitosano è un polimero che presenta importanti proprietà di biocompatibilità, mucoadesività e la capacità di alterare in modo reversibile le giunzioni serrate delle cellule ed agire quindi come promotore di permeazione [59-62]. E' anche ampiamente utilizzato nelle preparazioni farmaceutiche sotto varia forma [63-67].

A pH acidi è carico positivamente e può legare sostanze cariche negativamente.

1.6 Trasformazione di nanosistemi in microsistemi

Le sospensioni colloidali in quanto tali presentano difficoltà di tipo tecnologico, in quanto la loro manipolazione non è pratica la dose di somministrazione per via orale è poco accurata e la loro stabilità influenzata dal mezzo liquido. Sarebbe quindi opportuno passare dalle sospensioni colloidali a preparazioni solide, più stabili e più facilmente trasformabili in forme farmaceutiche di dosaggio. Il passaggio da sistema colloidale a preparazione solida avviene attraverso la produzione di polveri che poi possono essere appunto utilizzate per la produzione di forme farmaceutiche classiche.

L'idea è che le microparticelle che costituiscono la polvere racchiudano e servano da veicolo per le nanoparticelle. Le polveri formate dovrebbero quindi essere in grado di riformare la sospensione colloidale quando disciolte in mezzi acquosi, quali quelli fisiologici.

La trasformazione di micelle e liposomi in polveri, destinate alla somministrazione endovenosa, non pone problemi, dal momento che le formulazioni iniettabili sono di solito trasformate in liofilizzati, ricostituiti al momento dell'uso.

E' stata studiata la trasformazione dei nanosistemi costituiti da lecitina e chitosano in polveri per la produzione di forme farmaceutiche per la somministrazione orale attraverso due processi: la liofilizzazione e lo spray-drying.

Per la liofilizzazione è stato scelto come eccipiente il mannitolo (Figura6), uno degli eccipienti più comunemente utilizzati nei prodotti farmaceutici liofilizzati perché assicura l'ottenimento di un preparato stabile e di ottimo aspetto. Inoltre il mannitolo è inerte e non tossico.

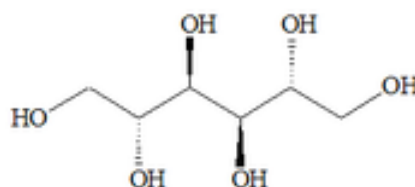


Figura6. Strutture del polialcol chirale mannitolo.

Una via alternativa di produzione di polveri a partire da sospensioni colloidali è l'impiego della tecnica di spray-drying. Tramite questo processo è possibile ottenere delle polveri micronizzate, con una granulometria definita.

Per la produzione delle microparticelle spray-dried si è scelto di utilizzare due tipi di eccipienti con caratteristiche diverse: il mannitolo, molto solubile e inerte, e le β -ciclodestrine, meno solubili e che hanno l'opportunità di interagire con i principi attivi.

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici naturali formati da 6 (α -ciclodestrine), 7 (β -ciclodestrine), o 8 (γ -ciclodestrine) monomeri di D-(+)glucopiranosio uniti tra loro con un legame $\alpha,1-4$ glucosidico e trovano una vasta gamma di applicazioni per i numerosi vantaggi che offrono, quali la protezione e stabilizzazione dei principi attivi con cui riescono ad interagire, l'aumento di solubilità degli stessi e anche un rilascio controllato [68-70].

Le β -ciclodestrine (Figura7) sono impiegate da lungo tempo a scopo farmaceutico per formulazioni orali (comprese e soluzioni) come stabilizzanti e anche per ridurre

gli effetti irritanti locali di alcuni farmaci [69].

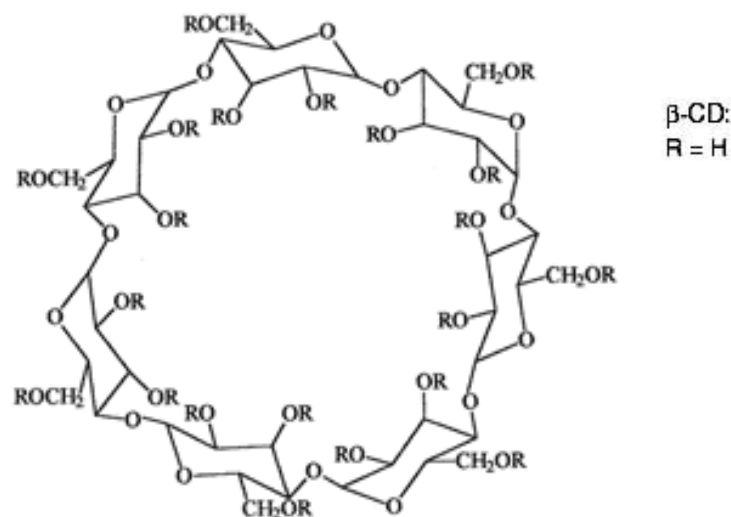


Figura7. Struttura della β-ciclodestrina.

Si è scelto di utilizzare le β-ciclodestrine per la produzione delle microparticelle sia perché si sono dimostrate assolutamente sicure e non tossiche (almeno per la somministrazione orale), sia per una ragione di praticità nella produzione, di resa di processo e di caratteristiche tecnologiche delle polveri ottenute.

1.7 Farmaci modello

I farmaci antitumorale scelti per condurre questa ricerca sono due molecole modello con caratteristiche di quasi insolubilità in fluidi organici ed uno con caratteristiche di elevata lipofilia e neutralità (paclitaxel) e l'altro di parziale anfifilia per la presenza di una carica nella struttura molecolare (tamoxifene citrato).

1.7.1 Paclitaxel

Il paclitaxel (PTX) è una grande e complessa molecola, non planare, derivato diterpenoide ottenuto dagli aghi e dalla corteccia dell'albero *Taxus brevifolia*.

Il paclitaxel è un potente inibitore della replicazione cellulare, bloccando le cellule nella fase G2 del ciclo durante il processo di mitosi attraverso la stabilizzazione dei microtubuli del citoscheletro [71-75].

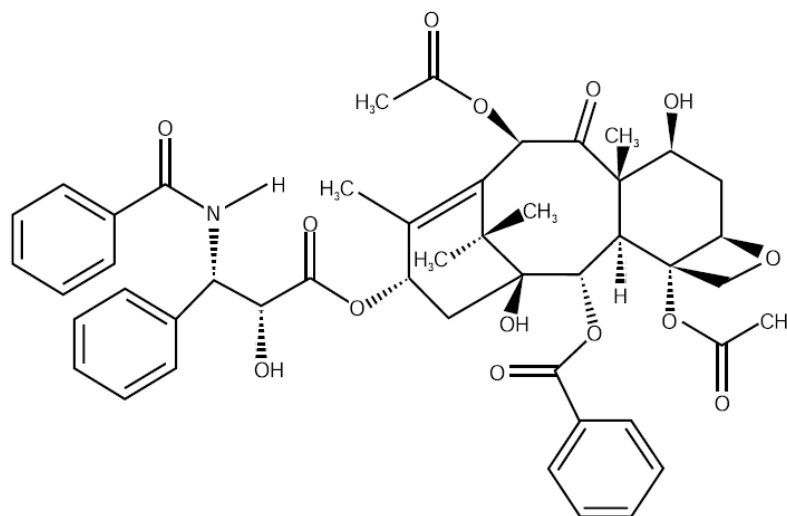


Figura8. Struttura del Paclitaxel.

Studi clinici hanno dimostrato che il paclitaxel ha una attività antineoplastica, in particolar modo contro il carcinoma ovarico, i tumori alla mammella, al colon, della testa e collo ed il cancro al polmone non a piccole cellule. E' stato approvato in molti Paesi per l'uso nei trattamenti di seconda linea nei tumori ovarico ed alla mammella.

E' una molecola idrofobica e molto scarsamente solubile in acqua. Per questo motivo nel prodotto in commercio (Taxol[®], Bristol-Myers Squibb) il paclitaxel è

solubilizzato in una miscela di Cremophor EL (olio di ricino poliossietilenato) ed etanolo assoluto in rapporto 50:50, formulazione che viene somministrata per via parenterale diluita con soluzione fisiologica ed è associata con una serie di reazioni avverse ed effetti collaterali, tra cui reazioni di ipersensibilità, nefrotossicità e neurotossicità [76,77].

Per superare questi problemi, sono in sviluppo nuove formulazioni a base acquosa per solubilizzare il Paclitaxel che non richiedono l'impiego del Cremophor EL e che diminuiscono la clearance sistemica del farmaco. Tra di esse ci sono prodrug con esteri solubili in acqua, utilizzo di ciclodestrine, micelle miste, microemulsioni, nanoparticelle e liposomi sia per la somministrazione parenterale sia per quella orale [78-87].

1.7.2 Tamoxifene citrato

Il tamoxifene citrato (TAM) è un trifeniletilen-derivato, modulatore selettivo dei recettori degli estrogeni ed è il trattamento di prima linea da oltre vent'anni nella cura dei tumori alla mammella ormono-dipendenti [6]. E' anche approvato dalla FDA per la prevenzione di questi tumori in donne ad alto rischio di sviluppo della malattia.

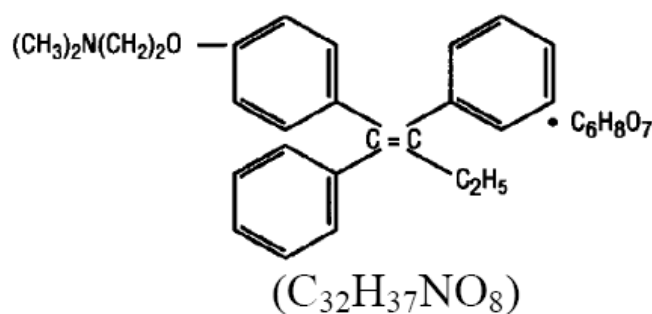


Figura9. Struttura del Tamoxifene Citrato.

Il tamoxifene citrato un composto scarsamente solubile (in acqua a 37°C la solubilità è pari a 0,5mg/ml ed in HCl 0,02N sempre a 37°C è 0,2mg/ml) con caratteristiche basiche ($pK_a = 8,85$) e la struttura porta una carica positiva dovuta al gruppo aminico terziario presente nella catena alifatica laterale [88,89].

Dopo somministrazione orale si ha un assorbimento lento e ci sono alcuni problemi di biodisponibilità anche associati all'incompleta dissoluzione delle formulazioni in compresse classiche [90]. Viene ampiamente metabolizzato e principalmente a carico del sistema del citocromo P-450, che lo converte in diversi metaboliti che conservano ancora attività farmacologica [91,92].

La dose somministrata usualmente varia da 20 a 40 mg/die [88,92,93].

L'efficacia e la tossicità dipendono da una grande variabilità interindividuale [6,90]. E' stato infatti visto che il successo della terapia non è strettamente legato alle concentrazioni plasmatiche di tamoxifene, poiché non sono state rilevate differenze statisticamente significative in termini di riuscita clinica fra donne che hanno ricevuto 20 mg/die e donne che hanno ricevuto 40 mg/die [88,92]. Poiché è ora noto che l'azione farmacologica complessiva del tamoxifene *in vivo* è dovuta – almeno in parte- alla sua conversione in metaboliti che conservano attività uguale, se non in molti casi superiore, l'ipotesi è che l'alterazione del suo metabolismo (dovuta a variabilità genetica nel polimorfismo del citocromo P-450, oltre che ad inibizione dello stesso con inibitori quali gli antidepressivi SSRI) possa contribuire alla variabilità interindividuale nella risposta alla terapia e negli effetti collaterali [92].

In letteratura sono presenti anche studi fatti con questo principio attivo caricato in nanosistemi diversi: Tamoxifene in nanoparticelle di β -ciclodestrine [94,95], in nanoparticelle solide lipidiche [96,97], in nanosfere copolimeriche rivestite di polietilenglicole (PEG) [98] e in altri sistemi polimerici [99-101]. L'inclusione di Tamoxifene in β -ciclodestrine modificate sembra anche aumentarne l'assorbimento nel tratto GI [102].

2. SCOPO DELLA RICERCA

La ricerca di nuove formulazioni che possano essere utilizzate per aumentare la biodisponibilità dei farmaci antitumorali con caratteristiche sfavorevoli è un argomento molto trattato. Questo può portare ad un aumento dell'efficacia dei farmaci antitumorali e ad una diminuzione della tossicità, anche in conseguenza di una diminuzione delle dosi.

Dal momento che le nanotecnologie si sono dimostrate promettenti in molti campi della medicina ed in grado di risolvere diversi problemi nell'ambito farmaceutico, si è scelto di studiare la veicolazione in nanoparticelle, liposomi e micelle per i farmaci scelti, che presentano determinate caratteristiche e punti critici, come la scarsa solubilità in ambienti acquosi e l'instabilità.

L'impiego di questi veicoli colloidali potrebbe aumentare la biodisponibilità dei principi attivi agendo sulla solubilità, permeazione, assorbimento e captazione da parte delle cellule bersaglio operando un direccionamento.

Lo scopo della ricerca è stato fabbricare e caratterizzare dal punto di vista morfologico e chimico-fisico dei vari nanosistemi studiati (nanoparticelle, liposomi e micelle) andandone ad analizzare dimensioni, carica superficiale, caricamento ed efficienza di incapsulazione dei principi attivi. Sono state inoltre valutate l'incremento di solubilità dovuto all'utilizzo di tali formulazioni e l'efficacia testandone la citotossicità su linee cellulari tumorali selezionate.

Per quanto riguarda il tamoxifene citrato, già ampiamente utilizzato in terapia e somministrato per via orale sotto forma di compresse, è stato scelto come farmaco modello di molecole scarsamente solubili, lipofile e contenenti una carica, per studiarne l'interazione con i nanosistemi a base di lecitina e chitosano destinati ad una somministrazione orale. Il razionale era basato sull'ipotesi che il farmaco,

incluso in questo veicolo colloidale (grazie alle dimensioni ed alla composizione), fosse in grado di superare le barriere fisiologiche in misura maggiore e ridurre la variabilità interindividuale dovuta al citocromo P-450, che sembra essere una delle cause della variabilità nella risposta e nel successo della terapia.

Inoltre, per ovviare al problema tecnologico della stabilità ed idoneità di dosaggio di queste formulazioni, che si trovano allo stato liquido, è stata studiata la trasformazione in sistemi solidi e quindi più stabili, sia tramite liofilizzazione, sia tramite processo di spray-drying con la produzione di microparticelle per forme farmaceutiche solide per la somministrazione orale. Poiché le β -ciclodestrine non sono tossiche e sono ampiamente usate come stabilizzanti nelle preparazioni farmaceutiche (hanno la capacità di migliorare le caratteristiche dei farmaci, quali solubilità, stabilità e/o biodisponibilità attraverso la formazione dei complessi di inclusione o associazione) sono state scelte come eccipiente per la produzione di microparticelle contenenti tamoxifene citrato, a partire dai nansistemi.

Il nostro interesse si è anche focalizzato nel trovare una formulazione non tossica, alternativa a quella attualmente in commercio, per la solubilizzazione e veicolazione dell'agente antineoplastico paclitaxel. A questo scopo sono stati presi in considerazione e caratterizzati, valutando tutti i parametri per sistemi colloidali, sia liposomi di diversa composizione sia micelle semplici e miste. Inoltre si è scelto di approfondire l'utilizzo del peptide ad 11 subunità aminoacidiche derivante dal TAT-peptide coniugato attraverso il braccio spaziatore PEG-fosfatidiletanolamina alla superficie sia di liposomi sia di micelle, sistemi entrambi carichi con l'agente antineoplastico paclitaxel, per verificare se vi fosse un aumento nell'internalizzazione cellulare e di conseguenza anche della citotossicità.

3. MATERIALI E METODI

Per la conduzione di questa ricerca si sono utilizzati i materiali e le strumentazioni messe a disposizione dal Dipartimento Farmaceutico, dal Dipartimento di Fisica e dal Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio dell'Università di Parma, dal Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena e le risorse del Pharmaceutical Department della Northeastern University di Boston, MA, USA.

3.1. Materiali

La lecitina LIPOIDS45 (lotto n° 745260-3) è stata ottenuta dalla LIPOID AG (Cham, Svizzera).

Il chitosano è il prodotto ChitoClear[®] acquistato dalla PRIMEX (Siglufjordur, Islanda). Il lotto TM-1874 utilizzato ha chitosano con grado di deacetilazione 95% e viscosità di 103cPs all'1% (p/p) in acido acetico.

Il tamoxifene citrato (PLANTEX LTD. Netanya, Israele) ed il mannitolo sono stati gentilmente forniti da Lisapharma S.p.A. (Erba, CO, Italia).

Le β -ciclodestrine sono state procurate da Roquette (Lestrem, Francia).

L'acido fosfotungstico è stato acquistato da Carlo Erba S.p.A. (Milano, Italia).

L'acetato di uranile è stato comprato dalla Fluka (Buchs, Svizzera).

Paclitaxel (>99%), (\pm)- α -Tocoferolo (Vitamina E) (\geq 96.0%), fluoresceinisotiocianato(FITC)-dextrano4400Da coniugato, bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) e Hoechst 33342 sono stati ottenuti da Sigma Chem., Inc. (St. Louis, MO, USA).

1,2-Distearoil-*sn*-Glicero-3-fosfoetanolamin-N-[metossi(polietilenglicol)-2000] (PEG2000-PE), fosfatidiletanolamina lissamina rhodamina B (Rh-PE), 1-oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzossadiazol-4-il)amino]hesanoil]-3-trimetilammonio propano dioleoiltrimetilammoniopropano (DOTAP), fosfatidilcolina da uovo (eggPC), colesterolo (Chol), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DPPC) (soluzioni in cloroformio) e 1,2-Distearoil-*sn*-Glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerolo)] (sale sodico) (DSPG) sono state acquistate da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA).

TAT-peptide (TATp) (11 residui: TyrGlyArgLysLysArgArgGln-ArgArgArg, peso molecolare 1560Da) è stato preparato dalla Research Genetics (Huntsville, AL, USA).

Soluzioni madre in cloroformio di DSPE-PEG1000-TATp e di DSPE-PEG3400-TATp sono state preparate alla Northeastern University (Boston, MA, USA) secondo le procedure pubblicate [103].

I fluorocromi Annexina V-FITC coniugato e ioduro di propidio (PI) sono stati forniti con il Kit n.3 *Vybrant*® *Apoptosis Assay* della Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

N-(fluorescein-5-tiocarbamoil)-1,2-diesadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, sale di trimetilammonio (Fluoresceina-DHPE) è stata comprata dalla Invitrogen (Milano, Italia).

Tutti gli altri reattivi chimici, soluzioni tampone e solventi sono stati forniti dalla Sigma Sigma Chem., Inc. (St. Louis, MO, USA) o dalla Carlo Erba S.p.A. (Milano, Italia) e sono di grado analitico o, quando richiesto, per HPLC.

Acque distillata e deionizzata sono state utilizzate per tutti gli esperimenti.

3.2. Preparazione delle nanoparticelle di lecitina/chitosano (NLC)

3.2.1. Soluzione di lecitina

La lecitina è stata sciolta in quantità di 25mg/ml in metanolo, mediante sonicazione fino ad ottenimento di una soluzione limpida.

3.2.2. Soluzione di chitosano

Il chitosano è stato sciolto in quantità di 10mg/ml in una soluzione di HCl all'1% p/V. La soluzione è stata mantenuta in agitazione per circa 24 ore per permettere una completa dissoluzione del polimero. La soluzione così ottenuta è stata conservata a 4°C fino all'utilizzo.

3.2.3. Formazione delle nanoparticelle di lecitina/chitosano (NLC)

Le nanoparticelle di lecitina e chitosano (in rapporto in peso 20:1) sono preparate con il metodo di iniezione del solvente organico nella soluzione acquosa.

Il metodo è estremamente semplice e veloce: la soluzione di chitosano all'1% viene appropriatamente diluita, fino ad una concentrazione di chitosano finale di 0,1mg/ml, con acqua distillata ed a questa è aggiunta la soluzione organica di lecitina in metanolo (la concentrazione finale di lecitina nella preparazione è di 2mg/ml), tramite un sistema di iniezione automatico (Model 200, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA) con una siringa di plastica di diametro 28,6mm il cui stantuffo è sospinto da un motore; la siringa è collegata tramite un tubo di gomma siliconata ad un iniettore di vetro con ugello da 0,5mm. In questo modo vengono controllati automaticamente sia la velocità (40ml/min) sia il volume di iniezione.

Durante la fase di iniezione di lecitina, la soluzione di chitosano diluita è stata mantenuta in agitazione tramite agitatore ULTRA-TURRAX[®] T25 basic (IKA Labortechnik, Staufen, Germania) equipaggiato con testa 10N avente diametro pari a 10 mm e velocità fissata a 11000rpm (figura10).

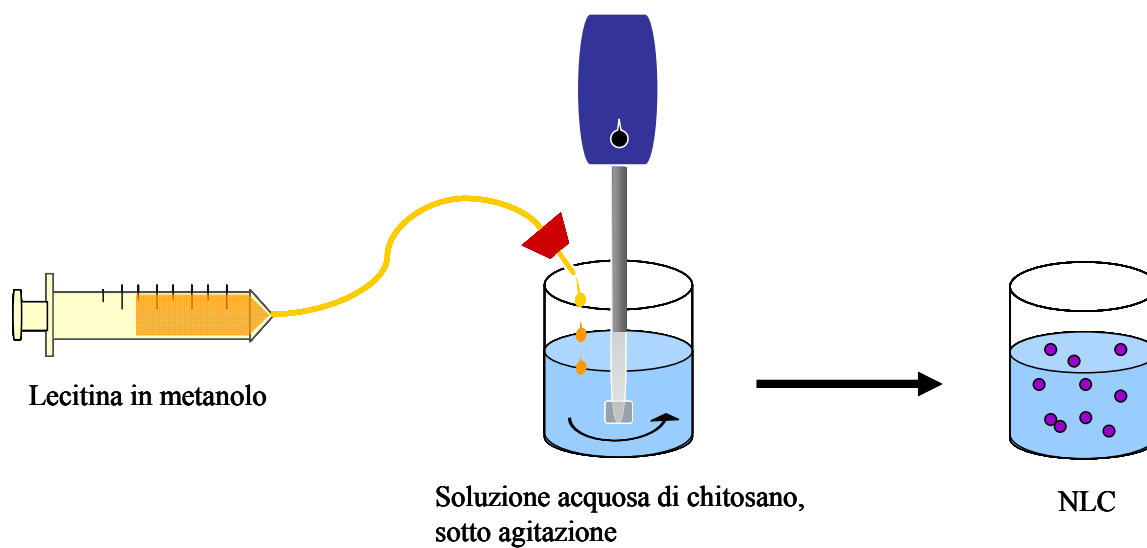


Figura10. Schema della produzione dei nanosistemi lecitina/chitosano (NLC).

La produzione di NLC caricate con il farmaco segue esattamente lo stesso procedimento, sciogliendo il farmaco nella porzione organica, cioè nella soluzione metanolica di lecitina. Qualora una marcatura fluorescente fosse richiesta, il fluorocromo fluoresceina-DHPE è stato sciolto in metanolo puro (2,5mg/ml) ed aggiunto alla soluzione metanolica di lecitina (con o senza TAM) in quantità dell'1% (p/p) rispetto alla quantità di lecitina. Sono stati anche prodotti liposomi di sola lecitina e liposomi di lecitina caricati con il TAM, sempre secondo la procedura sopradescritta, ma senza aggiungere il chitosano.

Tutti i solventi utilizzati per la preparazione delle nanoparticelle sono stati filtrati con filtri di cellulosa rigenerata da 0,45 μ m (Albet[®], Barcellona, Spagna).

3.3. Preparazione dei liposomi

I liposomi sono stati preparati con la tecnica del film sottile: tutti i componenti della formulazione (lipidi così come il farmaco) sono stati aggiunti e mescolati in un palloncino. Per la produzione di liposomi funzionalizzati, alla miscela iniziale dei componenti sono stati aggiunti TATp-PEG1000-PE o TATp-PEG3400-PE in quantità del 2,5% molare sul totale dei lipidi. Nella preparazione di liposomi contenenti DOTAP (dioleoiltrimetilammonio propano), quest'ultimo è stato aggiunto in quantità del 10% molare sul totale dei lipidi.

I solventi organici sono stati eliminati tramite evaporatore rotante ed il film così ottenuto è stato liofilizzato tutta la notte per eliminare i residui di solvente organico. Il film è stato poi reidratato per 10 minuti a 37°C, con tampone fosfato PBS a pH=7,4. Qualora un caricamento dei liposomi con il fluorocromo FITC-destrano4400 fosse necessario, quest'ultimo è stato aggiunto come componente alla soluzione acquosa di reidratazione in concentrazione di 10mg/ml. La quantità di FITC-destrano libera è stata successivamente rimossa tramite dialisi con membrane di cellulosa rigenerata Spectra/Por[®] (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) con cut off molecolare di 12000Da e il campione è stato dializzato per 24 ore contro un largo eccesso di tampone fosfato.

La miscela è stata agitata meccanicamente con apparecchio vortex per 1 minuto e sonicata in bagno a ultrasuoni a temperatura ambiente per 15 minuti. La sospensione ottenuta è stata estrusa 10 volte con il Mini-Extruder della Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), usando una membrana in policarbonato con diametro dei pori di 200nm.

La concentrazione finale dei lipidi ottenuta in tutte le preparazioni è di 2mg/ml.

Il filtrato è stato conservato in contenitori sotto argon e a 4°C fino al momento dell'uso. In alternativa i campioni di liposomi possono essere liofilizzati

congelandoli in azoto liquido e poi sublimando l'acqua in sistema sotto vuoto (Labconco, Kansas City, MO, USA; $p < 133 \times 10^{-3}$ mbar, temperatura condensatore $< -40^{\circ}\text{C}$). In seguito a liofilizzazione i campioni sono stati sigillati sotto argon e conservati a 4°C fino al momento dell'uso.

3.4. Preparazione delle micelle

Le micelle semplici (costituite solamente da PEG2000-PE) e le micelle miste (costituite da PEG2000-PE in combinazione con altri eccipienti) sono state preparate secondo il seguente metodo. Tutti i componenti della formulazione, sciolti in solvente organico, sono stati aggiunti e mescolati in palloncino ed il tutto è stato tirato a secco con evaporatore rotante per formare un film sottile di materiale. Per ottenere micelle caricate con il farmaco, PTX disciolto in metanolo è stato aggiunto agli altri componenti in soluzione organica. Qualora fosse richiesta una marcatura fluorescente, una quantità pari a 0,5% molare di Rh-PE è stata aggiunta alla composizione delle micelle.

Per la produzione di micelle funzionalizzate, alla miscela iniziale dei componenti sono è stato aggiunto TATp-PEG3400-PE in quantità del 2,5% molare sul polimero.

Il film così ottenuto è stato liofilizzato tutta la notte per rimuovere qualsiasi residuo di solvente organico. Il film secco è stato successivamente idratato con tampone HEPES (HBS). La concentrazione di PEG2000-PE normalmente utilizzata è stata di 5mM.

Il farmaco non incorporato è stato separato dalla sospensione delle micelle tramite filtrazione attraverso un filtro in policarbonato con pori di diametro di $0,2\mu\text{m}$ (Millipore Co., Bedford, MA, USA).

Il filtrato è stato conservato in contenitori sotto argon e a 4°C fino al momento dell'uso. In alternativa i campioni di liposomi possono essere liofilizzati congelandoli in azoto liquido e poi sublimando l'acqua in sistema sotto vuoto (Labconco, Kansas City, MO, USA; $p < 133 \times 10^{-3}$ mbar, temperatura condensatore $< -40^\circ\text{C}$). In seguito a liofilizzazione i campioni sono stati sigillati sotto argon e conservati a 4°C fino al momento dell'uso.

3.4.1. Determinazione della minima concentrazione micellare (CMC)

La CMC delle micelle semplici di solo PEG-PE è stata già calcolata precedentemente [104], mentre quella delle micelle miste costituite da PEG2000-PE/Vitamina E è stata determinata con il metodo del test del pirene, come riportato in [84]. Brevemente, tubi di vetro contenenti ciascuno 1mg di cristalli di pirene, molecola insolubile in solventi acquosi e fluorescente, sono stati preparati tirando a secco una soluzione di pirene in cloroformio. A questi cristalli sono state aggiunte aliquote di soluzione contenenti PEG2000-PE/Vitamine E in HBS, con PEG2000-PE in concentrazioni da 10^{-7} a 10^{-3} M.

Le miscele sono state incubate per 24 ore sotto agitazione a temperatura ambiente. Dove si formano le micelle, il pirene viene incapsulato e quindi solubilizzato. Il pirene non incorporato nelle micelle è stato rimosso per filtrazione con filtri in policarbonato con pori di diametro di $0,2\mu\text{m}$ (Millipore Co., Bedford, MA, USA).

La fluorescenza dei campioni filtrati è stata misurata alla lunghezza d'onda di eccitazione di 339nm ed alla lunghezza d'onda di emissione di 390nm, usando uno spettrofotometro a fluorescenza F-2000 (Hitachi, Tokyo, Giappone). Maggiore è l'intensità di fluorescenza delle soluzioni filtrate, maggiore è la quantità di pirene portato in soluzione dalle micelle formatesi. Il valore di CMC corrisponde al valore

di concentrazione del polimero a cui si è osserva un rapido aumento di intensità di fluorescenza.

3.5. Caratterizzazione chimico-fisica dei nanosistemi

3.5.1. Analisi dimensionale

La misura delle dimensioni dei nanosistemi studiati è stata effettuata con strumento Brookhaven ZetaPALS (Brookhaven Instrument Co., Holtsville, NY, USA), mediante Dinamic Light Scattering (DLS), che risulta essere ad oggi una delle tecniche più utilizzate per misurare le dimensioni delle particelle nella regione sub-micronica. Il DLS sfrutta il fenomeno della diffusione della luce e si basa sull'analisi della variazione nel tempo dell'intensità della luce rilevata ad un angolo fisso, solitamente 90°, a differenza della tecnica dello Static Light Scattering che analizza la luce diffusa da una particella a differenti angoli e che fa uso di una intensità mediata nel tempo della luce diffusa come funzione della concentrazione del campione.

I campioni sono stati diluiti fino ad ottenere un segnale di 100-500 Kcps, per evitare fenomeni interferenti di scattering multiplo, con acqua distillata e filtrata con filtri di acetato di cellulosa per siringa da 0,45 μm (Albet[®], Barcellona, Spagna).

Le analisi sono state ripetute su tre o più lotti dello stesso colloide.

3.5.2. Misura del Potenziale Zeta (ζ)

La carica superficiale delle particelle in un sistema colloidale è molto importante nel determinarne la stabilità ed il comportamento *in vivo*. Il Potenziale Zeta (ζ) è una misura della carica che una particella acquisisce in un particolare mezzo ed è

dipendente dal pH, dalla forza ionica e dalla concentrazione di un particolare componente. Secondo la teoria del doppio strato elettrico diffuso, l'intorno ionico di una particella è costituito da una regione più interna che include ioni legati in modo relativamente forte alla superficie e uno strato esterno, o diffuso, nel quale la distribuzione degli ioni è determinata da un equilibrio tra le forze elettrostatiche ed i movimenti termici. Il potenziale elettrico diminuisce all'aumentare della distanza dalla superficie particellare fino a raggiungere il valore della soluzione circostante, posto convenzionalmente uguale zero. Questo potenziale, presente alla superficie di taglio (ovvero la superficie teorica che racchiude anche gli ioni legati alla superficie della particella e che costituisce l'unità che si muove all'interno della soluzione) è detto Potenziale Zeta. Per misurare sperimentalmente ζ si utilizza la microelettroforesi: in un sistema disperso posto in un campo elettrico le particelle cariche si muoveranno verso il polo con carica opposta e la loro velocità di movimento dipenderà esclusivamente dal loro valore di potenziale zeta.

L'analisi del potenziale Z dei sistemi colloidali è stata realizzata sempre utilizzando lo strumento Brookhaven ZetaPALS, ma mantenendo i campioni nel mezzo di preparazione (ovvero senza diluirli) per non alterare l'intorno ionico delle nanoparticelle. Ciò è stato possibile sfruttando il Phase Analysis Light Scattering (PALS), avanzata tecnologia che permette misurazioni della mobilità e quindi di potenziale zeta anche in mezzi ad elevata conduttanza.

Le analisi sono state ripetute su tre o più lotti dello stesso colloide.

3.6. Determinazione quantitativa del paclitaxel in liposomi e micelle

La quantità di Paclitaxel incorporata in micelle e liposomi è stata misurata con analisi cromatografica a fase inversa [86]. Il sistema HPLC che è stato usato è D-7000 equipaggiato con diode array e un detector a fluorescenza (Hitachi, Tokyo,

Giappone), con colonna Spherisorb ODS2 4.6mm×250mm (Waters, Milford, MA, USA) ed i campioni sono stati eluiti con fase mobile composta da acetonitrile/acqua (60:40) a flusso di 1,0ml/min e volume di iniezione pari a 50µl. Il PTX è stato rilevato alla lunghezza d'onda di 227nm.

Il sistema cromatografico è stato convalidato seguendo i criteri di Ph. Eur. 6.0, fattore di scodamento, ripetibilità, linearità della risposta del segnale in funzione della concentrazione di paclitaxel e limite di quantificazione (0,05µg/ml).

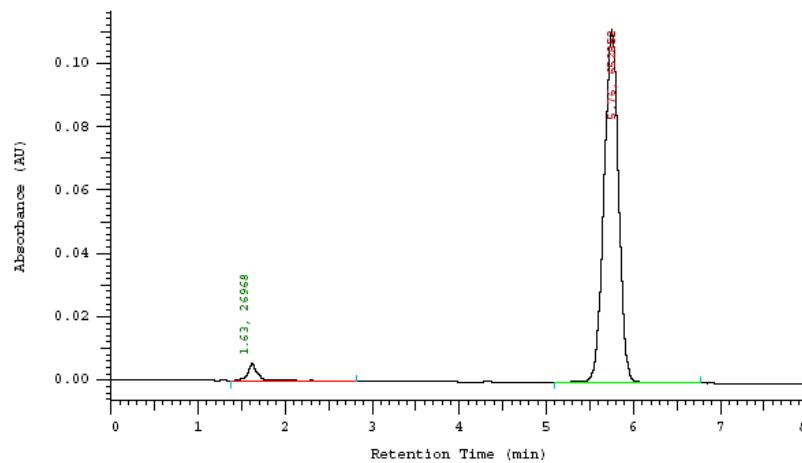


Figura11. Cromatogramma con picco di PTX (soluzione standard in fase mobile) a tempo di ritenzione di 5,7 minuti.

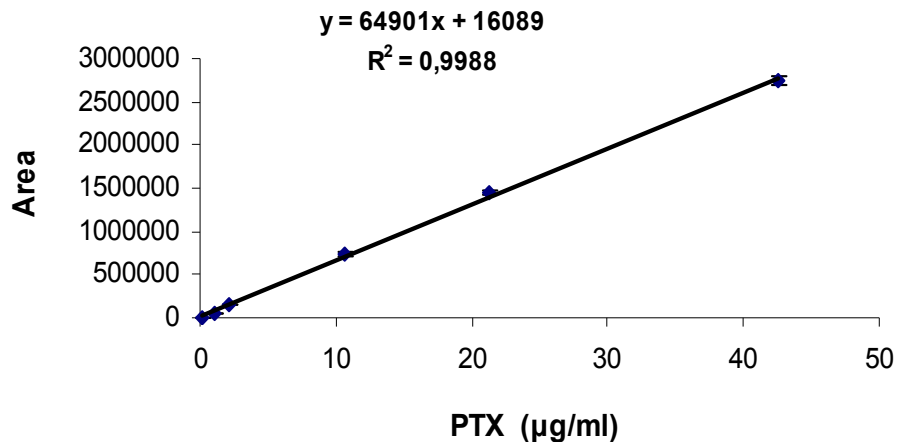


Figura12. Retta di taratura ottenuta con soluzioni standard di PTX in fase mobile a concentrazioni crescenti.

Il PTX è stato estratto da micelle e liposomi diluendo (1:20) una aliquota di campione con fase mobile, poiché la fase organica determina la rottura del sistema colloidale ed il rilascio del farmaco.

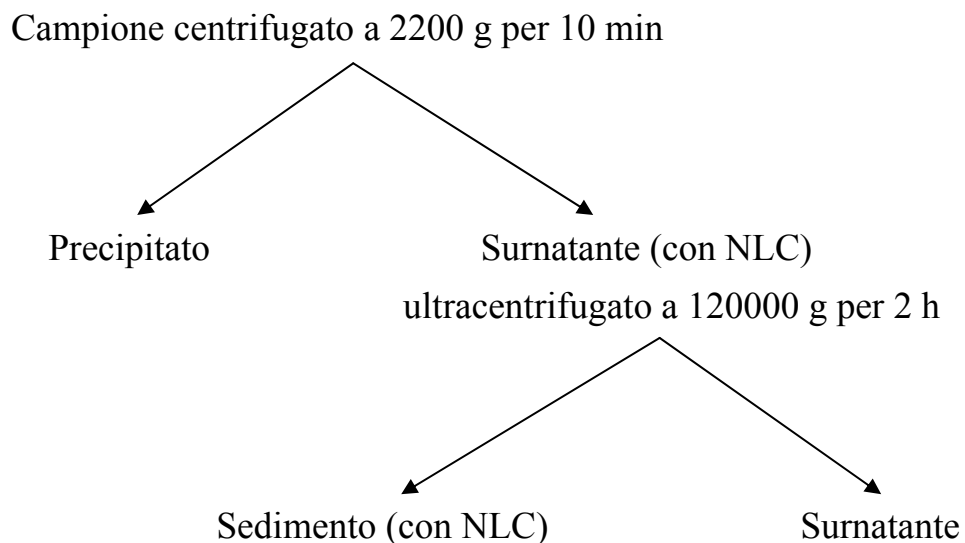
La quantità di farmaco incorporato è stata espressa come caricamento di PTX %, che corrisponde alla quantità di farmaco sulla quantità di polimero (per le micelle) o di lipidi (per i liposomi) espressa in percentuale.

Tutti i campioni sono stati analizzati almeno in triplicato.

3.7. Determinazione quantitativa del tamoxifene citrato in NLC

3.7.1. Preparazione dei campioni.

I campioni provenienti dai lotti di NLC sono stati centrifugati successivamente per separare prima il farmaco eventualmente precipitato dalle nanoparticelle e poi per separare le nanoparticelle dal farmaco non incapsulato e quindi in soluzione, nel seguente modo:



Con la prima centrifuga a 2200 g si determina la presenza o meno di farmaco cristallino precipitato, mentre con l'ultracentrifuga (DuPont Instruments-Sorvall, DuPont Co., Newtown, CN, USA) si separa il sedimento costituito dalle NLC, contenenti il farmaco incapsulato, dal surnatante contenente il farmaco disciolto. Così è stata calcolata l'efficienza di incapsulamento ed il caricamento del tamoxifene citrato nelle nanoparticelle.

I precipitati sono stati liofilizzati, per determinarne il peso, e successivamente disciolti con metanolo per estrarre il farmaco sonicando per 30 min, per determinare il caricamento del farmaco nelle nanoparticelle secche.

Ogni analisi è stata ripetuta almeno tre volte.

3.7.2. Analisi del tamoxifene citrato

La determinazione quantitativa del farmaco precipitato, di quello in soluzione e della frazione contenuta nelle NLC è stata effettuata tramite analisi HPLC. Il sistema cromatografico utilizzato è quello indicato in Eur. Ph. 6.0 per il tamoxifene citrato:

- Colonna: RPC18, 4.6 x 250mm, 5 μ m
- Fase mobile: 0,9 g/L di NaH₂PO₄*2H₂O e N,N-dimetilottilammina in acqua / Acetonitrile (60:40), il tutto portato a pH = 3,0
- Flusso eluente: 1.2ml/min
- Detector: U.V. a λ = 240nm
- Volume di iniezione: 10 μ l

Da queste analisi sono stati calcolati due parametri: l'efficienza di incapsulamento e la quantità di TAM sul sedimento secco, in valori percentuali:

$$\text{EI \% (Efficienza di incapsulamento)} = \frac{\text{Quantità di farmaco nel sedimento di NLC-TAM}}{\text{Quantità totale di farmaco aggiunto alla preparazione}} \times 100$$

$$\text{Quantità di TAM sul sedimento secco \%} = \frac{\text{Quantità di farmaco nel sedimento di NLC-TAM}}{\text{Peso del sedimento secco di NLC-TAM}} \times 100$$

L'analisi HPLC è stata anche utilizzata per effettuare il titolo delle polveri ottenute dalle NLC, la stabilità dei lotti di NLC-TAM e delle polveri e per misurare la quantità di farmaco liberato dalle NLC e dalle polveri negli studi di rilascio.

3.8. Caratterizzazione calorimetrica e morfologica del sistema NLC-TAM

Per avere informazioni sulla struttura delle nanoparticelle sono state condotte misurazioni di Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC), Microscopia a Forza Atomica (AFM), Microscopia a Trasmissione di Elettroni classica (TEM) e su campioni congelati (Crio-TEM).

Mentre AFM e SEM danno solo un'immagine della superficie del campione, le tecniche di TEM e cryo-TEM forniscono anche una visione della struttura interna.

3.8.1. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

La DSC è una tecnica usata per studiare le transizioni termiche di materiali organici ed inorganici. Tramite DSC si misura la differenza tra i flussi termici nel campione e in un riferimento inerte, cioè che non subisce alcuna variazione durante il processo, mentre entrambi sono sottoposti ad un programma controllato di variazione della temperatura in funzione del tempo. Le curve DSC riflettono le variazioni energetiche che avvengono nel materiale esaminato. Le variazioni strutturali che avvengono nel campione sono accompagnate da effetti energetici che sono trasformati in grafici caratteristici per transizioni vetrose, fusioni e cristallizzazioni. L'interazione fra due o più componenti può essere evidenziata da cambiamenti nel profilo della curva DSC rispetto ai grafici delle sostanze pure.

Le misurazioni con strumento DSC (DSC821^e METTLER TOLEDO, Columbus, OH, USA) sono state condotte sui sedimenti di NLC ottenuti mediante ultracentrifugazione e successiva liofilizzazione. Le condizioni operative sono state le seguenti:

- intervallo di temperatura = da 25 a 180-200°C
- velocità di riscaldamento = 5 o 10°C/minuto
- gas = azoto

3.8.2. Microscopia a Forza Atomica (AFM)

La AFM permette di effettuare analisi non distruttive di superfici, con una risoluzione inferiore al nanometro. Consiste di una microleva (cantilever) alla cui estremità è montata una punta (tip), tipicamente composta di silicio o nitruro di silicio. Questa punta esplora la superficie da analizzare, a contatto (modalità

operativa “contact”) o a brevissima distanza (“non contact” o “tapping”) da essa. Interagendo con gli atomi del campione, il cantilever subisce microscopiche deflessioni che, rilevate attraverso un dispositivo laser molto sensibile, vengono tradotte in una immagine topografica della superficie del campione.

Nel funzionamento “contact” la punta è in contatto con la superficie e la forza agente tra la punta e la superficie campione viene mantenuta costante durante la scansione. Nella modalità “in assenza di contatto” o “tapping”, la microleva viene fatta oscillare alla sua frequenza di risonanza. L’oscillazione viene modificata dalle forze di interazione tra la punta e la superficie campione e queste variazioni dell’oscillazione forniscono informazioni riguardo le caratteristiche del campione. La modalità “tapping” è utilizzata per campioni delicati o umidi.

Per l’analisi AFM i campioni di NLC sono stati diluiti appropriatamente con acqua distillata e filtrata, depositate poche gocce su uno strato di mica attaccato ad un supporto metallico specifico per la cella AFM e lasciate asciugare in essiccatore per una notte. La scansione della superficie del campione è stata effettuata in modalità “tapping”. Lo strumento che è stato utilizzato è Nanoscope III (Veeco, Woodbury, NY, USA).

3.8.3. Microscopia a trasmissione di elettroni (TEM e cryo-TEM)

I microscopi ottici convenzionali utilizzano una serie di lenti di vetro per curvare le onde della luce visibile e creare una immagine ingrandita. I microscopi elettronici invece usano un fascio di elettroni ad alta energia per esaminare oggetti in scala molto piccola (nanometri) ed ottenere informazioni su struttura e composizione.

La microscopia a trasmissione di elettroni utilizza un fascio di elettroni per vedere “attraverso” il campione. Tramite una sorgente si genera un flusso di elettroni che è accelerato verso il campione, il tutto sotto vuoto. Il fascio viene selezionato e

focalizzato tramite aperture e lenti in un fascio monocromatico sul campione. Le interazioni che avvengono con il fascio nel campione sono quelle che, raccolte ed elaborate, danno le informazioni richieste. Nella TEM si raccolgono gli elettroni non diffusi, che sono quelli che vengono trasmessi attraverso il campione senza alcuna interazione con lo stesso.

Per l'analisi TEM i campioni di NLC sono stati trattati nel seguente modo: diluiti appropriatamente con acqua distillata e filtrata al momento della preparazione, è stata deposta una goccia su retino di rame ricoperto con film polimerico (Formavar/Carbon 300 mesh Cu, Agar Scientific Ltd, Stansted, Inghilterra) per 30-60 sec; l'eccesso è stato asciugato con carta da filtro ed è stata deposta una goccia di agente di contrasto (acido fosfotungstico soluzione acquosa al 2% p/V o acetato di uranile soluzione acquosa al 2% p/V) lasciata reagire per 20 secondi (acido fosfotungstico) o 1-2 minuti (acetato di uranile) e asciugato l'eccesso con carta da filtro e lavato successivamente per due volte con acqua distillata e filtrata; il retino è lasciato asciugare su carta da filtro per circa 30 minuti. Lo strumento utilizzato è un Philips EM208 S (Eindhoven, Paesi Bassi).

La tecnica cryo-TEM, invece, permette di osservare i campioni nel loro ambiente liquido, che è molto vantaggioso poiché la morfologia o la struttura del campione possono dipendere da questo, senza alterazioni quindi dovute a processi di essiccamento o fissazione con agenti di contrasto. Gli oggetti vengono osservati a bassa temperatura fissati in ghiaccio vitreo ottenuto tramite rapido congelamento di un sottile film della sospensione originale.

Per le analisi cryo-TEM è stato utilizzato lo strumento Philips CM120 (Eindhoven, Paesi Bassi).

3.9. Determinazione quantitativa del chitosano

Per dosare il chitosano presente in soluzione alla fine del processo di formazione delle nanoparticelle (con e senza il farmaco) è stato utilizzato un saggio colorimetrico come descritto in [105] che sfrutta l'interazione tra gli amino-gruppi carichi positivamente del chitosano e i coloranti anionici. Come colorante anionico è stato utilizzato il Cibacron brilliant red 3B-A (Sigma, St. Louis, MO, USA), anche conosciuto come Reactive Red 4. Inizialmente è stata preparata una soluzione in acqua distillata con concentrazione 1,50 mg/ml. Una aliquota di questa soluzione madre è stata diluita con un tampone di glicina cloruro 0,1 M fino ad una concentrazione finale del colorante di 75 µg/ml.

La soluzione standard di chitosano è stata preparata in HCl 1% p/v con una concentrazione finale di 500 µg/ml. Da questa soluzione madre sono state effettuate le diluizioni per ottenere la retta di taratura. Ad una aliquota costante di colorante (9ml) sono state addizionate quantità crescenti di chitosano (per ottenere concentrazioni finali di chitosano comprese tra 1 e 50µg/ml).

La reazione fra chitosano e colorante dà un picco massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 581 nm a 20°C. Dal momento che si è visto che esisteva una interferenza sinergica nel segnale quando era presente anche il tamoxifene, dovuta ad una interazione fra quest'ultimo ed il chitosano, il metodo è stato opportunamente modificato. Sono così state fatte diverse rette di taratura con concentrazioni crescenti di tamoxifene citrato.

Le preparazioni di NLC senza farmaco e NLC-TAM con diverse concentrazioni di farmaco sono stati ultracentrifugati a 120000g per 2 ore, in modo tale da ottenere un sedimento contenente le nanoparticelle ed un surnatante contenente tutti i componenti che sono in soluzione. Sul surnatante è stata poi effettuata l'analisi per dosare il chitosano in soluzione.

3.10. Produzione delle polveri a partire dai nanosistemi NLC

A partire dalle preparazioni colloidali studiate a base di lecitina e chitosano contenenti tamoxifene citrato sono state prodotte polveri mediante due tecniche di essiccamento: la liofilizzazione e lo spray-drying.

3.10.1. Liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo tecnologico che prevede l'allontanamento dell'acqua presente in una matrice (e che è passata allo stato solido dopo rapido congelamento) tramite sublimazione. Questo è possibile poiché si lavora a temperatura e pressione molto basse. E' consigliabile un congelamento rapido poiché uno lento produce cristalli grandi che possono danneggiare la struttura del campione. Il vantaggio è appunto che si ottengono campioni essiccati, con una buona porosità senza che la struttura abbia subito alterazioni. In farmaceutica i liofilizzati sono molto sfruttati poiché sono stabili e facilmente conservabili, soprattutto per prodotti sterili per iniettabili.

Lo strumento utilizzato per la liofilizzazione è Modulyo (Edwards High Vacuum, Crawley, Sussex, UK).

3.10.2. Spray-Drying (S.D.)

Anche lo spray-drying è molto utilizzato in tecnica farmaceutica, permettendo di ottenere polveri secche a partire da soluzioni o sospensioni attraverso una rapida evaporazione del solvente. Il processo di spray-drying può essere suddiviso in quattro stadi principali:

- i. Atomizzazione della soluzione in gocce;
- ii. Miscelazione dello spray con l'aria calda circolante nella camera;
- iii. Evaporazione ed essiccamento della goccia;
- iv. Separazione delle particelle asciutte dal flusso d'aria.

Le microparticelle che vengono prodotte possono avere un'ampia varietà di morfologie (porose, a guscio, piene ecc.). Inizialmente, la particella va incontro ad una contrazione di volume dovuta all'evaporazione del solvente dalla superficie; nello stadio successivo (essiccamento) le particelle piene, subiscono un'ulteriore contrazione di volume, mentre quelle cave, in funzione della permeabilità dei solidi precipitati, danno origine a particelle sferiche cave oppure si rompono formando dei gusci.

Per la produzione delle nostre polveri è stato utilizzato il mini spray-drier Buchi 190 B[®] (BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Svizzera).

3.11. Caratterizzazione delle polveri prodotte da NLC

Sulle polveri ottenute da questi nanosistemi sono state condotte analisi morfologiche mediante Microscopia a Scansione di Elettroni (SEM), analisi dimensionale mediante diffrattometria laser, di contenuto d'acqua e perdita in peso mediante titolazione di Karl-Fisher e analisi termogravimetrica (TGA) e di contenuto in principio attivo mediante HPLC.

3.11.1. Microscopia a Scansione di Elettroni (SEM)

Nella microscopia a scansione di elettroni il fascio di elettroni incidenti non è fisso ma viene fatto passare su tutta la superficie del campione in sequenza. Il tutto avviene, salvo per strumenti particolari modificati per campioni biologici, sempre sotto vuoto. Per l'analisi si ricoprono i campioni con un sottile strato di carbonio o oro (processi di metallizzazione), per renderli conduttivi in modo omogeneo agli elettroni. Quando il fascio colpisce il campione vengono emessi, fra altri segnali, gli "elettroni secondari" prodotti dal passaggio di un elettrone primario, generato dalle fonte, molto vicino ad un atomo e che impartisce parte della sua energia ad altri elettroni ad energia minore, che lasciano l'atomo con energia cinetica molto bassa. Questi elettroni secondari vengono raccolti da un contatore che li converte in segnali, che vengono acquisiti ed elaborati da un sistema di generazione dell'immagine.

Le polveri analizzate sono state deposte su supporto bioadesivo fissato ad un vetrino e poi sono state metallizzate con carbonio o con oro con un film di spessore di 70 nm (High Resolution Sputter Coater SC7640, Thermo VG Scientific, Waltham, MA, USA). Il microscopio utilizzato è stato un SEM Jeol-6400 (Tokyo, Giappone).

3.11.2. Distribuzione dimensionale delle polveri spray-dried (S.D.)

Le analisi dimensionali delle polveri sono state effettuate con strumento Mastersizer (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) che si basa sulla tecnica della diffrazione laser, o meglio LALLS (Low Angle Laser Light Scattering): la luce prodotta da una sorgente viene diffratta da una particella con un angolo inversamente proporzionale alla sua dimensione. Come sorgente di luce è di solito

utilizzato un fascio laser a Elio/Neon. La luce diffratta viene registrata e il segnale rielaborato genera una distribuzione dimensionale in “diametro volume sferico equivalente”, ossia il diametro di una sfera volumetricamente equivalente alla particella analizzata.

Le polveri sono state sospese in un solvente adatto (cicloesano) saturato con lecitina. Il campione viene opportunamente diluito in questo solvente e mantenuto sotto costante agitazione magnetica. Questa sospensione è stata fatta passare nella cella di misura da 100 ml. L'analisi è stata effettuata utilizzando una lente da 45 mm (corrispondente al range di dimensioni di particelle tra 0,1 e 80 μm).

3.11.3. Contenuto d'acqua delle polveri S.D.

La reazione di Karl Fisher (K-F) è una titolazione il cui punto finale è generalmente rilevato automaticamente tramite un elettrodo. È un metodo molto sensibile capace di misurare il contenuto di acqua in liquidi e solidi da 10ppm fino al 100% di acqua. La reazione si basa sull'ossidazione dell'anidride solforosa ad opera dello iodio. La titolazione viene condotta in un solvente anidro, generalmente metanolo, in presenza di una base capace di neutralizzare l'acido solforico prodotto dalla reazione e di creare una soluzione tampone che stabilizzi il pH su valori ottimali per lo svolgersi della reazione, compresi tra 5 e 7.

Tra i vantaggi della reazione di Karl Fischer rispetto alla misurazione del contenuto di acqua per essiccamento del campione in stufa rientrano la rapidità - pochi minuti contro qualche ora - e la specificità - solo l'acqua reagisce, non gli altri composti volatili eventualmente presenti nel campione.

Per l'analisi è stato utilizzato il titolatore chimico CRISON TitroMatic 1S (Barcellona, Spagna).

3.11.4. Perdita in peso delle polveri S.D.

Con l'analisi termogravimetrica (TGA) si effettua una determinazione delle variazioni di peso subite da un campione in funzione della temperatura e della atmosfera, reattiva o inerte, in cui viene effettuata l'analisi. Le variazioni in peso sono conseguenti a fenomeni di decomposizione, disidratazione, reazioni chimiche tra la fase gas e il solido, emissione di specie gassose a seguito di reazioni allo stato solido fra diverse fasi costituenti il campione.

Lo strumento utilizzato è TC15 TA Controller METTLER TOLEDO (Columbus, OH, USA), partendo da 25°C e arrivando a 150°C, con velocità di riscaldamento di 10°C al minuto e sotto flusso di azoto.

3.11.5. Titolo delle polveri S.D.

La determinazione del titolo (del contenuto in tamoxifene citrato) delle polveri ottenute mediante spray-drying è stata realizzata tramite analisi HPLC con metodo secondo Eur. Ph. 6.0, su tre aliquote di polvere diverse, sciogliendo la polvere in fase mobile e sonicando il tutto per 20 minuti.

3.12. Rilascio di farmaco dai nanosistemi NLC

Poiché la via di somministrazione prevista è quella orale, per testare il rilascio del tamoxifene citrato si è scelto come mezzo di dissoluzione il fluido gastrico simulato (senza pepsina) riportato in USP 30. Una aliquota di sospensione di NLC-TAM (600 e 1200µg/ml) è stata diluita con il mezzo di rilascio fino a raggiungere una concentrazione di farmaco pari a 0,01mg/ml (concentrazione uguale o inferiore al 25% della solubilità del farmaco). Nel caso delle polveri S.D. è stata pesata e

disciolta in SGF una quantità di polvere tale da ottenere una concentrazione corrispondente a quella dei sistemi colloidali diluiti.

I campioni sono stati messi in beute chiuse poste in bagno riscaldato a 37°C e sotto agitazione (Gyrotary® Water Bath Shaker Model G76, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Edison, NJ, USA). Sono stati effettuati prelievi a tempi determinati (15, 120, 360 e 1440 minuti) e per ogni prelievo è stato preparata una beuta contenente la stessa quantità di campione diluito. Le aliquote prelevate sono state centrifugate con particolari provette contenenti un setto ultrafiltrante (Vivaspin 2ml, Hydrosart®, membrana 30000 molecular weight cut-off, Sartorius, Italia). E' stato controllato se ci fosse un fenomeno di adsorbimento aspecifico del farmaco sui setti, utilizzando soluzioni a concentrazione nota di TAM. E' stato verificato che nel processo di ultrafiltrazione si ha un adsorbimento ai setti inferiore al 20%. L'ultrafiltrato, ottenuto con le provette Vivaspin dopo centrifuga a 2200 g per 5 minuti dei campioni, è stato analizzato con metodo analitico HPLC per il tamoxifeme citrato.

E' stata anche calcolata la solubilità del farmaco nel mezzo di dissoluzione a 37°C e a 20°C, creando una soluzione satura con corpo di fondo in agitazione per 2 ore e lasciata a riposo per 24 ore; il surnatante è stato poi prelevato, filtrato con filtri di acetato di cellulosa rigenerata da 0,45 µm (Albet®, Barcellona, Spagna) e analizzato tramite HPLC.

3.13. Colture cellulari

Le linee cellulari umane BT-20 (tumore della mammella recettore degli estrogeni-negativo), MCF-7 (tumore della mammella recettore degli estrogeni-positivo) e CACO2 (adenocarcinoma del colon) sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Il terreno di cultura utilizzato è il

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ad alta concentrazione di glucosio, arricchito con siero fetale bovino (FBS) al 10%, L-glutamina 2 mM, penicillina 50 UI/ml e streptomycin 50 µg/ml, acquistati da Cellgro (Hemdon, VA, USA).

Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25 o 75 cm² (BD Falcon™, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) alla temperatura di 37°C ed in atmosfera al 5% di CO₂. Alla confluenza, il mezzo di coltura è stato rimosso, le cellule sono state staccate dal recipiente con una soluzione di tripsina (0,05%) e Na-EDTA (0,53 mM) (Cellgro, Hemdon, VA, USA), incubate a 37°C per circa 5 minuti e risospese nel mezzo di coltura completo. Il numero delle cellule nella sospensione è stato valutato con una camera contaglobuli tipo Neubauer.

3.14. Saggio di citotossicità

Per testare la citotossicità delle formulazioni colloidali contenenti i farmaci antitumorali Paclitaxel e Tamoxifene citrato sono state selezionate le linee cellulari di tumore alla mammella umano BT-20 e MCF-7. Il Paclitaxel è stato testato su entrambe le linee, mentre il Tamoxifene citrato, svolgendo la propria azione antitumorale come antagonista ai recettori degli estrogeni, è stato testato solo sulle MCF-7, che sono positive ai recettori per gli estrogeni.

La sopravvivenza delle cellule è stata valutata con il metodo del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) [106]: è un metodo colorimetrico che si basa sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte delle deidrogenasi mitocondriali cellulari, nel formazano, un prodotto colore rosso mattone-viola, la cui quantità è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali, che a differenza di quelle morte, riducono i sali di tetrazolio.

Le cellule in crescita esponenziale sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (Corning, Inc., Corning, NY, USA) ad una densità di $3,5 \times 10^5$ cellule per piastra (per

il Paclitaxel) e $7,2 \times 10^5$ cellule per piastra (nel caso del Tamoxifene) ed incubate per 24 ore a 37°C al 5% di CO₂, per permettere l'adesione delle cellule alla piastra. Successivamente il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule sono state trattate con concentrazioni decrescenti di farmaco, diluito al 90% o più in terreno di coltura.

I sistemi colloidali contenenti i farmaci antitumorali sono stati confrontati anche con le stesse concentrazioni di farmaco libero (PTX e TAM sono state sciolte in metanolo e queste soluzioni madre sono state diluite in opportune concentrazioni con mezzo di coltura in modo da evitare che il solvente organico provocasse citotossicità).

Secondo il disegno sperimentale, nel caso delle micelle il campione è stato incubato per 72 ore con le cellule, mentre per i liposomi contenenti paclitaxel, dopo un periodo di incubazione con le cellule di 2 ore, il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lavate e lasciate per 72 ore a 37°C al 5% di CO₂ con mezzo fresco e privo di campione.

Per i test con il tamoxifene i campioni sono rimasti ad incubare con le cellule per 72 ore.

Al termine del periodo di incubazione, la percentuale di cellule vive è stata determinata tramite saggio colorimetrico: il mezzo vecchio è stato sostituito con mezzo fresco e 10µL di una soluzione di MTT (5mg/ml in PBS) è stato addizionato a ciascun pozzetto. Dopo 2-4 ore di incubazione a 37°C al 5% di CO₂ la formazione del derivato formazano insolubile è stata rilevata, dopo lavaggio delle cellule con PBS, con l'estrazione dello stesso con dimetilsolfossido e successiva lettura con ELISA reader (Labsystems Multiscan MCC/340, Labsystems, Helsinki, Finlandia) alla lunghezza d'onda di 550nm.

3.15. Captazione ed internalizzazione cellulare dei nanosistemi tramite citometria di flusso e microscopia a fluorescenza

Per verificare che questi veicoli colloidali riescano a penetrare nelle cellule e per valutarne l'entità e la cinetica di up-take cellulare, questi ultimi sono stati resi fluorescenti per una analisi al microscopio a fluorescenza o tramite analisi multiparametrica con la citometria di flusso [107,108].

Il microscopio a fluorescenza in generale serve per osservare preparati naturalmente fluorescenti, o legati con molecole fluorescenti o rese tali da particolari coloranti detti fluorocromi. Questi composti vanno selettivamente a legarsi con strutture cellulari definite (nucleo, mitocondri, vacuoli citoplasmatici, etc...). La sorgente luminosa, che trasmette radiazioni ultraviolette o di bassa lunghezza d'onda nel visibile, eccita il preparato e le componenti fluorescenti del preparato emettono luce di lunghezza d'onda maggiore.

Nell'osservazione è fondamentale l'utilizzo corretto dei filtri ottici per selezionare la giusta lunghezza d'onda di eccitazione e la giusta lunghezza d'onda di emissione visibile per evidenziare le diverse molecole fluorescenti.

La citometria di flusso è una avanzata tecnica utilizzata per contare, esaminare ed ordinare miscele complesse di cellule. Permette una analisi simultanea multiparametrica statistica delle caratteristiche chimico-fisiche delle singole cellule. Le cellule sono fatte passare in un capillare singolarmente, vengono colpite da un raggio laser e la luce diffusa e quella fluorescente vengono raccolte da detector posizionati perpendicolarmente e in linea con il fascio. I segnali raccolti vengono amplificati e trasformati in informazioni sulle dimensioni e granulosità (dalla luce diffratta e trasmessa) ed intensità di fluorescenza delle cellule, se marcate con uno o più fluorocromi.

Per questi esperimenti sono stati impiegati liposomi marcati con FITC-dextrano4400 (incapsulato nel core acquoso dei liposomi), micelle marcate con Rhodamina-PE e sistemi NLC marcati con Fluoresceina-DHPE (i fluorocromi legati al fosfolipide sono ancorati al nanosistema, essendo incorporati nella struttura).

Per l'internalizzazione di liposomi e micelle (per cui è prevista una somministrazione endovenosa) è stata selezionata la linea cellulare BT-20 del tumore umano alla mammella, che è un potenziale bersaglio. Le cellule ($1,0-2,5 \times 10^5$) sono state mantenute in sospensione in una soluzione di albumina all'1% in PBS e sotto agitazione a 37°C; alternativamente le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti ($1,5 \times 10^6$ per piastra), sia in mezzo culturale senza siero fetale bovino sia in DMEM completo (per verificare se il siero interferisse nel processo di up-take), a 37°C al 5% di CO₂. Le cellule sono state incubate al buio con i sistemi colloidali fluorescenti (diluiti 1:10 nel mezzo di incubazione) per diversi tempi. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate tre volte con tampone PBS, raccolte o distaccate dalla piastra con tripsina e fissate con una soluzione di formaldeide al 2% (v/v) in PBS.

I campioni sono stati analizzati successivamente tramite citometria di flusso usando lo strumento FACSCalibur, Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) equipaggiato con raggio laser di Argon a 488nm. L'acquisizione dei dati è stata fissata a 20000 eventi per campione e l'elaborazione è stata effettuata col software Cell Quest ProTM (Becton Dickinson, NJ, USA).

Per lo studio dell'internalizzazione dei nanosistemi lecitina/chitosano NLC sono invece state scelte le cellule di adenocarcinoma del colon umano CACO2, essendo prevista una somministrazione orale.

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti, con una densità di $1,2 \times 10^6$ cellule per piastra, e lasciate in incubatore a 37°C ed al 5% di CO_2 per 48 ore. Al 1° giorno dopo la semina è stato effettuato un cambio del mezzo di coltura e al 2° giorno della semina le cellule sono state incubate con i sistemi colloidali fluorescenti, diluiti 1:100 con terreno di coltura DMEM senza FBS e per diversi tempi (1, 3, 6, 8 e 24 ore), sia a 37°C al 5% di CO_2 sia a 4°C (senza CO_2). CACO2 incubate per gli stessi tempi con NLC senza farmaco e NLC-TAM600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ non marcati con Fluoresceina-DHPE ed alle stesse concentrazioni sono state utilizzate come controllo. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate tre volte con tampone PBS, distaccate con tripsina e analizzate immediatamente non fissate al citofluorimetro COULTER® EPICS® XL™, Beckman Coulter Inc. (Milano, Italia), equipaggiato con raggio laser di Argon a 488nm. L'acquisizione dei dati è stata fissata a 20000 per campione e l'elaborazione è stata effettuata con software EXPO32 ADC.

Per individuare dove fossero localizzati i nanosistemi nelle cellule CACO2 sono state anche acquisite immagini al microscopio a fluorescenza dei campioni incubati con CACO2 per 24 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 . La procedura seguita è stata la stessa utilizzata per l'analisi al citofluorimetro, con la differenza che al termine dell'incubazione e dopo i lavaggi con PBS, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo ulteriori lavaggi con PBS, le cellule sono state incubate per 12 minuti a 37°C con una soluzione 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS di Hoechst 33342 (molecola fluorescente che si lega specificatamente al nucleo delle cellule, evidenziandolo) e quindi osservate con un microscopio a fluorescenza Zeiss Axioscope 40 (Carl Zeiss S.p.A., Milano, Italia), accessorio di camera digitale AxioCam e AxioVision software (Carl Zeiss S.p.A., Milano, Italia).

3.16. Determinazione del grado di apoptosi cellulare con il test della Fluoresceinisotiocianato-Annexina V e ioduro di propile

L'apoptosi è una forma di morte programmata della cellula e coinvolge una serie di eventi biochimici che portano alla caratteristica morfologia cellulare e morte: formazione di vacuoli, cambiamenti nelle caratteristiche delle cellule vitali quali perdita dell'asimmetria e dell'adesione, perdita della continuità della membrana, frammentazione nucleare, etc...

In contrasto con la necrosi, che è una forma di morte traumatica della cellula in seguito ad un insulto acuto, l'apoptosi generalmente conferisce vantaggi durante il ciclo vitale di un organismo. Una eccessiva apoptosi, però, può causare *ipotrofia*, mentre una insufficienza della stessa provoca una proliferazione incontrollata, come nel *morbo di Alzheimer* e nel *cancro*.

In seguito a stimolazione con farmaci antitumorali generalmente le cellule entrano in apoptosi.

Per studiare l'apoptosi cellulare indotta dal farmaco Paclitaxel incapsulato in liposomi (semplici e funzionalizzati con TATp), è stato utilizzato un kit specifico per rilevare e distinguere i diversi tipi di morte cellulare con una doppia marcatura fluorescente, tramite citometria di flusso [109,110]. I due fluorocromi utilizzati sono la fluoresceinisotiocianato (FITC) coinugata con l'Annexina V e lo ioduro di propidio (PI). L'Annexina V è una molecola che possiede una alta affinità per legare la fosfatidilserina (PS), che normalmente è localizzata sulla superficie citoplasmatica delle cellule sane. Tuttavia, nelle cellule apoptotiche la PS viene traslocata dal lato interno a quello esterno della membrana plasmatica ed esposta all'ambiente esterno alla cellula.

Lo ioduro di propile è un fluorocromo che si lega agli acidi nucleici delle cellule, ma è in grado di marcare solo il nucleo delle cellule con la membrana compromessa e che sono in uno stadio avanzato di morte. Le cellule vive sono impermeabili al PI.

In questo test, le cellule che risultano positive all'Annexina V-FITC (fluorescenza verde) sono considerate in apoptosi iniziale, le cellule positive al PI (fluorescenza rossa) sono considerate necrotiche e quelle positive sia all'Annexina V-FITC sia al PI sono considerate in apoptosi avanzata.

Le BT-20 seminate in piastre da 6 pozzetti ($6,0 \times 10^5$ per piastra) e lasciate in incubatore per 24 ore, sono state trattate con liposomi caricati con PTX (PTX alla concentrazione finale in DMEM completo di $1,5 \mu\text{g/ml}$) e dopo 2 ore le cellule sono state lavate con mezzo di coltura e incubate con terreno fresco senza campioni per diversi tempi (8, 12, 24, 48 e 72 ore), per seguire l'andamento del grado di apoptosi.

Al termine dell'incubazione, le cellule sono state trattate come da protocollo fornito con il kit: sono state lavate con PBS freddo e risospese in $100 \mu\text{L}$ di Annexina Binding Buffer (10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 5mM CaCl_2), un tampone specifico per la concentrazione ionica poiché il legame della Annexina V con la PS è un legame Ca^{2+} dipendente. Sono stati aggiunti $5 \mu\text{L}$ di Annexina V-FITC ad ogni sospensione di cellule da $100 \mu\text{L}$, insieme con una quantità appropriata di indicatore di morte cellulare come il PI ($0,1 \mu\text{g}$). Dopo un tempo di incubazione di 5-15 minuti, sono stati addizionati $400 \mu\text{l}$ Annexina Binding Buffer, mescolando gentilmente e mantenendo i campioni in ghiaccio fino al momento delle analisi da effettuarsi il prima possibile al citometro di flusso.

3.17. Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il t-test di Student e le differenze tra i valori sono state considerate statisticamente significative per valori del coefficiente di significatività P minori di 0,05.

4. RISULTATI

4.1. Nanosistemi lecitina/chitosano NLC

La prima parte del lavoro ha riguardato lo studio e la caratterizzazione da un punto di vista chimico-fisico e morfologico del colloide costituito da lecitina e chitosano con incapsulato il tamoxifene citrato.

Successivamente si è posta l'attenzione sulla produzione di microparticelle dal sistema NLC per produrre una polvere utilizzabile per forme di dosaggio solide ai fini di una somministrazione orale.

4.1.1. Caratterizzazione dei sistemi NLC-TAM

Sono stati prodotti diversi lotti di nanoparticelle di lecitina/chitosano in rapporto 20:1 (p/p) contenenti quantità crescenti di tamoxifene citrato, con concentrazioni da 50 a 1200 μ g/ml di farmaco totale introdotto nella preparazione. Su questi lotti sono stati determinati diversi parametri: distribuzione dimensionale, carica superficiale, efficienza di incapsulamento e caricamento di farmaco.

In figura13 sono rappresentati gli andamenti delle dimensioni, misurate come diametro idrodinamico medio, e del potenziale zeta (ζ), misura della carica superficiale del sistema, dei lotti di nanoparticelle con tamoxifene citrato (NLC-TAM) in funzione della quantità di farmaco aggiunta.

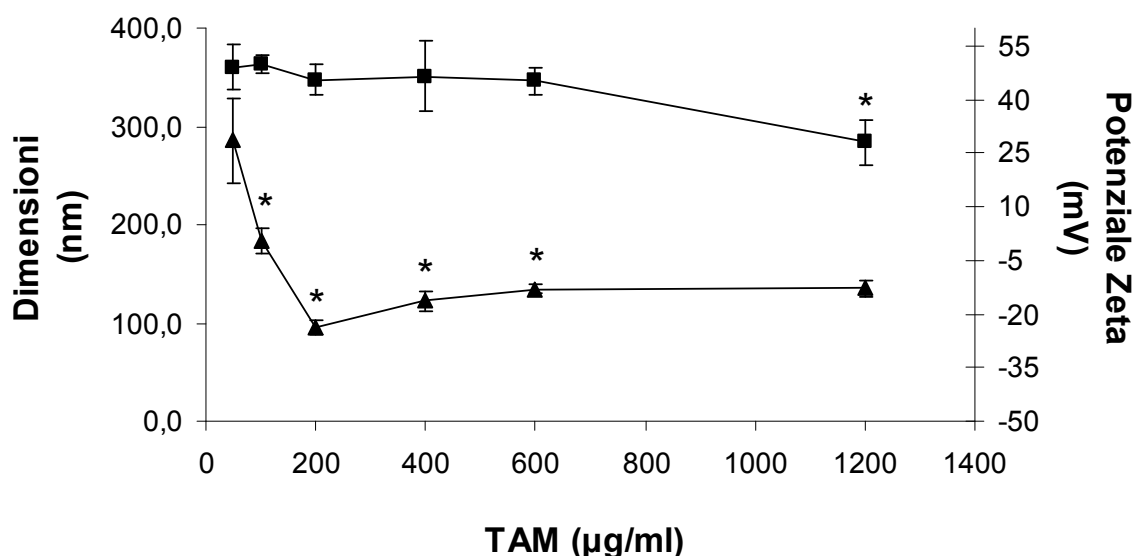


Figura13. Andamento delle dimensioni (—▲—) e del potenziale zeta (—■—) nei sistemi NLC-TAM ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard). L'asterisco contrassegna un valore statisticamente differente dal precedente.

Mentre il potenziale zeta rimane pressoché invariato, attorno ad un valore medio positivo stazionario di circa +45mV, le dimensioni hanno subito una notevole variazione all'aumentare della quantità di farmaco, diminuendo molto in un primo momento per poi attestarsi attorno ad un valore di circa 130nm (i valori scendono da $285,6 \pm 43,0$ nm a $135,3 \pm 8,5$ nm). Per tutte le sospensioni colloidali il valore di polidispersità è sempre stato inferiore al 20%.

All'aumentare della concentrazione del tamoxifene citrato nelle nanoparticelle di lecitina e chitosano, sono state anche determinate: l'efficienza di incapsulamento (percentuale di farmaco incapsulato rispetto al TAM totale aggiunto nella preparazione) e la percentuale di TAM nel sedimento secco (calcolata sul peso del sedimento ottenuto dalla ultracentrifugazione in seguito a ultracentrifugazione delle preparazioni NLC-TAM e successivamente liofilizzato) (tabella1).

Tabella1. Valori di efficienza di incapsulamento e percentuale di farmaco sul sedimento secco ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

<i>Preparazione</i>	<i>Efficienza di incapsulamento %</i>	<i>Quantità di TAM nel sedimento secco %</i>
NLC-TAM50 μ g/ml	81,29 \pm 2,14	2,4 \pm 0,16
NLC-TAM100 μ g/ml	73,82 \pm 4,49	4,49 \pm 0,02
NLC-TAM200 μ g/ml	57,35 \pm 3,61	9,76 \pm 1,12
NLC-TAM400 μ g/ml	65,22 \pm 4,05	15,86 \pm 1,1
NLC-TAM600 μ g/ml	57,03 \pm 1,82	18,9 \pm 0,85
NLC-TAM1200 μ g/ml	48,16 \pm 4,68	30,19 \pm 0,18

L'efficienza di incapsulamento diminuisce significativamente dall'80% al 50% circa. La percentuale di farmaco sul seimento, invece, aumenta costantemente fino ad valore di circa il 30%.

In figura14 è rappresentata la distribuzione del farmaco nel nanosistema, come farmaco precipitato, farmaco incapsulato e farmaco in soluzione: come si è già visto, al crescere della quantità di TAM aggiunto, la percentuale incapsulata diminuisce mentre quella in soluzione aumenta, fino a raggiungere un valore di circa il 50%. La frazione di farmaco precipitato al momento della formazione dei nanosistemi, invece, è del tutto trascurabile.

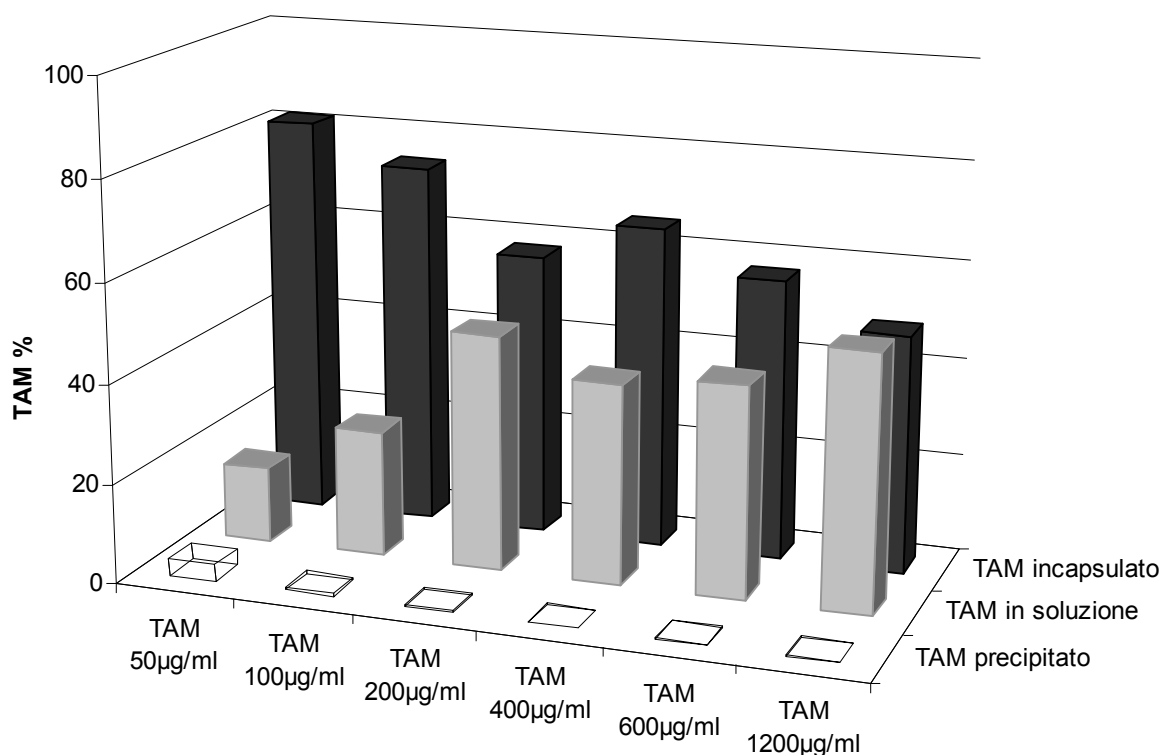


Figura14. Distribuzione del farmaco nel nanosistema NLC al variare della concentrazione.

Per capire più approfonditamente come il tamoxifene citrato influenza la struttura delle nanoparticelle di lecitina e chitosano, in primo luogo sono stati messi a confronto i sistemi NLC-TAM con sistemi colloidali più semplici, ovvero liposomi costituiti di sola lecitina e liposomi di lecitina contenenti il tamoxifene citrato. Il confronto è stato fatto sui valori di dimensioni e carica superficiale (tabella2).

Tabella2. Valori di dimensioni e carica superficiale dei nanosistemi di diversa composizione ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

<i>Preparazione</i>	<i>Dimensioni (nm)</i>	<i>Potenziale Zeta (mV)</i>
Liposomi (sola lecitina)	70,5 \pm 2,2	- 48,31 \pm 1,90
NLC (senza farmaco)	226,3 \pm 16,7	+ 44,59 \pm 2,32
NLC-TAM600 μ g/ml	134,6 \pm 4,7	+ 45,28 \pm 3,34
Liposomi-TAM600 μ g/ml	127,6 \pm 9,2	+ 34,52 \pm 1,60
NLC-TAM1200 μ g/ml	135,3 \pm 8,5	+ 27,98 \pm 6,48
Liposomi-TAM1200 μ g/ml	Flocculato	Flocculato

Si possono così fare diverse osservazioni: rispetto ai liposomi di sola lecitina, la presenza del chitosano nelle nanoparticelle non caricate col farmaco hanno portato ad un aumento considerevole delle dimensioni (oltre 3 volte) e ad una inversione del segno del potenziale zeta, ottenendo quindi NLC con carica superficiale opposta e positiva. Quando le nanoparticelle sono state preparate col farmaco, le dimensioni sono diminuite significativamente ($P \ll 0,05$) mentre il potenziale zeta non ha subito cambiamenti ($P \gg 0,05$). Inoltre, anche senza chitosano, i liposomi di lecitina caricati col farmaco hanno mostrato un aumento del diametro medio quasi del 100% rispetto ai liposomi di sola lecitina e soprattutto hanno acquistato una carica superficiale positiva. Questi valori sono molto simili a quelli dei sistemi NLC-TAM.

Le nanoparticelle caricate con il tamoxifene citrato presentano quindi caratteristiche diverse dalle nanoparticelle senza farmaco. E' interessante notare come il TAM produca una carica superficiale positiva anche sui liposomi di sola lecitina. Il tamoxifene citrato, infatti, porta nella struttura molecolare un gruppo amminico terziario sulla catena alifatica laterale che è protonato e quindi carico

positivamente: questo suggerisce la sua presenza sulla superficie dei liposomi di lecitina. La carica positiva del farmaco probabilmente crea una interazione elettrostatica con la lecitina, caricata negativamente, andando a competere con il chitosano, anch'esso carico positivamente e rimpiazzandolo almeno in parte poiché il diminuire delle dimensioni dei nanosistemi lecitina/chitosano (all'aumentare della quantità di tamoxifene) può significare minor coinvolgimento del chitosano nella struttura.

E' stato inoltre osservato che, mentre le preparazioni di nanoparticelle caricate con la massima quantità di farmaco (NLC-TAM1200 μ g/ml) rimanevano stabili, i liposomi-TAM1200 μ g/ml flocculavano subito dopo la preparazione. I liposomi-TAM600 μ g/ml, invece, non flocculano subito ma sono più instabili nel tempo, con formazione di aggregati, se paragonate alle corrispondenti formulazioni contenenti il chitosano.

Questo sottolinea chiaramente una funzione del chitosano come agente stabilizzante in questi colloidali.

4.1.2. Analisi calorimetrica e morfologica

E' stata fatta anche una caratterizzazione calorimetrica e morfologica tramite Calorimetria a Scansione Differenziale, microscopia a Forza Atomica e Microscopia a Trasmissione di Elettroni per avere maggiori informazioni sulla struttura dei nanosistemi NLC-TAM.

4.1.2.1. AFM

E' stata fatta una analisi delle immagini ottenute tramite AFM dai campioni essiccati, prendendo in considerazione la sezione trasversale. Le parti in rilievo rispetto alla linea di base (messe in evidenza anche dalle frecce rosse) corrispondono al profilo delle nanoparticelle. Le immagini mostrano che nelle formulazioni con la minor quantità di farmaco (NLC-TAM 50µg/ml) il profilo, ovvero l'altezza dei picchi (di circa 20nm), è molto simile alle NLC senza farmaco (figure15,16).

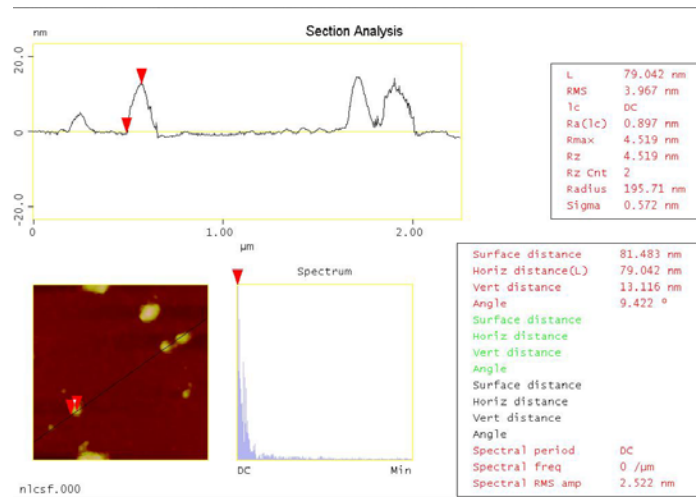


Figura15. NLC senza farmaco.

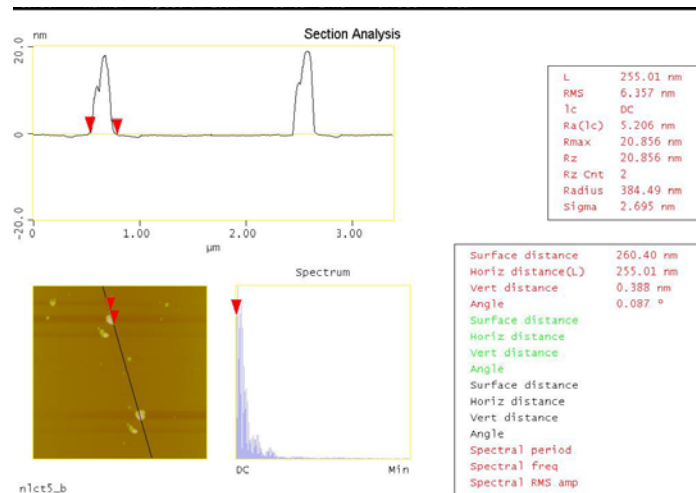


Figura16. NLC-TAM 50µg/ml.

Si inizia invece a vedere un cambiamento con l'aumentare della quantità di farmaco nelle preparazioni: è evidente una struttura più appiattita delle nanoparticelle contenenti il TAM200 e 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (figure17,18) rispetto alle NLC senza farmaco.

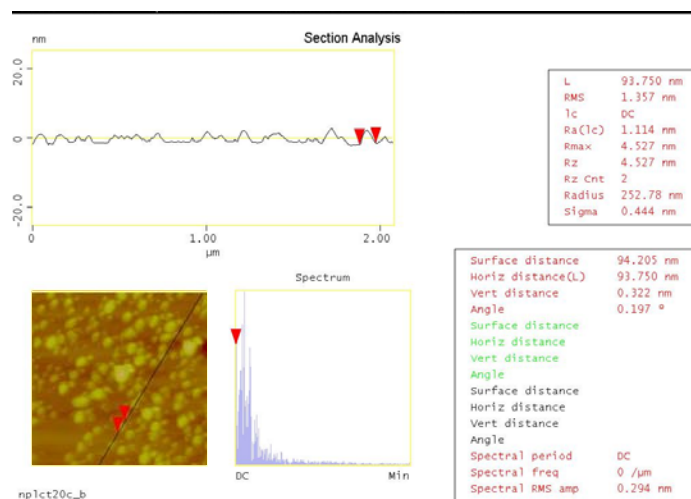


Figura17. NLC-TAM 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

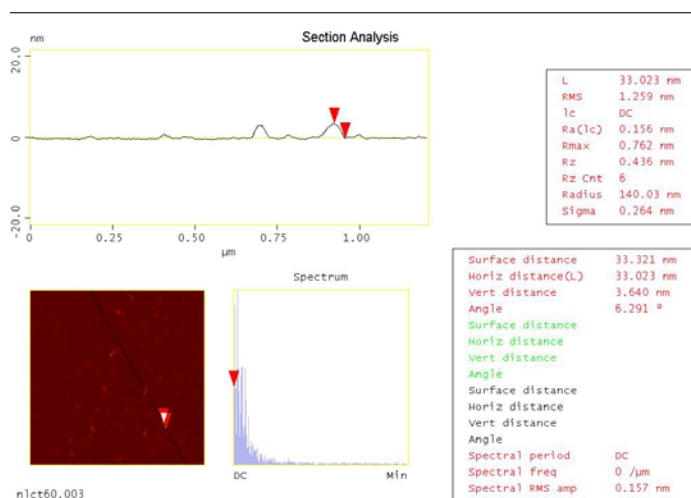


Figura18. NLC-TAM 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Il chitosano, che apporta una maggiore rigidità nelle nanoparticelle non caricate con il farmaco, sembra essere meno coinvolto nella struttura quando invece il tamoxifene citrato è presente.

4.1.2.2. DSC

Dall'analisi calorimetrica sia dei singoli materiali sia dei sedimenti di nanoparticelle contenenti il farmaco, si può vedere (figura19) come il picco di fusione del farmaco cristallino da solo (linea nera) scompaia nel tracciato delle formulazioni con lecitina e chitosano (NLC senza farmaco = linea rossa; NLC-TAM50 μ g/ml = linea blu; NLC-TAM600 μ g/ml = linea verde), indicando che non c'è più farmaco cristallino nel caso delle nanoparticelle, ma compare solo il carattere amorfo del sistema. Questo conferma quindi che ci sono interazione con gli eccipienti ed inclusione nelle nanoparticelle.

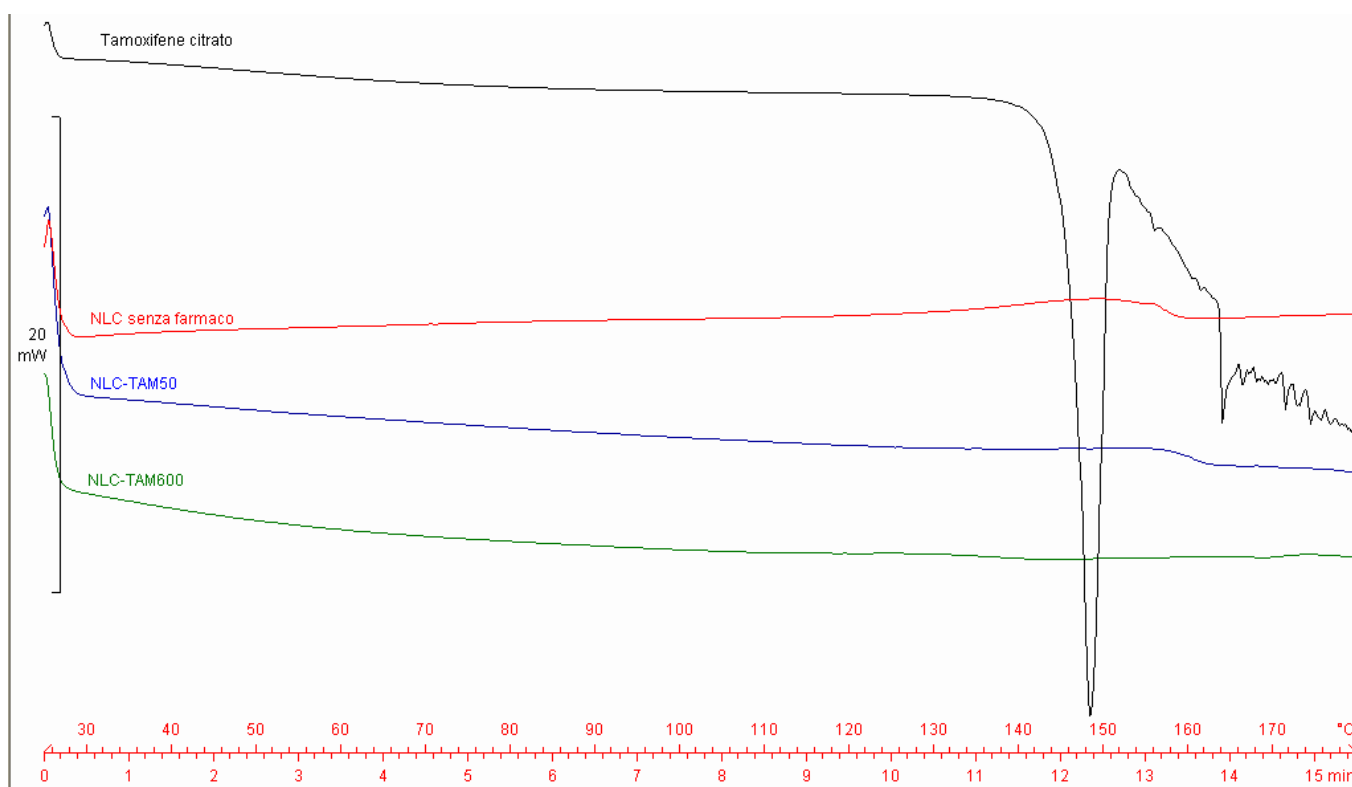


Figura19. Curve di tamoxifene cotrato materia prima, NLC senza farmaco e NLC con farmaco a diverse concentrazioni (TAM 50 e 600 μ g/ml).

4.1.2.3. TEM

Dalle immagini TEM, ottenute usando come agente di contrasto l'acido fosfotungstico, si sono potute ottenere solo informazioni sulla forma e sulle dimensioni delle nanostrutture (figure20,21).

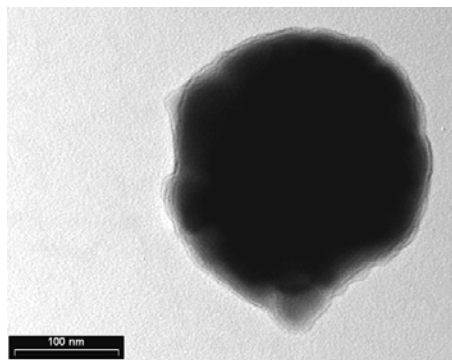


Figura20. NLC senza farmaco (89000X)

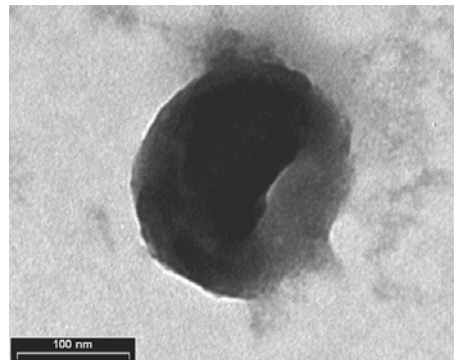


Figura21. NLC-TAM600µg/ml (89000X)

Utilizzando invece l'agente di contrasto acetato di uranile si è evidenziata meglio anche l'organizzazione interna (Figure20-29).

I liposomi di sola lecitina (figure22,23) appaiono come vescicole unilamellari di piccole dimensioni.

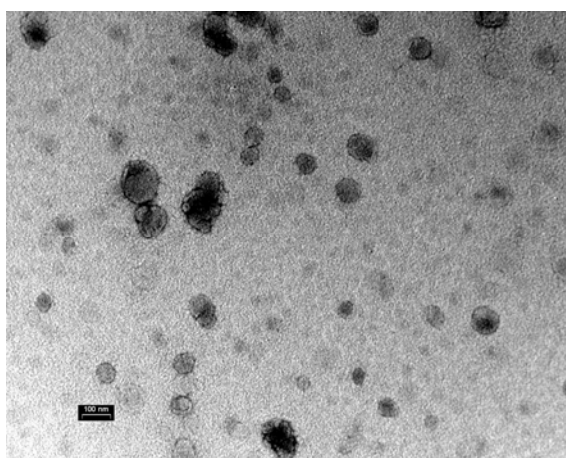


Figura22. Liposomi di lecitina (36000X)

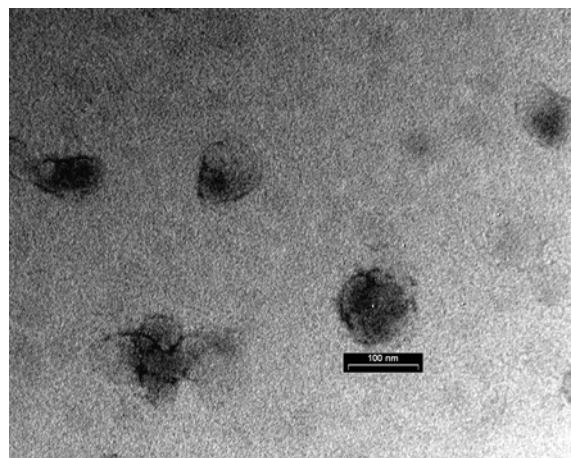


Figura23. Liposomi di lecitina (71000X)

La presenza del chitosano conferisce alle nanoparticelle NLC senza farmaco (Figure24-27) un aspetto più “roccioso”, in confronto ai liposomi di sola lecitina.

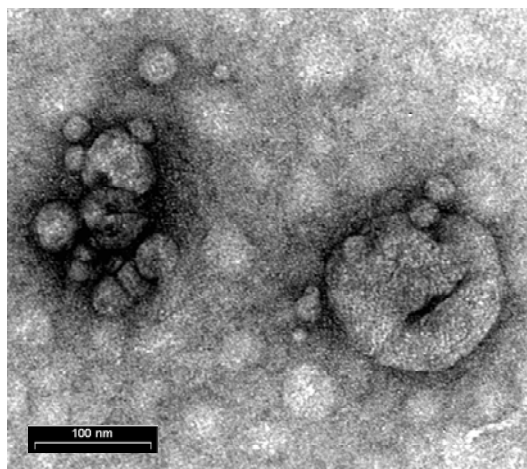


Figura24. NLC senza farmaco (89000X).

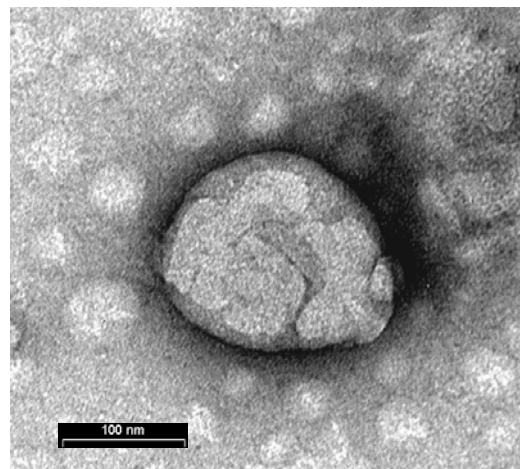


Figura25. NLC senza farmaco (89000X).

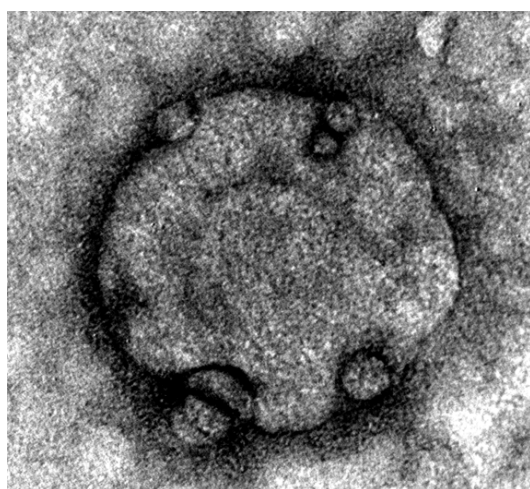


Figura26. NLC senza farmaco (140000X).

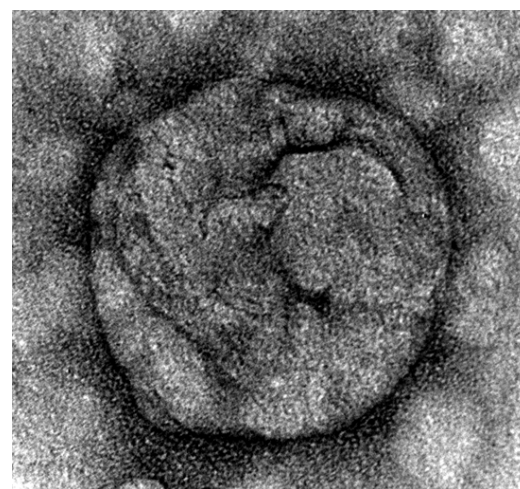


Figura27. NLC senza farmaco (140000X).

Il caricamento del nanosistema con il tamoxifene citrato (figure28-31), invece, sembra modificare sostanzialmente la morfologia, mostrando una maggiore organizzazione e portando alla formazione di una *struttura multistrato*. Questo può essere dovuto all'interazione che avviene previamente fra tamoxifene e lecitina che

vengono sciolti insieme in metanolo. Essendo intimamente mescolati prima della formazione del sistema colloidale, questo può portare alla formazione di strutture lamellari più ordinate quando la fase organica viene iniettata in quella acquosa, contenente anche il chitosano.

I contorni delle strutture sono irregolari e gli strati non sono ben distesi e separati a causa della preparazione del campione, che è stato analizzato secco.

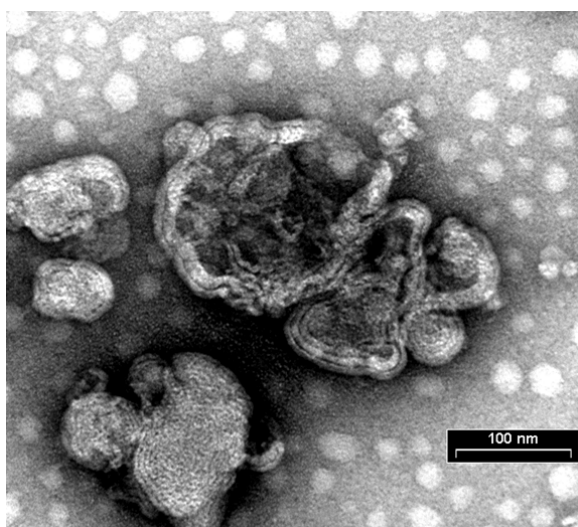


Figura28. NLC-TAM600µg/ml (71000X).

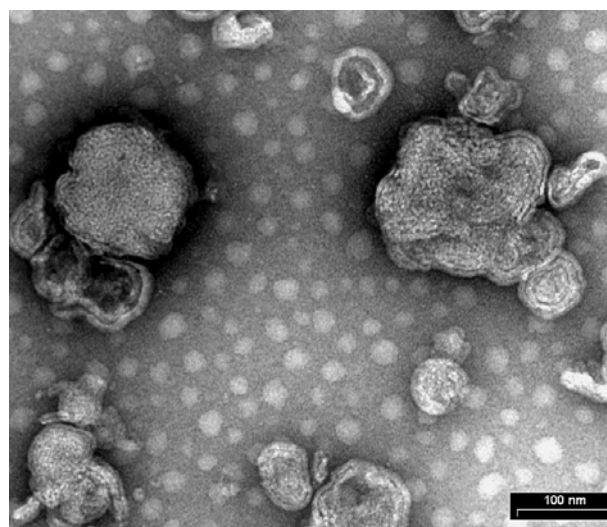


Figura29. NLC-TAM600µg/ml (71000X).

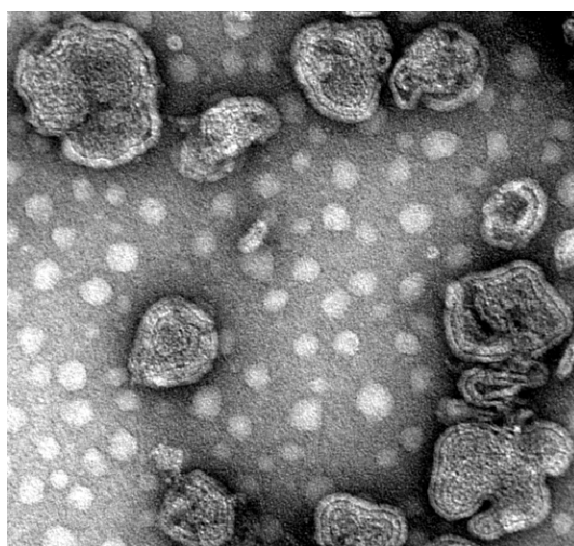


Figura30. NLC-TAM600µg/ml(110000X).

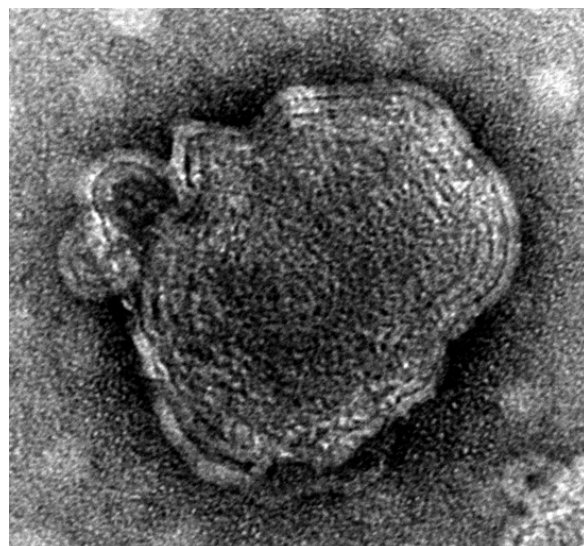


Figura31. NLC-TAM600µg/ml(140000X).

4.1.2.4. Cryo-TEM

La struttura multistrato dei sistemi NLC-TAM è soprattutto evidente nelle immagini ottenute con il cryo-TEM (Figure 32-35), in cui i campioni sono stati osservati congelati, nel loro ambiente acquoso, senza agenti di contrasto o distorsioni dovute al trattamento del campione per l'analisi.

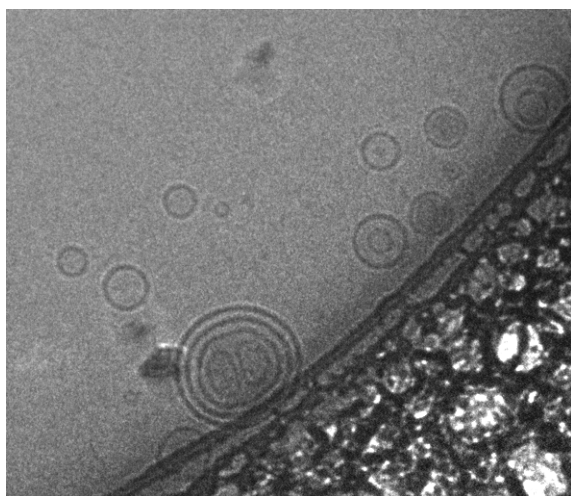


Figura 32. NLC-TAM 600 µg/ml.

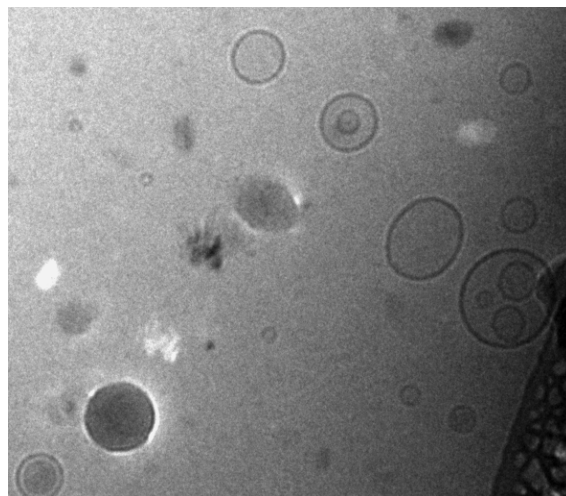


Figura 33. NLC-TAM 600 µg/ml.

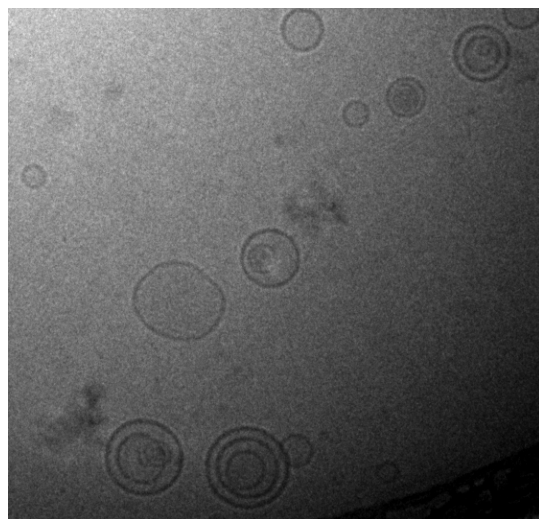


Figura 34. NLC-TAM 600 µg/ml.

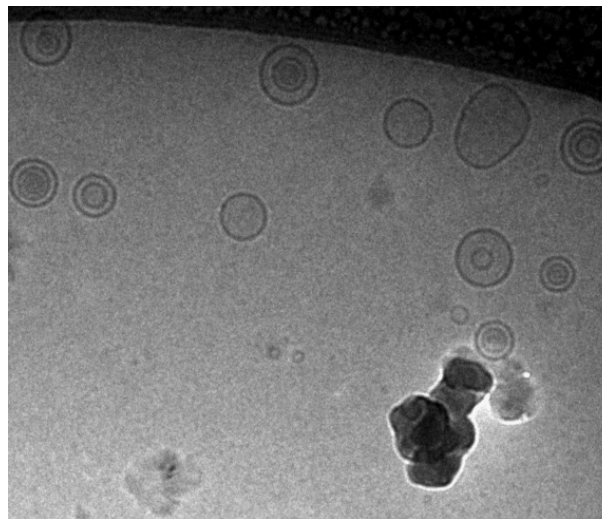


Figura 35. NLC-TAM 600 µg/ml.

4.1.3. Determinazione quantitativa del chitosano

Poiché è stato visto che il tamoxifene porta a delle modifiche nella struttura dei nanosistemi NLC, per confermare i dati precedentemente ottenuti che portano ad ipotizzare che il tamoxifene, interagendo elettrostaticamente con la lecitina, rimpiazza almeno in parte il chitosano, è stato misurato con saggio colorimetrico il chitosano presente in soluzione alla fine del processo di formazione delle nanoparticelle (con e senza il farmaco).

Dai risultati presentati in figura36, emerge che nelle nanoparticelle senza farmaco la quantità di chitosano presente in soluzione è trascurabile e si può assumere che praticamente tutto il chitosano sia coinvolto nella struttura delle NLC. Per contro, all'aumentare della quantità di tamoxifene citrato nelle preparazioni di NLC la quantità di chitosano in soluzione tende ad aumentare fino a raggiungere un valore di circa il 100% con la preparazione a concentrazione più alta di TAM.

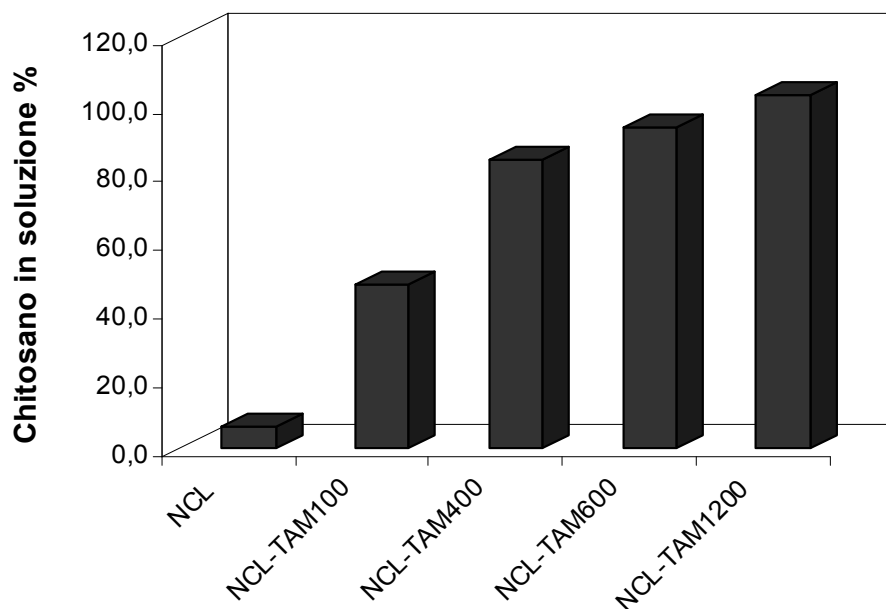


Figura36. Quantità di chitosano in soluzione nei sistemi NLC-TAM.

4.1.4. Produzione di polveri da NLC

Nella seconda parte del lavoro l'obiettivo è stato quello di ottenere da queste nanosospensioni delle polveri con buone caratteristiche tecnologiche per la produzione di forme farmaceutiche per la somministrazione orale.

Le tecniche utilizzate sono state due:

- I. LIOFILIZZAZIONE
- II. SPRAY-DRYING

4.1.4.1. Produzione di polveri mediante liofilizzazione

Per ottenere una polvere utilizzabile per la produzione di forme solide di dosaggio dai sistemi NLC-TAM, si è dovuto aggiungere un eccipiente che agisce da diluente, dal momento che la concentrazione del nanosistema è molto bassa (inferiore all'1% p/v). Si è scelto di aggiungere come eccipiente il mannitolo, che è inerte e non tossico, in quantità del 75% p/p sul solido finale. Sono state preparate sospensioni aggiungendo il mannitolo sia prima sia dopo la formazione del nanosistema, per verificare che non vi fossero differenze. Le preparazioni liofilizzate sono state disciolte in H₂O distillata e filtrata per l'analisi dimensionale e del potenziale zeta: si riottengono nanosospensioni ($305,7 \pm 42,2\text{nm}$) con carica superficiale positiva ($+49,64 \pm 1,37\text{mV}$).

Per studiare la morfologia delle polveri ottenute è stato utilizzato il microscopio a scansione di elettroni (SEM), andando prima ad analizzare il principio attivo di partenza (figure 37,38) e poi il liofilizzato ottenuto dal nanosistema caricato con il farmaco (NLC-TAM 600µg/ml) con l'aggiunta di mannitolo al 75%p/p (figure 39,40).

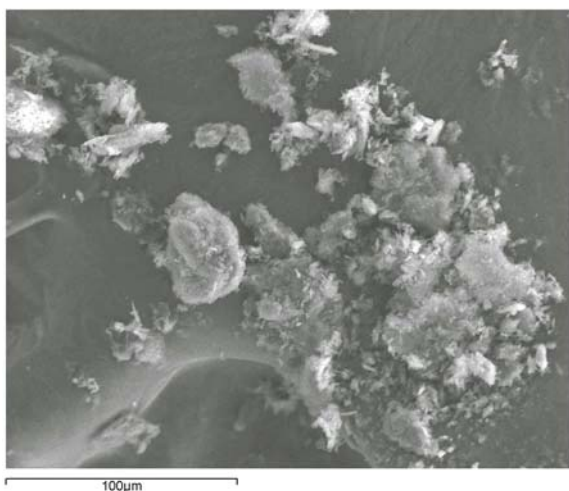


Figura37. Tamoxifene citrato (500X).

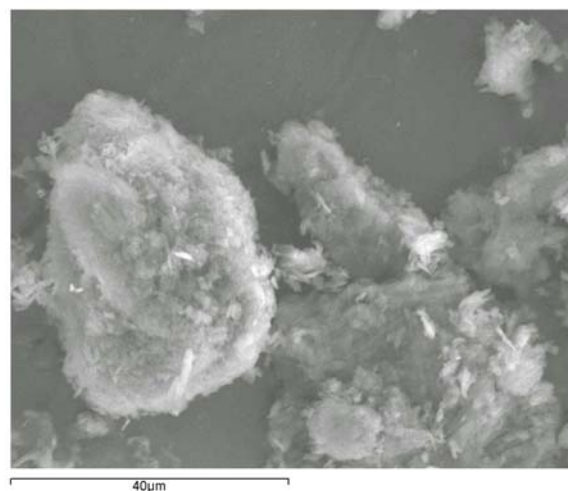


Figura38. Tamoxifene citrato (1500X).



Figura39. Liofilizzato NLC-TAM (750X).

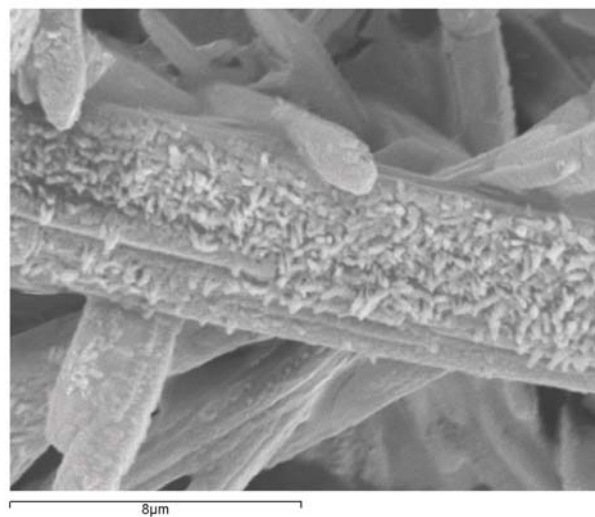


Figura40. Liofilizzato NLC-TAM (7500X).

I cristalli aghiformi formati sono di mannitolo e su questi, ingrandendo, si possono vedere delle particelle submicroniche depositate.

La liofilizzazione è una tecnica efficiente poiché si ha una resa molto vicina al 100%. Tuttavia le polveri ottenute non hanno buone proprietà tecnologiche, come la scorrevolezza, ed il processo è difficoltoso e richiede tempi lunghi. Quindi si è scelto di utilizzare altre tecniche di essiccamento.

4.1.4.2. Produzione di polveri mediante spray-drying (S.D.)

Sono state realizzate anche polveri tramite la tecnica di spray-drying, sempre utilizzando i sistemi colloidali NLC-TAM. Si sono cercate le condizioni migliori per ottenere una buona resa, modificando i parametri di processo (come la quantità di sospensione spruzzata nell'unità di tempo e la temperatura di essiccamento all'uscita dall'ugello) e cambiando gli eccipienti.

I parametri che sono rimasti costanti durante ogni processo sono i seguenti:

Aspirazione = 100%

Flusso = 600 L/h

Ugello = 0,7mm

Tabella 3. Formulazioni per polveri spray-dried dai nanosistemi NLC-TAM.

Polvere	TAM ($\mu\text{g/ml}$)	Lecitina (mg/ml)	Chitosano (mg/ml)	Eccipienti % (p/p)	Solido % (p/V)	T inlet $^{\circ}\text{C}$	Flusso %	Resa %
S.D.1	600	2	0,1	75 ^(*)	1,07	105	20	<5
S.D.2	600	2	0,1	75 ^(*)	1,07	110	10	<5
S.D.3	600	2	1	60 ^(**)	0,91	100	20	<5

^(*)mannitolo

^(**)0,5% mannitolo + 0,05% silice colloidale

In tabella 3 sono riportati i componenti delle formulazioni, i parametri di processo di spray-drying e come sono stati variati per ottenere le polveri S.D.

Poiché la resa è stata insoddisfacente si è deciso di operare alcuni cambiamenti:

- 1) usare come eccipiente le β -ciclodestrine⁽⁹⁾ (β -CD), meno solubili del mannitolo e con l'interessante proprietà di formare complessi di inclusione con farmaci scarsamente solubili e con struttura simile a quella del Tamoxifene;
- 2) in una formulazione la concentrazione di componenti della sospensione colloidale è stata raddoppiata, controllando (tramite analisi dimensionale e carica superficiale) che le caratteristiche del sistema non fossero modificate in maniera sostanziale, né a causa della maggior concentrazione né della presenza delle β -ciclodestrine: dimensioni invariate ($\varnothing=131,5\text{nm}$) e lo stesso per il potenziale d'azione, sempre molto positivo ($\zeta=+36,95\text{mV}$).

Tabella 4. Formulazioni per polveri spray-dried dai nanosistemi NLC-TAM.

Polvere	TAM ($\mu\text{g/ml}$)	Lecitina (mg/ml)	Chitosano (mg/ml)	Eccipienti %(p/p)	Solido %(p/V)	T inlet $^{\circ}\text{C}$	Flusso %	Resa %
S.D.4	600	2	0,1	75 ⁽⁹⁾	1,08	95	10	47
S.D.5	1200	4	0,2	75 ⁽⁹⁾	2,16	95	10	66
S.D.6	600	2	0,1	60 ⁽⁹⁾	1,35	100	10	36
S.D.7	1200	2	0,1	60 ⁽⁹⁾	1,16	100	10	20

In tabella4 sono riassunti i componenti delle formulazioni utilizzati ed i parametri di processo di spray-drying. Grazie ai cambiamenti introdotti, la resa delle polveri ottenute è migliorata notevolmente, come anche le caratteristiche tecnologiche dei prodotti ottenuti.

Queste polveri S.D., inoltre, si ridisperdono facilmente in acqua, riformando delle sospensioni colloidali, anche se di dimensioni superiori, probabilmente dovute ad una certa aggragazione, ma con la stessa carica superficiale (S.D.6: $\varnothing=525,5\text{nm}$ e $\zeta=+48,03\text{mV}$; S.D.7: $\varnothing=488,7\text{nm}$ e $\zeta=+45,55\text{mV}$).

Su queste polveri sono state effettuate analisi dimensionali, di contenuto d'acqua e perdita in peso, di titolo e di morfologia.

4.1.4.2.1. Analisi dimensionale delle polveri S.D.

Dalle sospensioni di nanoparticelle si sono ottenute delle polveri micronizzate. Sembra che al diminuire delle β -ciclodestrine o comunque al diminuire della percentuale di solido nella sospensione diminuiscano anche le dimensioni delle microparticelle ($d_{0,1-0,5-0,9}$ = è il valore di diametro al di sotto del quale vi è il 10-50-90% della popolazione di microparticelle). In ogni caso tutte presentano una stretta distribuzione dimensionale che va da 1 a $10\mu\text{m}$.

Tabella 5. Distribuzione dimensionale delle polveri spray-dried.

Polvere	$d_{0,1}$ (μm)	$d_{0,5}$ (μm)	$d_{0,9}$ (μm)
S.D.5	$1,78 \pm 0,07$	$4,12 \pm 0,09$	$7,83 \pm 0,18$
S.D.6	$1,70 \pm 0,05$	$3,22 \pm 0,14$	$6,45 \pm 0,94$
S.D.7	$1,52 \pm 0,02$	$2,42 \pm 0,02$	$4,21 \pm 0,14$

4.1.4.2.2. Contenuto di acqua delle polveri S.D.

Il contenuto d'acqua è stato determinato tramite titolazione di Karl-Fisher, mentre per la perdita in peso è stata fatta l'analisi termogravimetrica. I risultati sono riportati in tabella 6.

Nonostante le polveri siano state ottenute con un processo di spray-drying, quindi di essiccamento efficiente, l'umidità è ancora rilevante. Questo fatto è forse dovuto alla presenza delle β -ciclodestrine che hanno un considerevole contenuto di acqua coordinata.

La perdita in peso è ovviamente maggiore perché vede coinvolti altri processi come la decomposizione e l'emissione di specie gassose.

Tabella 6. Contenuto d'acqua e perdita in peso delle polveri spray-dried.

Polvere	TGA	K-F
S.D.4	10.1 %	8,5 %
S.D.5	10.5 %	8,2 %
S.D.6	n.d.	7,9 %
S.D.7	n.d.	6,6 %

4.1.4.2.3. Titolo delle polveri S.D.

Il titolo delle polveri è stato calcolato come il rapporto percentuale tra la quantità di farmaco trovata ed il peso complessivo della polvere ottenuta. Il recupero, invece, è il rapporto tra il titolo della polvere ottenuta tramite S.D. e la percentuale di farmaco sul solido, prima del processo di S.D. I risultati sono riassunti in tabella 7.

Tabella 7. Titolo delle polveri spray-dried e recupero del farmaco.

Polvere	Recovery %	Titolo %
S.D.4	96,6 ± 1,3	5,4 ± 0,1
S.D.5	94,2 ± 1,2	5,2 ± 0,1
S.D.6	94,9 ± 4,4	8,4 ± 0,4
S.D.7	101,2 ± 0,3	16,5 ± 0,1

Il titolo delle polveri va dal 5 al 16% circa di principio attivo sul totale dei componenti e questo dipende dal sistema NLC-TAM utilizzato, ovviamente. Il recupero del farmaco è compreso tra il 95% ed il 100%. Le polveri sono state testate per la stabilità fino a 6 mesi a 25°C e non si sono riscontrate variazioni nel contenuto di farmaco.

4.1.4.2.4. Morfologia delle polveri S.D.

Di seguito sono riportate le immagini al SEM con la morfologia di tutte le polveri ottenute per S.D.

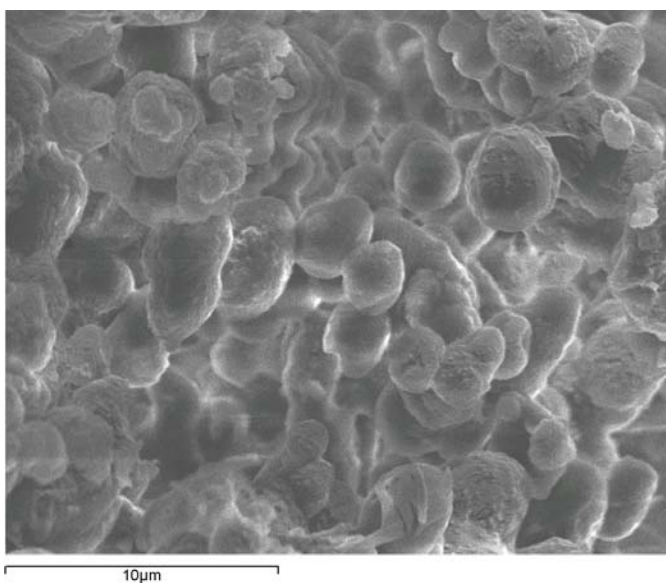


Figura41. Polvere S.D.1 (5000X)

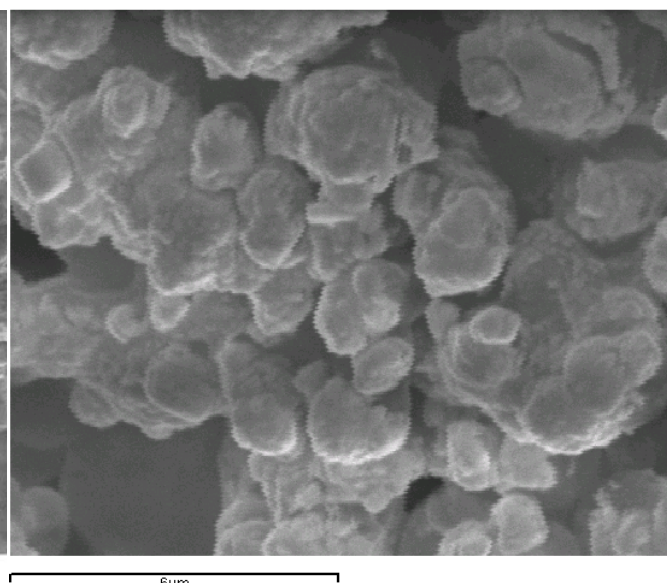


Figura42. Polvere S.D.1 (10000X)

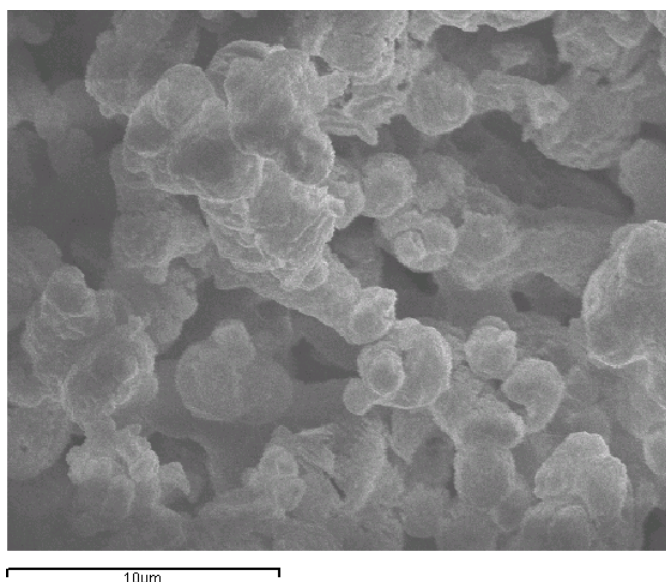


Figura43. Polvere S.D.2 (5000X)

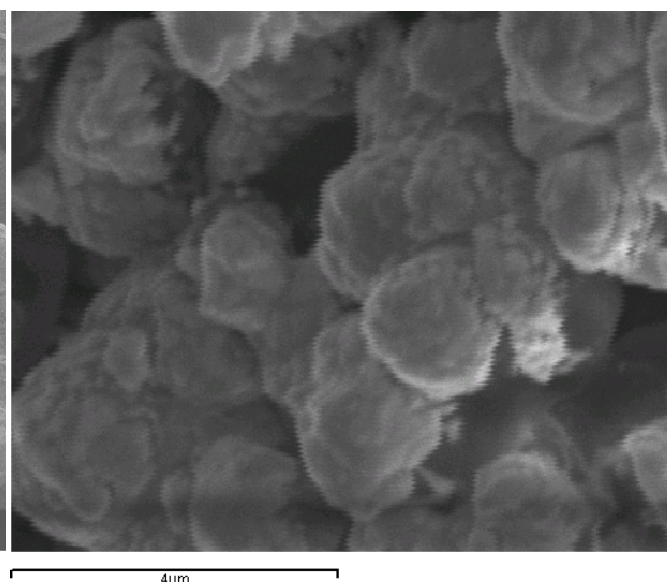


Figura44. Polvere S.D.2 (15000X)

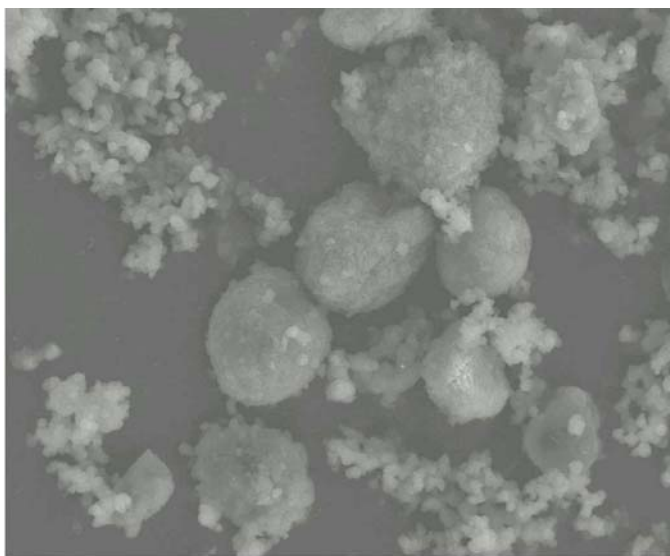


Figura45. Polvere S.D.3 (1500X)

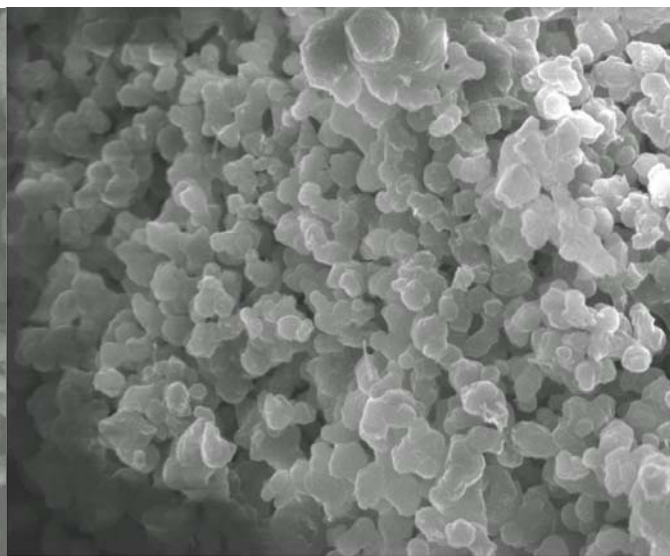


Figura46. Polvere S.D.3 (3000X)

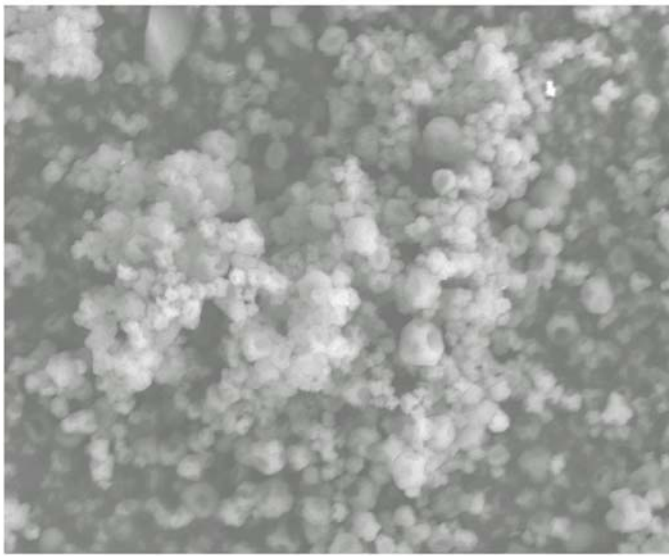


Figura47. Polvere S.D.4 (1500X)

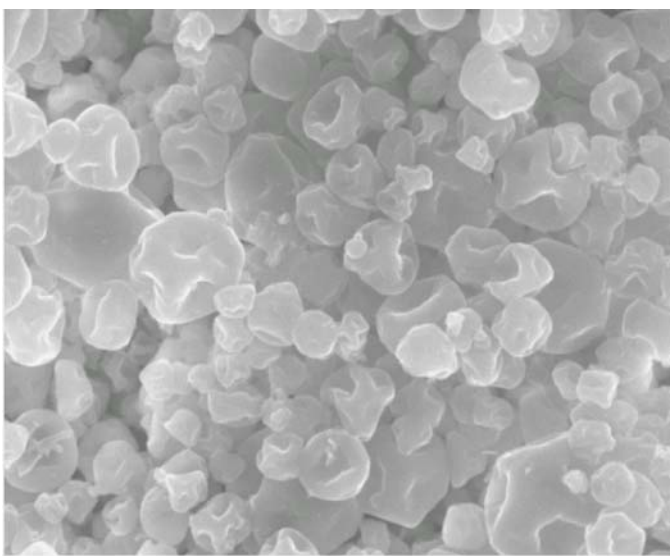


Figura48. Polvere S.D.4 (5000X)

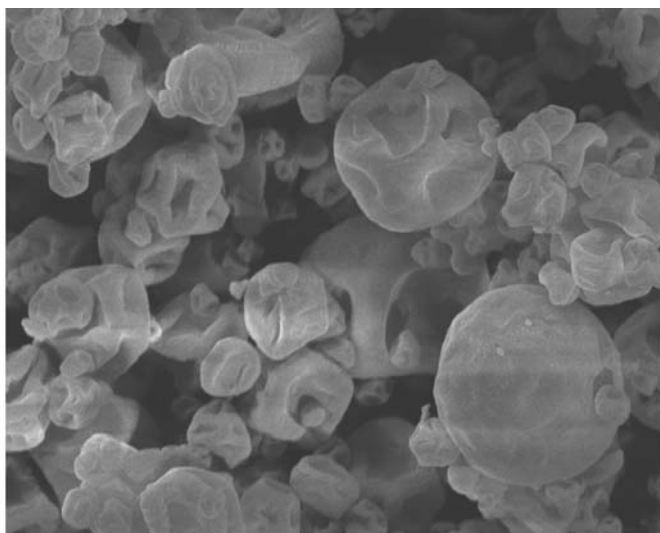


Figura49. Polvere S.D.5 (4000X)

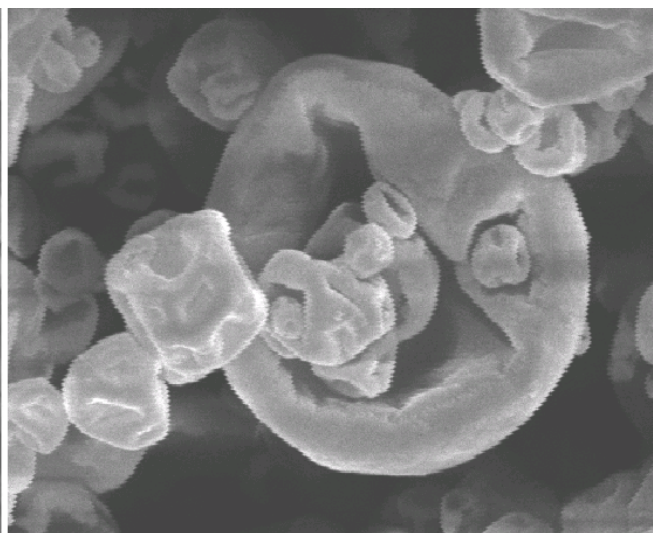


Figura50. Polvere S.D.5 (7500X)

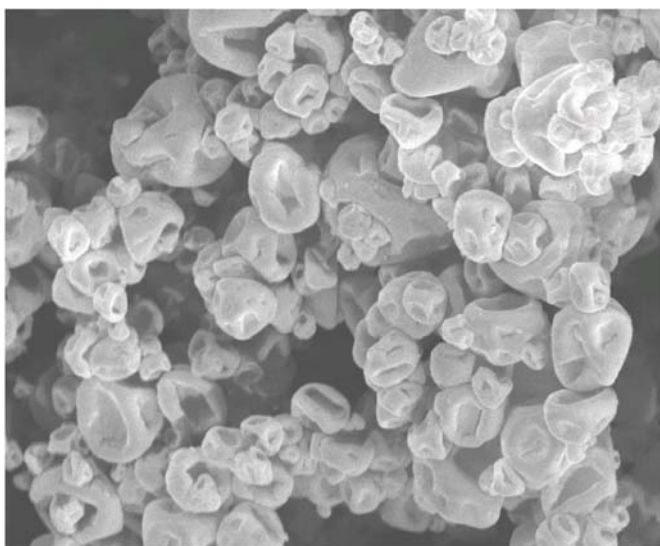


Figura51. Polvere S.D.6 (4000X)

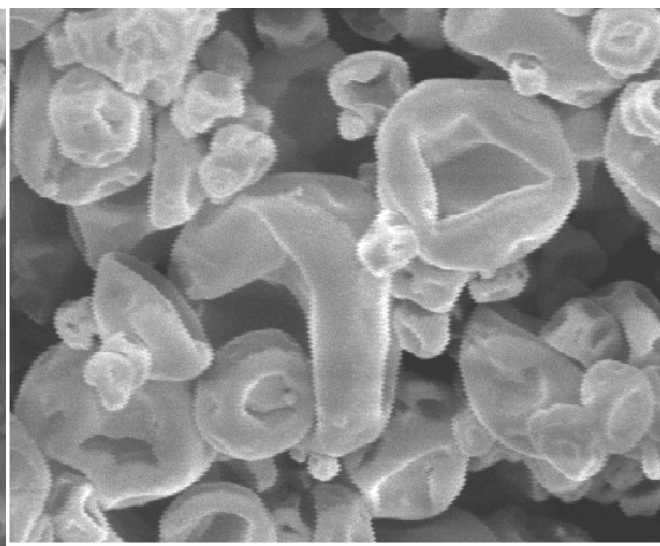


Figura52. Polvere S.D.6 (7500X)

Rispetto alle formulazioni contenenti mannitolo (S.D.1, S.D.2, S.D.3) che sembrano essere microparticelle piene (figure41-46), con una superficie rugosa che lascia pensare sia dovuta alle nanoparticelle, le formulazioni ottenute introducendo la β -ciclodestrina come eccipiente (S.D.4, S.D.5, S.D.6) hanno portato alla formazione di microparticelle cave o comunque a bassa densità, che sono parzialmente collassate per l'azione del vuoto, e ad una superficie apparentemente più liscia (figure47-52).

4.1.5. Inclusione del Tamoxifene nelle β -ciclodestrine

Dal momento che nelle formulazioni delle polveri S.D. è stata aggiunta la β -ciclodestrina, è stato controllato se in qualche modo questo componente influisse sulle quantità di farmaco incapsulato e farmaco in soluzione, se determinasse dei cambiamenti nell'equilibrio del sistema, essendo in grado di formare complessi di inclusione con farmaci con caratteristiche simile a quelle del tamoxifene citrato.

L'analisi dei lotti di NLC-TAM600 μ g/ml, a cui però sono state aggiunte le β -ciclodestrine (al 75% p/p) sia prima sia dopo la formazione del nanosistema, ha mostrato che i valori di dimensioni e di potenziale zeta non erano significativamente diversi. Andando invece ad analizzare come si distribuisce il farmaco nel nuovo nanosistema NLC-TAM con un componente in più (la β -ciclodestrina, appunto) e confrontando i risultati con i lotti NLC-TAM600 μ g/ml senza eccipiente, emerge che la frazione di farmaco precipitato è sempre assolutamente trascurabile ma l'equilibrio tra farmaco in soluzione e farmaco incapsulato, invece, è stato modificato in maniera significativa e si è spostato a favore del farmaco in soluzione (figura53). Non ci sono invece sostanziali differenze (con questo tipo di analisi) tra l'aggiunta delle β -ciclodestrine prima o dopo la formazione del nanosistema.

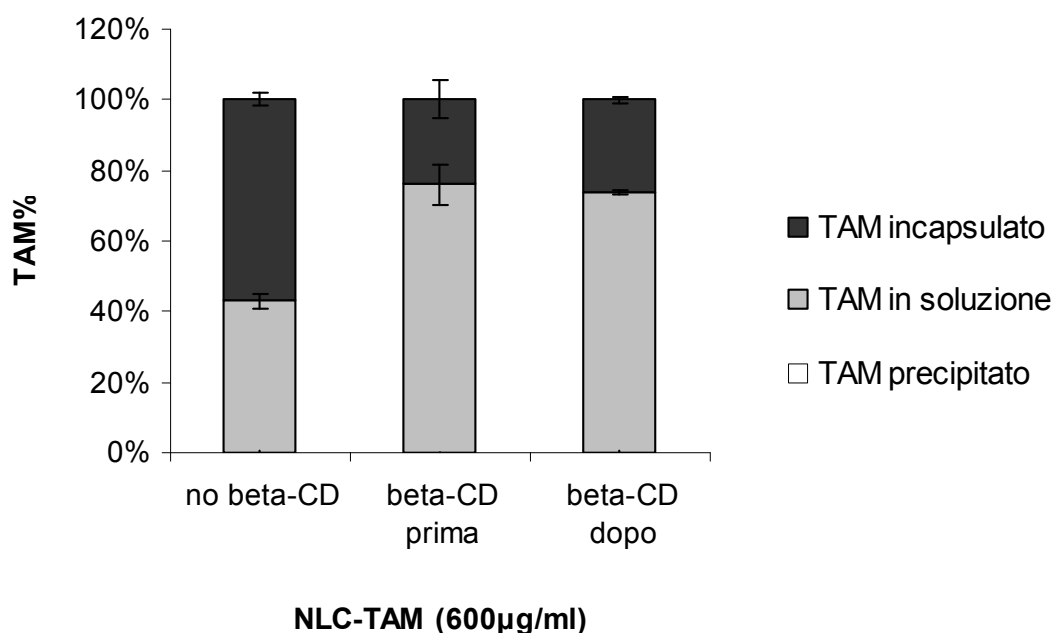


Figura53. Distribuzione del tamoxifene citrato nei nanosistemi NLC-TAM600µg/ml semplici ed addizionati con β -ciclodestrina al 75% p/p sul solido finale ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

E' stata anche valutata l'interazione dei nanosistemi con una quantità minore di β -ciclodestrina (al 60% p/p, percentuale usata in diverse poleveri S.D.). Anche in questo caso, andando a valutare le dimensioni dei sistemi non si possono cogliere differenze (NLC-TAM600µg/ml: $\phi=140,1\text{nm}$ e; NLC- TAM600µg/ml: $\phi=132,3\text{nm}$) ma la β -ciclodestrina sposta l'equilibrio tra farmaco incapsulato e farmaco fuori ed aumenta la quantità di TAM in soluzione, rispetto al nanosistema semplice e questo spostamento sembra essere proporzionale alla quantità di β -ciclodestrina aggiunta (figura54).

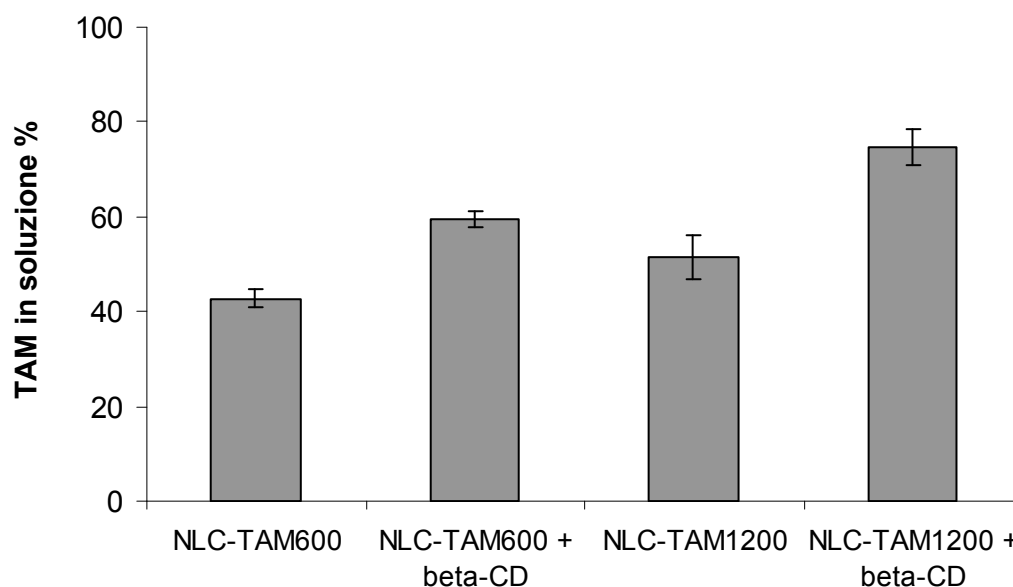


Figura54. Percentuale di tamoxifene citrato in soluzione nei nanosistemi NLC-TAM600 e 1200 μ g/ml semplici ed addizionati con β -ciclodestrina al 60% p/p sul solido finale (n \geq 3, media \pm deviazione standard).

E' evidente che la β -ciclodestrina in qualche modo interagisce con il farmaco. Per verificare se si forma un complesso di inclusione tra le ciclodestrina e un farmaco, una delle tecniche pi \grave{u} utilizzate \grave{e} la DSC, andando a fare il confronto tra la miscela fisica dei due componenti e il complesso di inclusione teoricamente ottenuto. Nella curva della miscela fisica si devono osservare i profili dei due componenti distinti, mentre nelle curve dei complessi di inclusione il picco di fusione del farmaco dovrebbe scomparire, indicando che \grave{e} avvenuta una interazione che ha modificato la cristallinit \grave{a} del farmaco.

Per ottenere l'ipotizzato complesso di inclusione si \grave{e} utilizzato lo stesso metodo di preparazione delle NLC ma senza mettere lecitina e chitosano (per non avere

ulteriori componenti che avrebbero potuto interferire con l'analisi): il farmaco è stato sciolto in metanolo ed iniettato in una soluzione acquosa contenente le β -ciclodestrine. Il tutto è stato liofilizzato per ottenere una polvere analizzabile con DSC.

In figura55 sono rappresentati gli andamenti delle miscele all'aumentare della temperatura.

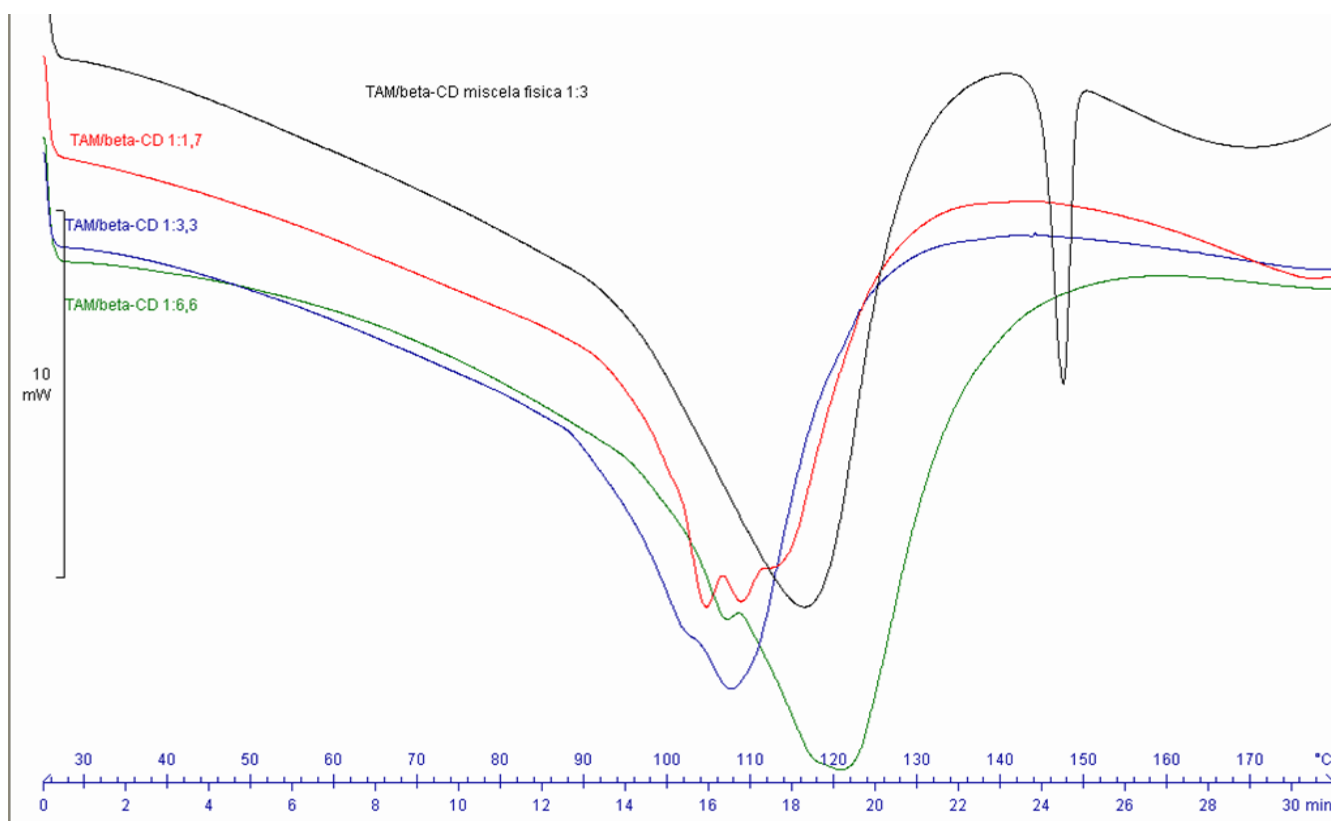


Figura55.

La curva nera rappresenta la miscela fisica del TAM con le β -ciclodestrine in rapporto molare di 1:3, ottenuta tramite semplice miscelazione meccanica dei due componenti allo stato solido. Le altre curve rappresentano i liofilizzati contenenti TAM e β -ciclodestrine in diversi rapporti molari (circa gli stessi utilizzati nelle polveri S.D.) che sono 1:1,7 (rossa), 1:3,3 (blu) e 1:6,6 (verde).

Come si può vedere, il picco di fusione del farmaco cristallino, ben visibile nella miscela fisica, è completamente scomparso nelle altre curve, a tutti i rapporti molari utilizzati, segno di una avvenuta interazione tra TAM e β -ciclodestrine con probabile formazione di un complesso di inclusione.

4.1.6. Rilascio di tamoxifene citrato

4.1.6.1. Rilascio di farmaco da NLC

In primo luogo è stato testato se le sospensioni colloidali NLC-TAM, come tali, senza alcun eccipiente, rilasciassero tamoxifene citrato e con quale cinetica.

Poiché la formulazione è destinata ad una somministrazione orale, la dissoluzione è stata condotta in fluido gastrico simulato (senza pepsina) riportato in USP 30, a 37°C, il cui pH è circa 1,2. E' stata previamente calcolata la solubilità del farmaco in questo mezzo di dissoluzione a 37°C (0,04mg/ml) e a 20°C (0,02mg/ml).

Il test di rilascio è stato effettuato utilizzando due preparzioni: NLC-TAM600 μ g/ml e NLC-TAM1200 μ g/ml.

E' importante sottolineare che, essondoci già del farmaco libero in soluzione nel sistema colloidale di partenza, i valori di tamoxifene citrato rilasciato (figura56) sono stati ottenuti sottraendo ai valori di concentrazione di TAM misurati nel mezzo di rilascio i valori di farmaco non incapsulato nel nanosistema, misurati precedentemente.

Da questi risultati, poiché la quantità di farmaco che viene trovato nel mezzo di rilascio corrisponde o è leggermente superiore alla quantità che in realtà è già in soluzione (fuori dalle nanoparticelle) si può dedurre che il farmaco non tende ad essere rilasciato dal nanosistema NLC.

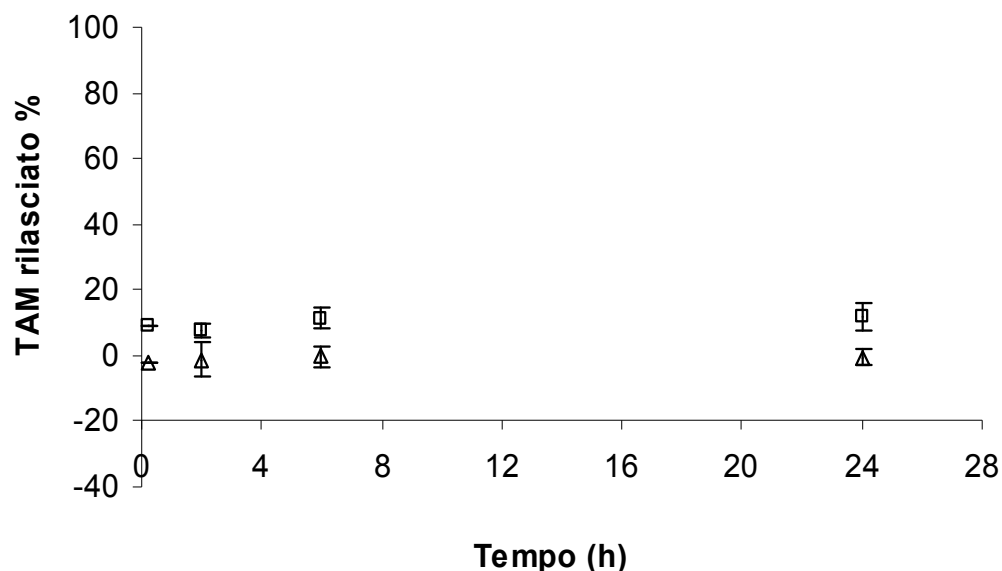


Figura56. Valori di farmaco nel mezzo di rilascio fluido gastrico simulato (SGF) e fuori dalle nanoparticelle NLC-TAM600 (—△—) e NLC-TAM1200 (—□—) ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

Quindi dal rilascio del tamoxifene citrato in fluido gastrico simulato si è visto che si raggiunge subito un plateau che rimane costante almeno fino alle 24 ore. Facendo una analisi al light-scattering dei prelievi di sistema colloidale diluito in SGF si vede che le nanoparticelle non si disciolgono, ma mantengono le stesse dimensioni o leggermente aumentate nel tempo (figura57).

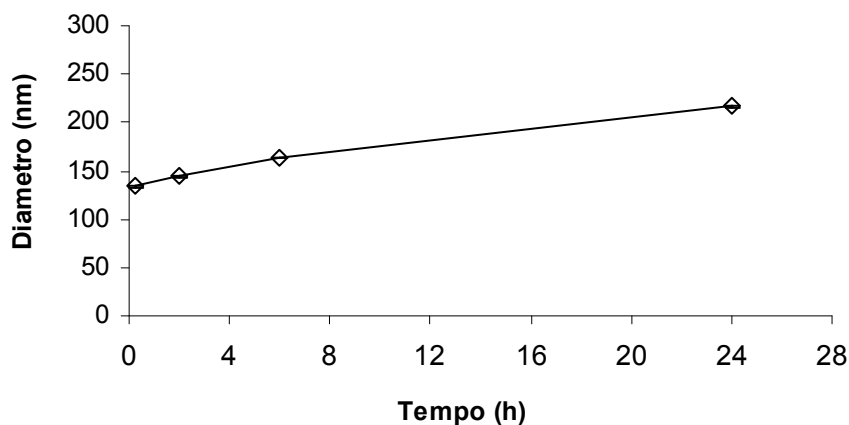


Figura57. Andamento delle dimensioni dei nanosistemi NLC-TAM600 in SGF.

Quindi si può concludere che il nanosistema resiste anche ad ambienti acidi forti (pH=1,2) fino a 24 ore e non rilascia il tamoxifene citrato, almeno quello incapsulato negli strati più interni.

4.1.6.2. Rilascio di farmaco da polveri S.D.

Il rilascio del farmaco dalle polveri S.D. è stato effettuato in fluido gastrico simulato seguendo esattamente lo stesso metodo utilizzato per il rilascio dalle sospensioni colloidali. La differenza sostanziale è che non ho più un sistema liquido, ma uno solido e ho anche un componente in più, la β -ciclodestrina, che interagisce con il principio attivo. Le polveri sono infatti state ottenute dai nanosistemi NLC-TAM con l'aggiunta di β -ciclodestrine in diverse quantità.

Dalla figura 58 si può notare che il profilo di rilascio si scompone in due parti: una prima fase molto rapida, in cui una certa quantità di farmaco diviene subito disponibile, e una seconda fase stazionaria in cui la quantità di farmaco presente in soluzione non tende ad aumentare. Se andiamo a considerare le percentuali di farmaco in soluzione che sono state calcolate nel nanosistema liquido, in presenza di β -ciclodestrine (figure 53,54), ci accorgiamo che questi valori sono molto simili a quelli ottenuti con il rilascio. La concentrazione di TAM rilasciato dalla polvere sembra dipendere dal tipo di sistema (NLC-TAM1200 μ g/ml in S.D.7 > NLC-TAM600 μ g/ml in S.D.6) e, a parità di sistema, dalla quantità di β -ciclodestrina (S.D.5 > S.D.6), confermando i risultati precedenti (figure 53,54).

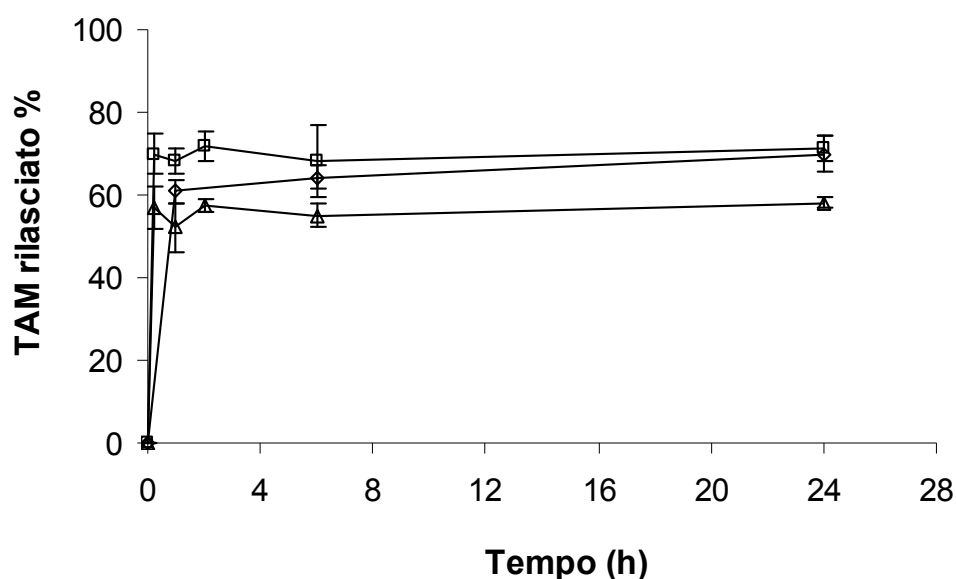


Figura58. Andamento del rilascio di tamoxifene citrato dalle polveri S.D. in fluido gastrico simulato: S.D.5 = NLC-TAM600µg/ml + β-ciclodestrina 75%p/p (—◇—); S.D.6 = NLC-TAM600µg/ml + β-ciclodestrina 60%p/p (—△—); S.D.7 = NLC-TAM1200µg/ml + β-ciclodestrina 60%p/p (—□—) (n ≥ 3, media ± deviazione standard).

4.1.7. Citotossicità dei nanosistemi NLC-TAM e delle polveri S.D.

Per verificare che questi sistemi colloidali iniziali posseggano ancora una azione citotossica, sono stati effettuati dei test su cellule MCF-7 del tumore umano alla mammella, sensibili all'azione del tamoxifene citrato perché positive ai recettori degli estrogeni.

E' stata valutata la sopravvivenza cellulare percentuale con il test dell'MTT, incubando le cellule sia con farmaco da solo sia con i nanosistemi TAM600µg/ml e NLC-TAM1200µg/ml, ottenendo un andamento in cui la sopravvivenza cellulare aumenta al diminuire della concentrazione e con un rapido aumento intorno ai valori di concentrazione efficace nell'uccidere il 50% delle cellule (EC50).

Dai risultati emerge che entrambe le formulazioni posseggono una azione citotossica e sono attive quanto il farmaco libero o anche di più, con una differenza statisticamente significativa nel range della EC50, la concentrazione effettiva in grado di caudare il 50% di morte cellulare (figura59).

I valori di EC50, valutati graficamente, si assestano comunque attorno ad un valore di circa 10 μ g/ml.

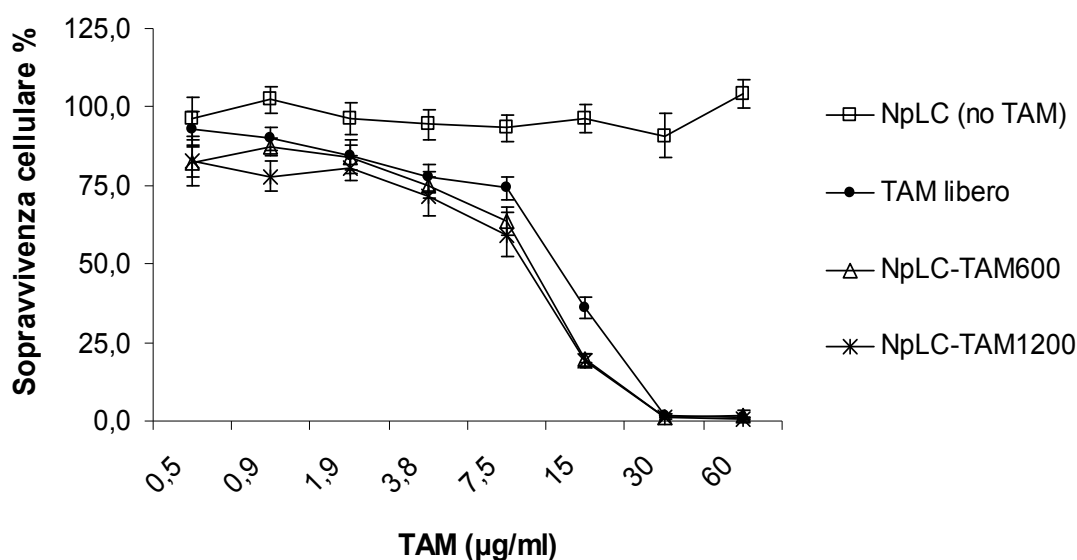


Figura59. Citotossicità su MCF-7 ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

Sono state testate per la citotossicità sulla stessa linea cellulare anche le polveri spray-dried S.D.6 ed S.D.7 (previa ridispersione in acqua) alle stesse concentrazioni, con la stessa densità cellulare e per lo stesso tempo di incubazione (72 ore), per effettuare un paragone. In effetti non si riscontrano grandi differenze con i campioni di NLC-TAM: il profilo di citotossicità è molto simile e la EC50 si aggira intorno allo stesso valore (figura60).

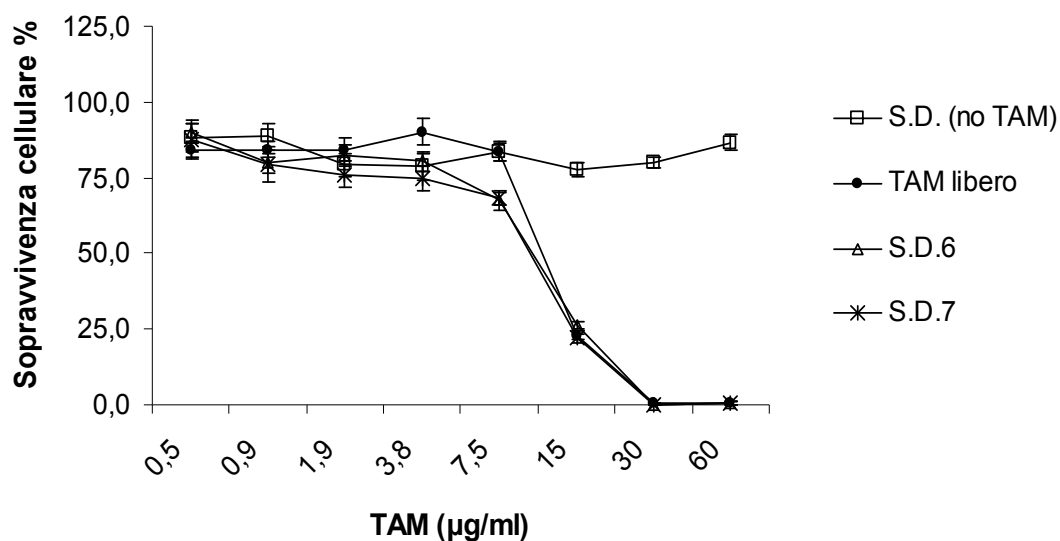


Figura60. Citotossicità su MCF-7 ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

4.1.8. Captazione e internalizzazione nelle CACO2 dei nanosistemi NLC

Perché questi nanosistemi raggiungano il tessuto bersaglio e possano svolgere la loro azione antitumorale, devono superare diverse barriere fisiologiche, la prima delle quali è l'assorbimento nel tratto gastro-intestinale. Tenendo conto che nell'assorbimento intestinale la via più probabile per particelle di dimensioni fino a 500nm è il passaggio transcellulare dovuto all'endocitosi ad opera degli enterociti, si è pensato di valutare con un test *in vitro* la captazione e l'internalizzazione dei nanosistemi usando come modello cellule CACO₂.

Poiché abbiamo anche definito che la presenza del farmaco influisce molto sulla struttura, sono stati testati sia i sistemi NLC senza farmaco sia quelli NLC-TAM600µg/ml, entrambi marcati con il fluorocromo fluoresceina-DHPE.

Le cellule, dopo incubazione coi campioni fluorescenti per diversi tempi e successivi lavaggi, sono state analizzate tramite citometria di flusso. Un aumento della fluorescenza delle cellule rispetto ai valori basali indica che i nanosistemi sono stati captati dalle cellule. Dai risultati ottenuti tramite citometria di flusso (figura61) emerge che la captazione avviene in tempi brevi e si raggiunge un plateau fra le terza e l'ottava ora. La fluorescenza risulta ulteriormente aumentata dopo 24 ore. Inoltre, sembra che l'interazione dei nanosistemi contenenti tamoxifene con le cellule sia leggermente inferiore a quella misurata per i nanosistemi senza il farmaco.

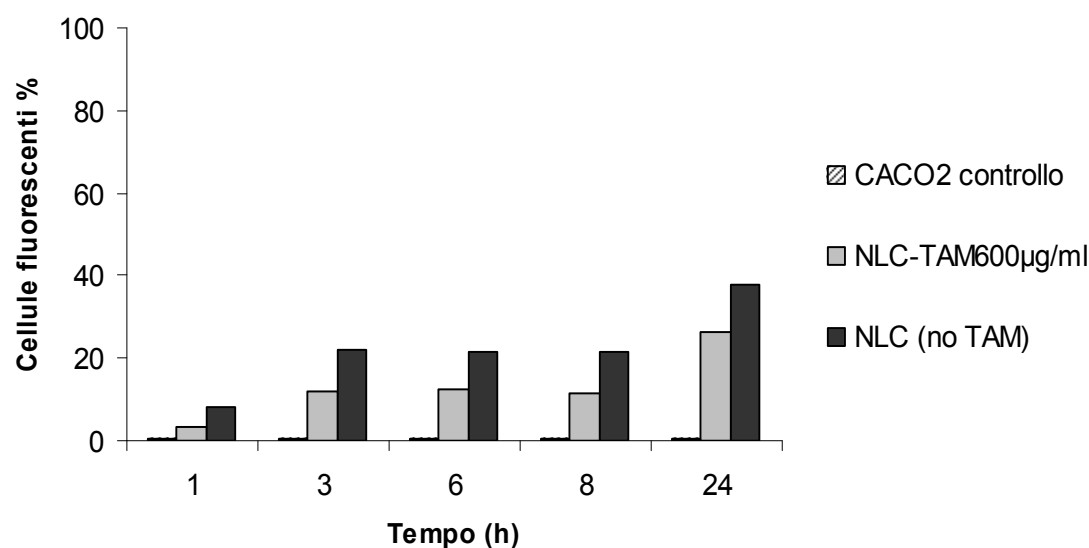


Figura61. Andamento della fluorescenza delle CACO2 a 37°C e 5%CO₂ in funzione del tempo di incubazione.

Per verificare che la fluorescenza misurata fosse dovuta ad una internalizzazione reale e non ad un semplice adsorbimento aspecifico dei nanosistemi sulla superficie cellulare, lo stesso esperimento è stato condotto anche a 4°C, temperatura a cui sia il trasporto attivo sia quello passivo dovrebbero essere rallentati o inibiti, mentre l'adsorbimento aspecifico dovrebbe essere indipendente dalla temperatura.

A 4°C non si è vista una differenza di fluorescenza tra cellule incubate con NLC e cellule incubate con NLC-TAM600µg/ml, ma soprattutto la fluorescenza ottenuta è di gran lunga inferiore, almeno fino a 6 ore e si nota un aumento solo dall'ottava ora (figura62).

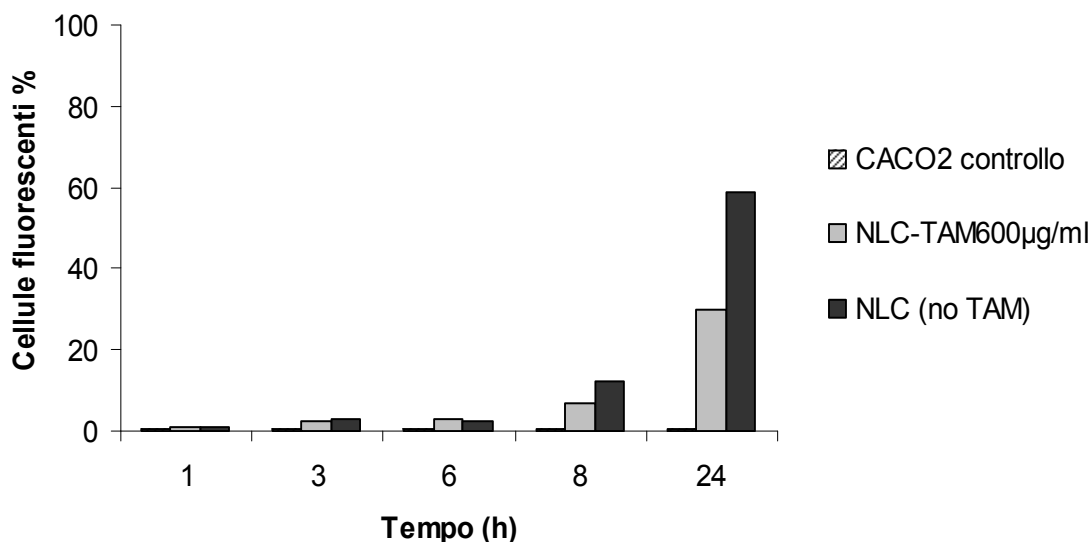


Figura62. Andamento della fluorescenza delle CACO2 a 4°C in funzione del tempo di incubazione.

Dopo 8 ore, quindi, si ha un aumento della fluorescenza più consistente e con la leggera differenza tra NLC senza il farmaco e NLC-TAM, mentre alla ventiquattresima ora la percentuale di cellule fluorescenti è aumentata molto di più a 4°C rispetto a 37°C, molto probabilmente perché le cellule sono sofferenti: ad una analisi visiva al microscopio ottico si vede chiaramente che hanno perso la loro forma caratteristica, molte cellule sono staccate e probabilmente hanno la membrana danneggiata perché a 4°C e senza CO₂ non sono nel loro microambiente ideale.

E' stata anche fatta una analisi al microscopio a fluorescenza, sui campioni incubati per 24h sia a 37°C sia a 4°C.

Per localizzare i nanosistemi, è stato marcato il nucleo delle cellule con il fluorocromo specifico Hoechst, che emette luce nel blu. Le macchie blu (figure63,64) rappresentano i nuclei delle cellule che sono stati così “colorati” per renderli visibili. I sistemi NLC, marcati con la fluoresceina-DHPE che emette luce nel verde, appaiono come dei punti verdi. Dalle immagini ottenute in microscopia a fluorescenza si possono vedere delle macchie verdi, che dovrebbero indicare la presenza dei nanosistemi ed è da notare che la concentrazione di verde è maggiore in figura63 (che rappresenta le cellule incubate con NLC senza farmaco) rispetto alla fluorescenza verde che si vede in figura64 (NLC-TAM600µg/ml), confermando la differenza di fluorescenza trovata con le analisi al citofluorimetro (figure61,62).

Inoltre, sembra che i nanosistemi siano maggiormente localizzati nella zona perinucleare.

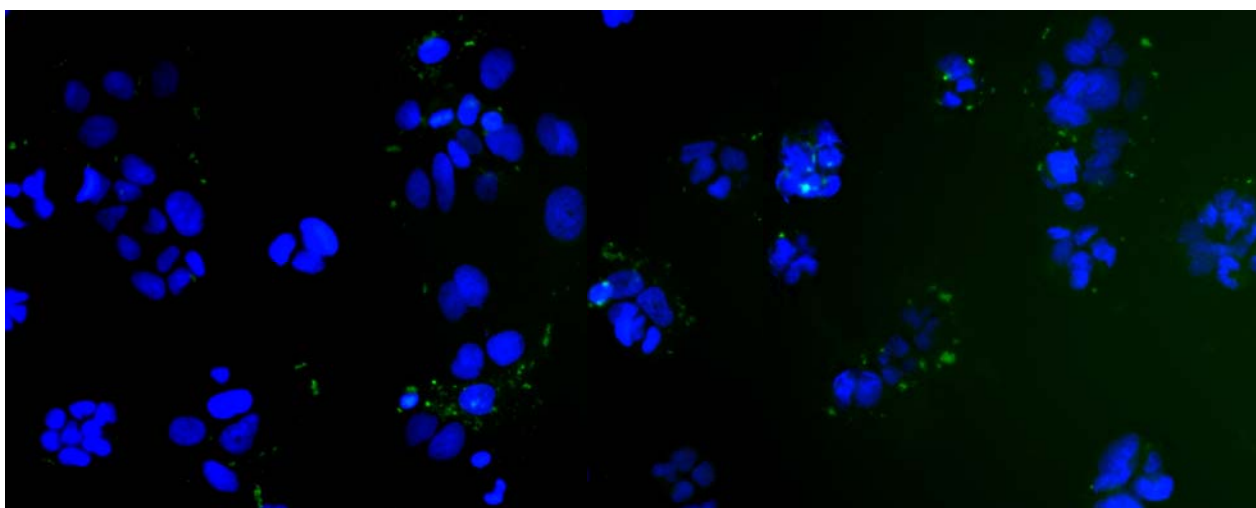


Figura63. Immagine al microscopio a fluorescenza di cellule CACO2 incubate con NLC senza farmaco.

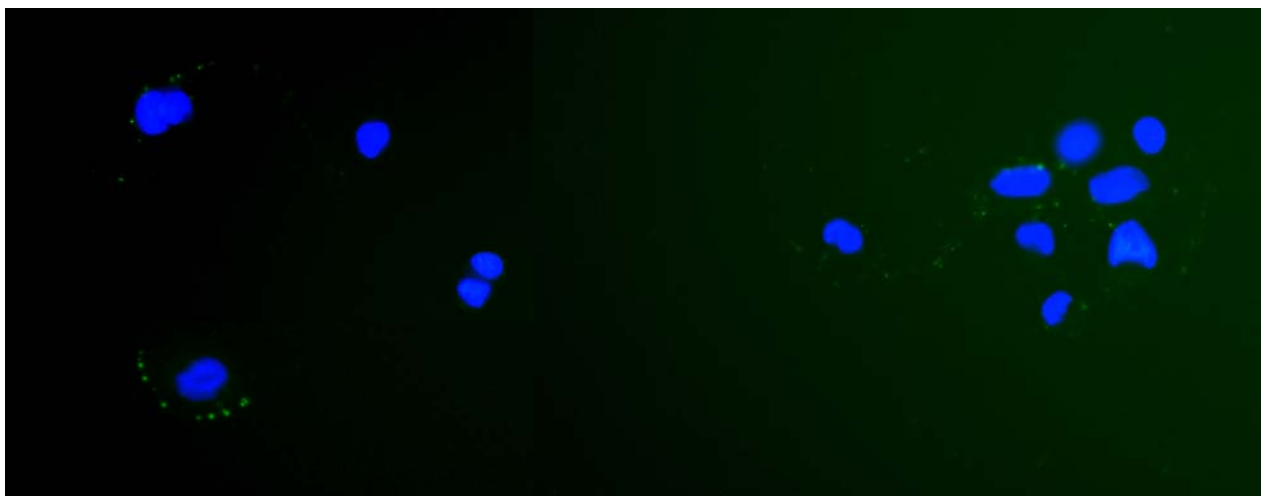


Figura64. Immagine al microscopio a fluorescenza di cellule CACO2 incubate con NLC-TAM600µg/ml.

4.2. Nanosistemi per il Paclitaxel

4.2.1. Formulazione e caratterizzazione delle micelle

Riguardo ai sistemi micellari il primo passo è stato trovare la miglior formulazione in termini di incapsulamento di paclitaxel e stabilità.

Le micelle semplici, costituite da solo PEG2000-PE, hanno diametro medio pari a $12,5 \pm 1,9\text{nm}$ e carica superficiale di $-3,88 \pm 5,33\text{mV}$; quando caricate con il Paclitaxel, le micelle di PEG2000-PE hanno valori di diametro medio di $14,2 \pm 0,1\text{nm}$ e di potenziale zeta pari a $-3,90 \pm 3,78\text{mV}$. Il caricamento del farmaco in queste micelle è di $1 \pm 0,2\%$.

Per incrementare il caricamento del farmaco, sono state studiate micelle miste: al PEG2000-PE sono stati aggiunti diversi composti lipofili (esteri del glicerolo con acidi grassi, colesterolo e dipalmitoilfosfatidilcolina), per cercare di aumentare la lipofilia del core delle micelle e ottenere quindi una incorporazione di paclitaxel maggiore.

In tabella8 sono riportate le formulazioni di micelle miste che sono state prodotte e caratterizzate per dimensioni e caricamento del farmaco. Le formulazioni che hanno portato ad un incremento nel caricamento di PTX rispetto alle micelle semplici sono evidenziate in tabella.

Sebbene l'impiego di colesterolo e soprattutto DPPC abbia portato ad un miglioramento nel caricamento di PTX, queste formulazioni si sono rivelate instabili dopo pochi giorni, presentando intorbidimento e precipitazione del farmaco.

Tabella 8. Caratterizzazione delle micelle per dimensioni e caricamento di farmaco. Trimiristina = gliceriltrimiristato; Peceol = glicerolmonooleato; Capryol 90 = propilenglicolmonocaprilato; Tributirina = gliceriltributirato.

Composizione (rapporto molare)	Concentrazione (mg/ml)	Dimensioni (nm)	Caricamento PTX %
PEG2k-PE/ePC/Chol/PTX (1:1:0,5:0,4)	11	14,5	0,34
PEG2k-PE/Chol/PTX (1:0,3:0,4)	8,8	13,0	0,44
PEG2k-PE/Chol/PTX (1:0,1:0,4)	15,9	8,8	2,11
PEG2k-PE/DPPC/PTX (1:1:0,3)	20,3	11,4	0,88
PEG2k-PE/DPPC/PTX (1:0,1:0,3)	10,9	11,5	5,81
PEG2k-PE/DPPC/PTX (1:0,05:0,13)	10,5	12,7	3,91
PEG2k-PE/Trimiristina/PTX (1:1,14:0,3)	14,9	9,3	0,38
PEG2k-PE/Peceol/PTX (1:1,4:0,3)	13,8	15,8	0,5
PEG2k-PE/Capryol90/PTX (1:2,6:0,3)	13,8	8,8	0,14
PEG2k-PE/Tributirina/PTX (1:1,7:0,3)	13,8	12,0	0,6
PEG2k-PE/Tributirina/PTX (1:0,17:0,2)	10,5	13,6	2,3
PEG2k-PE/Tributirina/DPPC/PTX (1:0,17:0,1:0,2)	10,5	13,1	0,44
PEG2k-PE/Tributirina/Chol/PTX (1:0,17:0,1:0,2)	10,5	8,6	1,32
PEG2k-PE/Tributirina/PTX (1:0,085:0,2)	10,5	8,0	2,16
PEG2k-PE/Tributirina/PTX (1:0,34:0,1:0,2)	10,5	8,1	1,19

E' stato invece trovato che micelle costituite da PEG2000-PE e Vitamina E portano ad un aumento del caricamento di farmaco fino a 3 volte rispetto alle micelle semplici e queste formulazioni sono stabili (tabella9). La Vitamina E è stata aggiunta al PEG2000-PE in diversi rapporti molari ed è stato assodato che la migliore formulazione è data da PEG2000-PE/Vitamina E in rapporto molare 1:0,4, con la formazione di micelle di piccole dimensioni, carica superficiale vicino alla neutralità e caricamento del 3% circa.

Tabella9. Caratterizzazione delle micelle miste PEG2000-PE/Vitamina E per dimensioni, carica superficiale e caricamento di farmaco ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

Composizione (rapporto molare)	Concentrazione (mg/ml)	Dimensioni (nm)	ζ (mV)	Caricamento PTX %
PEG2k-PE/Vitamina E (1:0,4)	10,6	13,8 \pm 0,8	-0,26 \pm 1,17	-
PEG2k-PE/Vitamina E/PTX (1:0,4:0,2)	10,6	12,4 \pm 0,9	-0,81 \pm 1,27	2,9 \pm 0,2
PEG2k-PE/Vitamina E/DPPC/PTX (1:0,4:0,1:0,2)	11,5	14,6		2,1
PEG2k-PE/Vitamina E/Chol/PTX (1:0,4:0,1:0,2)	11,3	13,3		1,6

L'ulteriore aggiunta di DPPC e colesterolo è stata investigata, ma queste formulazioni non hanno dato risultati altrettanto soddisfacenti dal punto di vista del caricamento di farmaco, come è riportato sempre in tabella9, e inoltre si sono dimostrate meno stabili, dando luogo a precipitazione del farmaco ed intorbidimento.

La formulazione selezionata PEG2000-PE/Vitamin E (1:0,4) è stata controllata per la stabilità per quanto riguarda sia le dimensioni sia l'incapsulamento di farmaco. Dopo 3 mesi la distribuzione dimensionale non aveva subito cambiamenti ed il caricamento di PTX era di 2,4 \pm 0,2% (diminuito solo dello 0,5%). I campioni sono stati testati fino a 3 mesi anche dopo liofilizzazione ed i valori sia di dimensioni sia di quantità di farmaco incorporata non hanno subito variazioni rispetto a quelli delle preparazioni liquide di partenza.

E' stata determinata anche la concentrazione micellare critica di queste micelle miste(figura65). La CMC corrisponde alla concentrazione del polimero a cui è stato osservato un rapido aumento di fluorescenza (area evidenziata in grigio) e per le

micelle di PEG2000-PE/Vitamina E (1:0,4) il valore di CMC è stato trovato essere compreso tra 10^{-5} e 10^{-4} M.

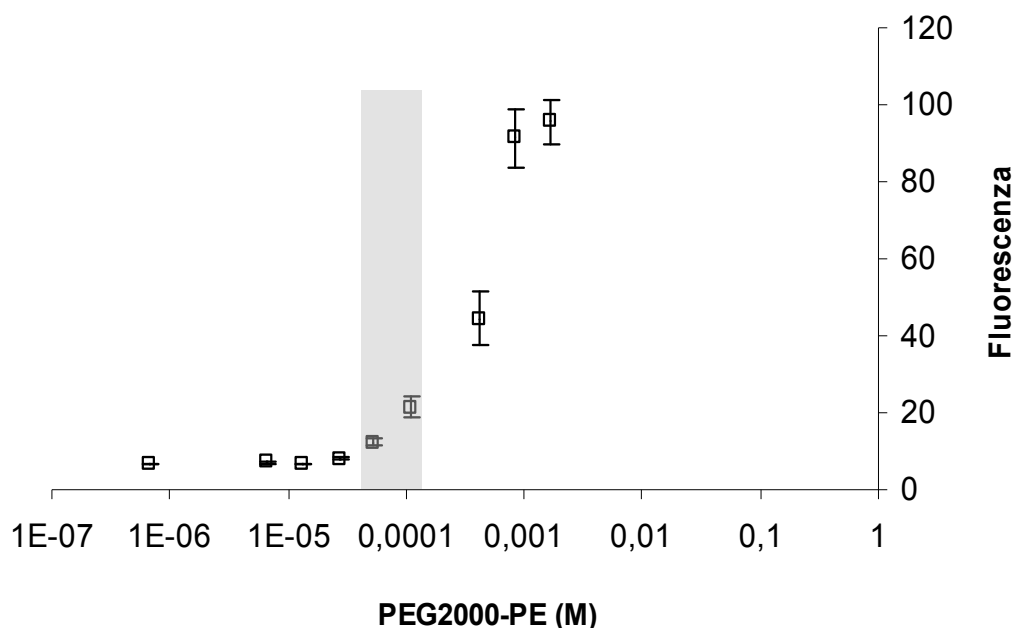


Figura65. Andamento della fluorescenza in funzione della concentrazione di PEG2000-PE.

4.2.2. Formulazione e caratterizzazione dei liposomi

Sono state studiate due formulazioni diverse di liposomi per l'incorporazione del paclitaxel, utilizzando i lipidi fosfatidilcolina (eggPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilglicerolo (DSPG) e colesterolo (Chol).

La composizione delle formulazioni è stata:

1. eggPC:Chol (rapporto molare 7:3)
2. DPPC:eggPC:Chol:DSPG (rapporto molare 4:3:3:1.5)

Il caricamento massimo ottenuto per il paclitaxel in entrambe le formulazioni è stato di circa il 3% (tabella10).

Tabella10. Caricamento di paclitaxel nelle due differenti preparazioni ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

<i>Formulazione</i>	<i>Caricamento PTX %</i>
eggPC/Chol (7:3)	2,9 \pm 0,7
DPPC/eggPC/Chol/DSPG (4:3:3:1,5)	2,6 \pm 0,5

La stabilità dei liposomi con questa quantità di farmaco, però, è risultata molto bassa: dopo qualche giorno il valore di caricamento diminuisce di oltre 10 volte.

L'aggiunta di PTX in concentrazione minore, ovvero l'1% sul totale dei lipidi (che sono in concentrazioni di 2mg/ml), ha invece permesso una incorporazione di quasi tutto il farmaco e una stabilità maggiore: il caricamento del PTX rimane pressochè invariato fino a 2 settimane. Nel caso invece dei campioni liofilizzati, anche dopo 3 mesi i valori sia di dimensioni sia di quantità di farmaco incorporata non hanno subito variazioni rispetto a quelli delle preparazioni liquide di partenza.

Le due formulazioni studiate sono state modificate aggiungendo, quando richiesto, il peptide promotore della penetrazione cellulare TAT (coniugato ad un braccio spaziatore – PEG – di diversa lunghezza) e il lipide cationico con proprietà endosomolitiche [111] DOTAP (dioleoiltrimetilammonio propano).

In tabella11 sono riportate le composizioni e in tabella11bis la caratterizzazione di questi liposomi.

I liposomi di DPPC:eggPC:Chol:DSPG (4:3:3:1,5) sono risultati con una carica superficiale significativamente più negativa rispetto ai liposomi di eggPC:Chol (7:3), mentre i liposomi contenenti il lipide cationico DOTAP presentano una carica

superficiale opposta, ovviamente positiva. La presenza del TATp, invece, non sembra influire significativamente né sulle dimensioni né sulla carica superficiale.

Tabella11. Composizione delle formulazioni di liposomi ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

N.	Composizione (rapporto molare)				DOTAP	TATp- PEG1000-PE	TATp- PEG3400-PE
	DPPC	eggPC	Chol	DSPG			
1		7	3				
2		7	3			2,5%mol	
3		7	3				2,5%mol
4		7	3		10%mol		
5		7	3		10%mol	2,5%mol	
6		7	3		10%mol		2,5%mol
7	4	3	3	1,5			
8	4	3	3	1,5		2,5%mol	

Tabella11bis. Caratterizzazione dei liposomi per caricamento di farmaco, dimensioni e carica superficiale ($n \geq 3$, media \pm deviazione standard).

N.	Diametro (nm)	ζ (mV)	Caricamento PTX %
1	196,4 \pm 23,4	-22,0 \pm 6,8	0,8 \pm 0,2
2	185,5 \pm 23,9	-26,2 \pm 9,2	0,8 \pm 0,1
3	192,4 \pm 16,2	-13,0 \pm 7,5	0,8 \pm 0,1
4	188,5 \pm 12,7	21,8 \pm 14,4	0,7 \pm 0,2
5	170,0 \pm 39,9	4,3 \pm 22,8	0,9 \pm 0,1
6	194,9 \pm 24,0	23,7 \pm 12,0	0,8 \pm 0,1
7	147,4 \pm 3,0	-48,9 \pm 12,9	0,8 \pm 0,2
8	177,3 \pm 34,1	-54,1 \pm 8,4	0,9 \pm 0,1

4.2.3. Captazione ed internalizzazione nelle cellule tumorali delle micelle

La captazione e l'internalizzazione dei sistemi micellari da parte di cellule tumorali è stata misurata tramite citometria di flusso.

Micelle costituite da PEG2000-PE/Vitamina E (1:0,4) con e senza TATp-PEG3400-PE, marcate con Rhodamina-PE come fluorocromo, sono state incubate con cellule BT-20 in sospensione e sotto agitazione.

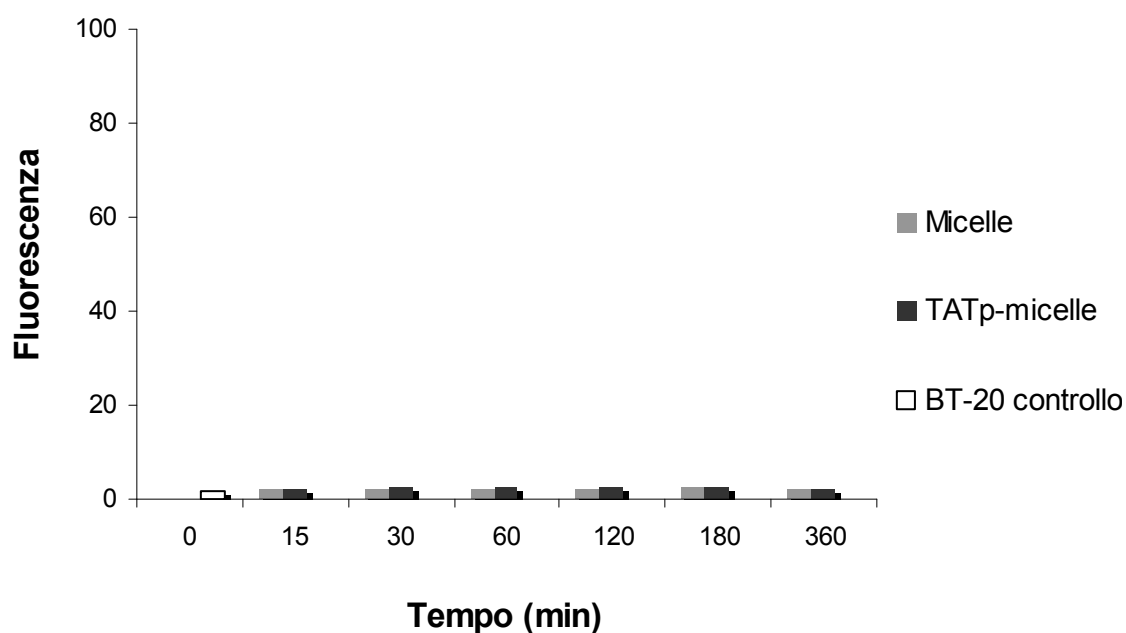


Figura66. Andamento della fluorescenza delle cellule in funzione del tempo di incubazione.

Come è possibile vedere in figura66, a paragone con l'autofluorescenza basale del controllo (cellule BT-20 senza alcun campione) le cellule incubate con i campioni fluorescenti per differenti tempi non mostrano nessun incremento nella fluorescenza, che dovrebbe invece indicare che il nanosistema ha interagito con la superficie cellulare o è stato già internalizzato. Inoltre, anche i campioni di TATp-micelle non

mostrano alcuna differenza nell'up-take rispetto sia al controllo negativo sia ai campioni di micelle non funzionalizzate.

Dal momento che non è stata rilevata alcuna capatazione e internalizzazione delle micelle da parte delle cellule, almeno fino a 6 ore di incubazione, è stato controllato se ciò dipendesse dalla lunghezza della catena del PEG e quindi sono state preparate e testate nello stesso modo micelle di PEG750-PE da solo o con il 2,5% di TATp-PEG3400-PE, sempre marcate con Rhodamina-PE. E' stato anche verificato che la quantità di flourocromo fosse sufficiente a dare un segnale e quindi Rhodamina-PE da sola è stata incubata per 60 e 360 minuti, nella stessa quantità presente nelle micelle, come controllo positivo (figura67).

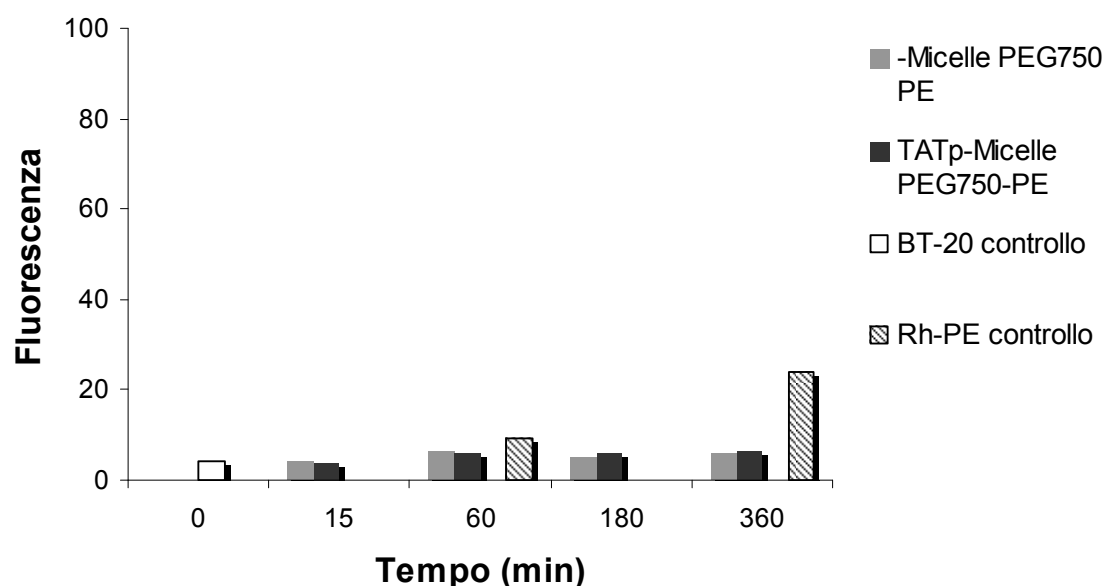


Figura67. Andamento della fluorescenza delle cellule in funzione del tempo di incubazione.

Con la sola rhodamina-PE le cellule mostrano un aumento nell'intensità di fluorescenza, paragonata con il controllo. Le cellule trattate con micelle fluorescenti, invece, danno un segnale di fluorescenza che non si discosta dal valore di autofluorescenza basale delle cellule non incubate con campione, né si vedono differenze tra micelle non funzionalizzate e TATp-micelle.

La corona idrofila di PEG, quindi, sembra diminuire o impedire l'interazione con le cellule.

4.2.4. Captazione ed internalizzazione nelle cellule tumorali dei liposomi

Anche per i liposomi è stata verificata la captazione e l'internalizzazione da parte delle cellule tumorali BT-20 tramite citometria di flusso. Per questi esperimenti sono stati utilizzati liposomi marcati con FITC-destrano4400. Le cellule in sospensione sotto agitazione (figure68,69), o coltivate in piastre da 6 pozzetti sia in mezzo senza FBS sia in mezzo di coltura DMEM completo (contenente il siero) (figure70,71) sono state incubate al buio per diversi tempi con i campioni di liposomi fluorescenti.

L'esperimento è stato mirato a mettere in evidenza principalmente se vi fosse una differenza nella internalizzazione da parte delle cellule tra i liposomi normali e quelli modificati con il TATp. A questo scopo sono state testate entrambe le formulazioni liposomiali con differente composizione lipidica, sia semplici sia funzionalizzate (figure68,69).

E' stato poi verificato se vi fosse una differenza nell'up-take dei sistemi liposomiali tra cellule in sospensione e cellule aderenti, confrontando i valori presentati in figura69 e figura70.

E' stato valutato inoltre se vi fosse una differenza nell'up-take dei liposomi in assenza e in presenza del siero nel mezzo di incubazione DMEM (figure70,71).

Infine, confrontando i valori di fluorescenza riportati in figura 70 con quelli riportati in figura71, è stato controllato se vi fosse una differenza nei valori di fluorescenza tra l'analisi dei campioni effettuata subito dopo l'incubazione ed il lavaggio delle cellule e l'analisi effettuata dopo aver incubato le cellule per ulteriori 2 ore in DMEM completo privo di campione (per permettere l'eventuale desorbimento di materiale solo adsorbito alla superficie cellulare).

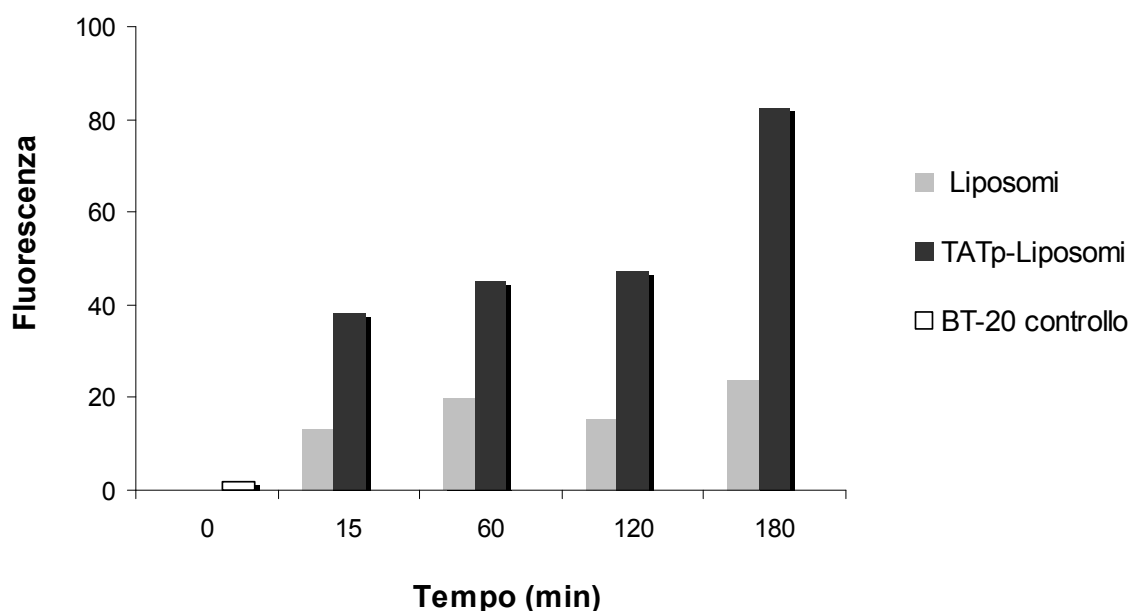


Figura68. Andamento della fluorescenza delle cellule (BT-20 in sospensione) in funzione del tempo di incubazione con liposomi eggPC/Chol (7:3).

Con i liposomi di composizione eggPC/Chol è possibile notare fin dai primi minuti un aumento della fluorescenza delle cellule, che si discosta dall'autofluorescenza basale. Questo indica che questi liposomi sono in grado di interagire con la superficie cellulare ed eventualmente venire internalizzati. Inoltre

vi è una notevole differenza di fluorescenza tra le cellule incubate con i liposomi semplici e quelle incubate con i liposomi funzionalizzati con il TATp.

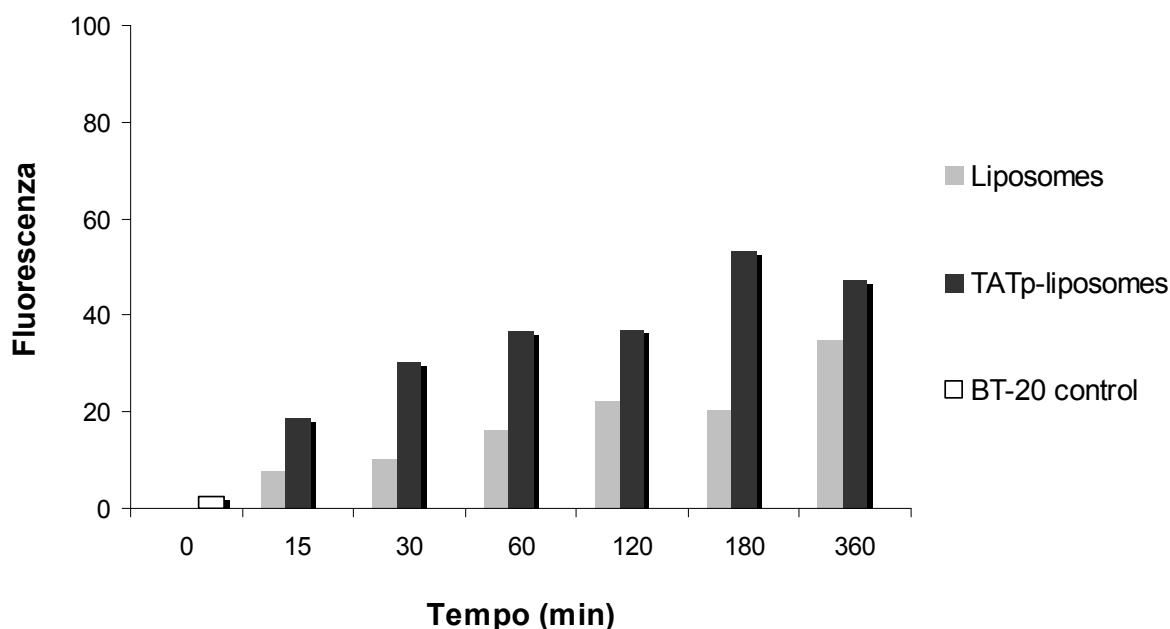


Figura69. Andamento della fluorescenza delle cellule (BT-20 in sospensione) in funzione del tempo di incubazione con liposomi (4:3:3:1,5).

Con i liposomi di composizione DPPC/eggPC/Chol/DSPG valgono le stesse considerazioni fatte per l'altra formulazione: c'è stato un incremento nella fluorescenza delle cellule incubate coi campioni, rispetto al controllo e questo indica che c'è stata una interazione dei colloidi fluorescenti con le cellule ed è evidente una captazione maggiore dei liposomi funzionalizzati con il TATp rispetto ai liposomi semplici.

Quando incubati con cellule aderenti, sembra che i liposomi interagiscano con le cellule ma in misura minore all'inizio e anche la differenza tra liposomi semplici e

funzionalizzati è molto meno evidente (figura70). Col trascorrere del tempo però la captazione aumenta, così come la differenza tra liposomi e TATp-liposomi.

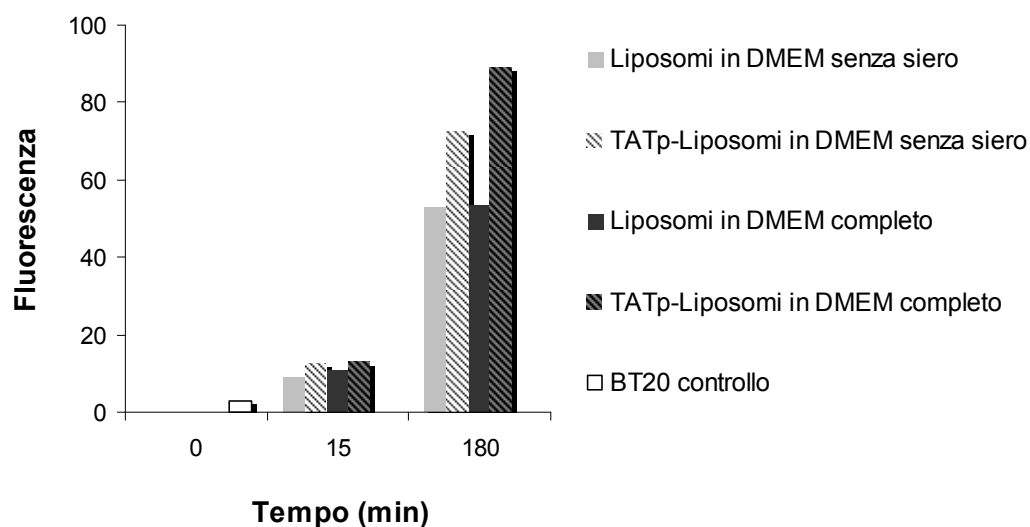


Figura70. Andamento della fluorescenza delle cellule (BT-20 aderenti) in funzione del tempo di incubazione con liposomi DPPC/eggPC/Chol/DSPG (4:3:3:1,5).

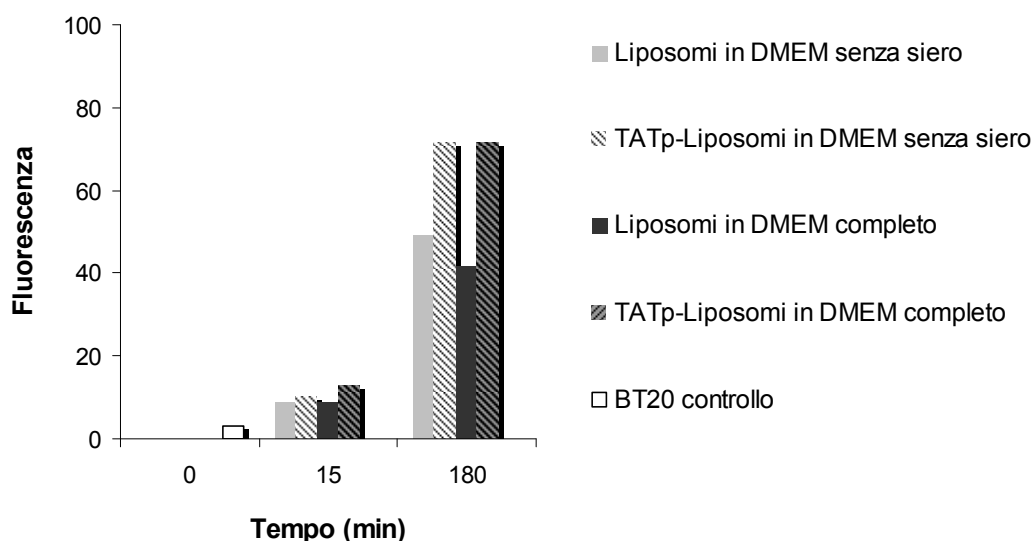


Figura71. Andamento della fluorescenza delle cellule (BT-20 aderenti) in funzione del tempo di incubazione con liposomi DPPC/eggPC/Chol/DSPG (4:3:3:1,5). Cellule incubate dopo il lavaggio per altre 2 ore con solo DMEM completo.

La presenza o l'assenza di siero nel mezzo di incubazione non sembra influire molto sulla captazione e internalizzazione dei sistemi liposomiali, sia per i liposomi normali sia per quelli modificati con il peptide (figure 70,71). L'incubazione in mezzo privo di campione per altre 2 ore successivamente al lavaggio non ha portato a sostanziali differenze (figura 71).

4.2.5. Citotossicità delle micelle

Le micelle costituite da PEG2000-PE e Vitamina E (1:0,4) con paclitaxel incapsulato sono state testate per la citotossicità sulla linea cellulare del tumore alla mammella BT-20.

Per prima cosa è stata valutata la citotossicità dovuta alla formulazione come tale, senza paclitaxel (figura 72), in cui emerge che il PEG2000-PE non è tossico per le cellule fino alla concentrazione di 1mg/ml.

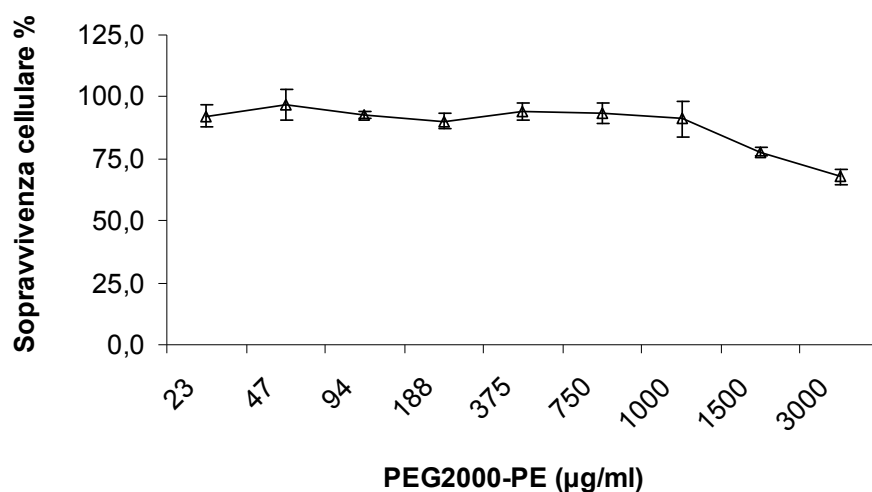


Figura 72. Citotossicità su BT-20 delle micelle senza PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

I test con micelle contenenti il farmaco sono stati fatti con concentrazioni di PEG2000-PE inferiori a quella tossica (1mg/ml) e sono stati mirati a verificare se vi sia una differenza nella attività citotossica *in vitro* tra le micelle normali e quelle funzionalizzate con il TATp. I campioni sono anche stati confrontati con uguali concentrazioni di paclitaxel libero.

Paragonando micelle veicolanti il farmaco e il farmaco libero si nota che quest'ultimo sembra essere meno citotossico a concentrazioni maggiori, mentre non vi è alcuna differenza tra micelle e TATp-micelle (figura73). La presenza del TAT peptide sulla superficie delle micelle caricate con il paclitaxel, quindi, sembra non portare ad un aumento della citotossicità della formulazione rispetto alle micelle semplici. Questo risultato non stupisce dal momento che, come è stato visto, non vi è alcuna differenza nella captazione da parte delle cellule dei due diversi sistemi micellari.

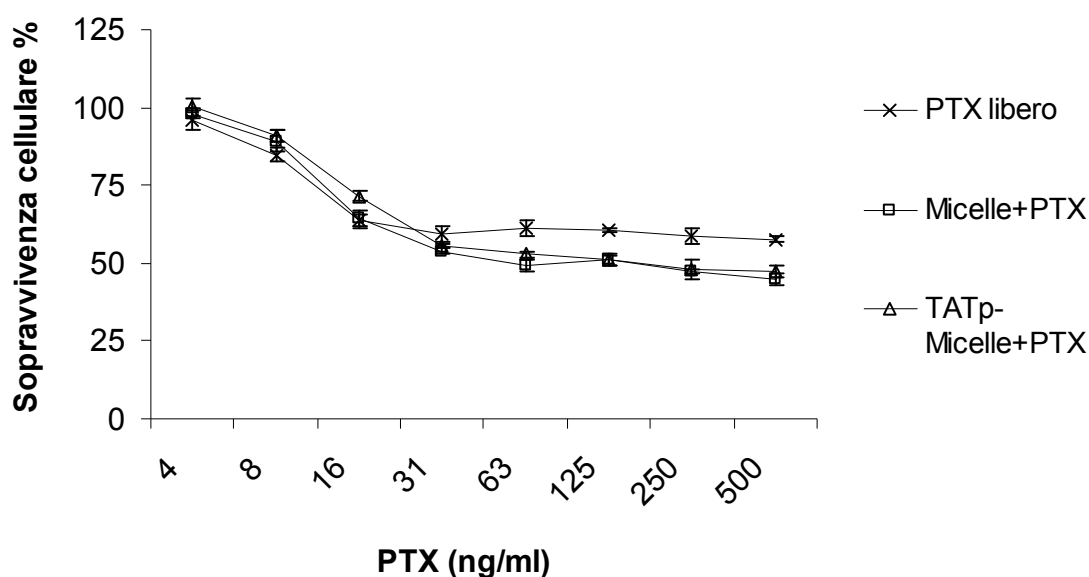


Figura73. Citotossicità su BT-20 delle micelle con PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

4.2.6. Citotossicità dei liposomi

La citotossicità dei liposomi caricati con il paclitaxel è stata testata a 72 ore, poiché il meccanismo d'azione del farmaco richiede tempo dato che promuove il blocco della polimerizzazione della tubulina che costituisce i microtubuli del citoscheletro, interferendo col ciclo vitale di divisione cellulare e causando infine la morte della cellula.

Gli studi di citotossicità sono stati fatti confrontando l'effetto del farmaco libero, dei liposomi caricati col paclitaxel (entrambe le formulazioni di differente composizione lipidica) e dei TATp-liposomi caricati con il farmaco su entrambe le linee cellulari del tumore alla mammella umano BT-20 e MCF-7.

Per cogliere una differenza in citotossicità tra liposomi semplici e liposomi funzionalizzati con il TATp, eventualmente dovuta ad una maggiore internalizzazione causata dal peptide promotore della penetrazione cellulare, tutti i test di citotossicità sono stati eseguiti seguendo lo stesso protocollo, ovvero lavando le cellule dopo 2 ore di incubazione con i campioni ed incubandole nuovamente con mezzo di coltura fresco per 72 ore.

Tutte le formulazioni di liposomi senza il PTX sono state testate e non è stata riscontrata citotossicità ad alcuna delle concentrazioni utilizzate nei test con i liposomi contenenti il farmaco.

Di seguito sono riportati i valori di sopravvivenza cellulare % (figure 74-77) in cui sono riassunti i risultati di citotossicità per i vari campioni: paclitaxel come tale, liposomi caricati con paclitaxel, semplici e con superficie modificata e di diversa composizione lipidica.

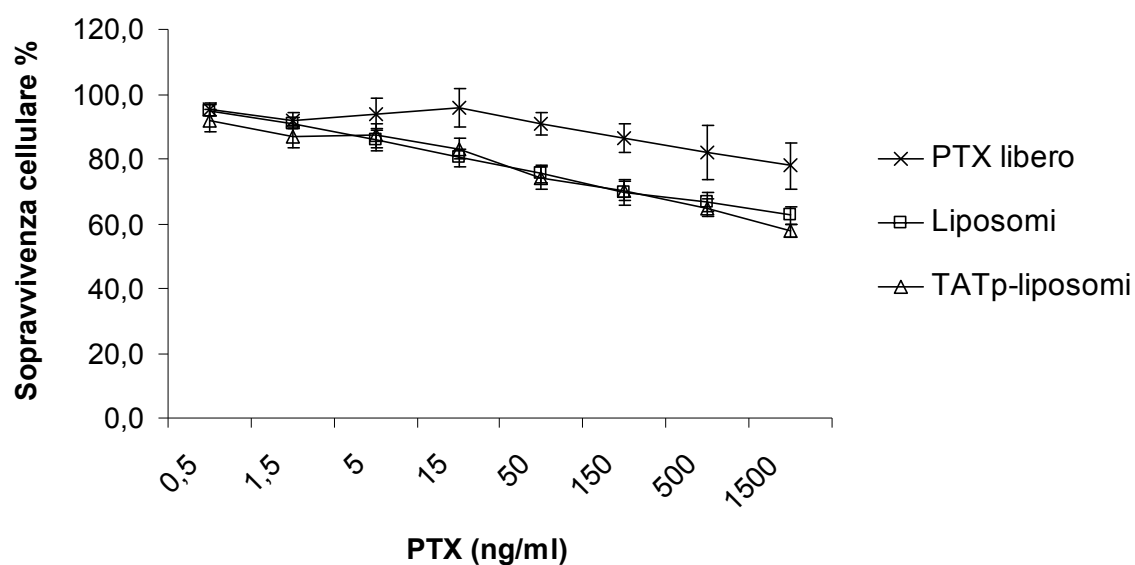


Figura74. Citotossicità su BT-20 dei liposomi eggPC/Chol con PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

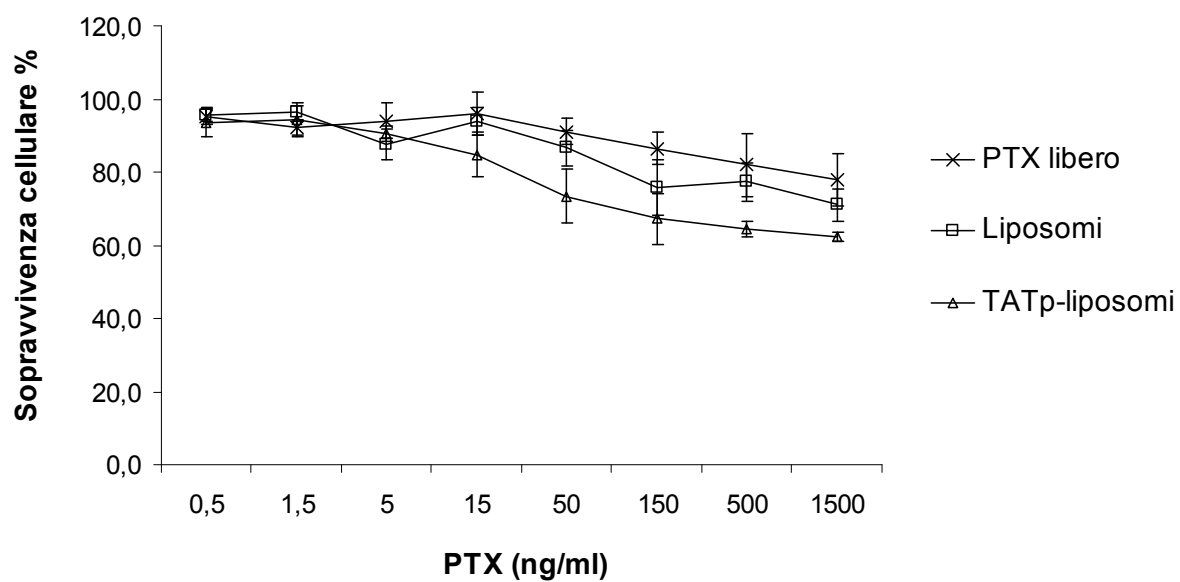


Figura75. Citotossicità su BT-20 dei liposomi DPPC/eggPC/Chol/DSPG con PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

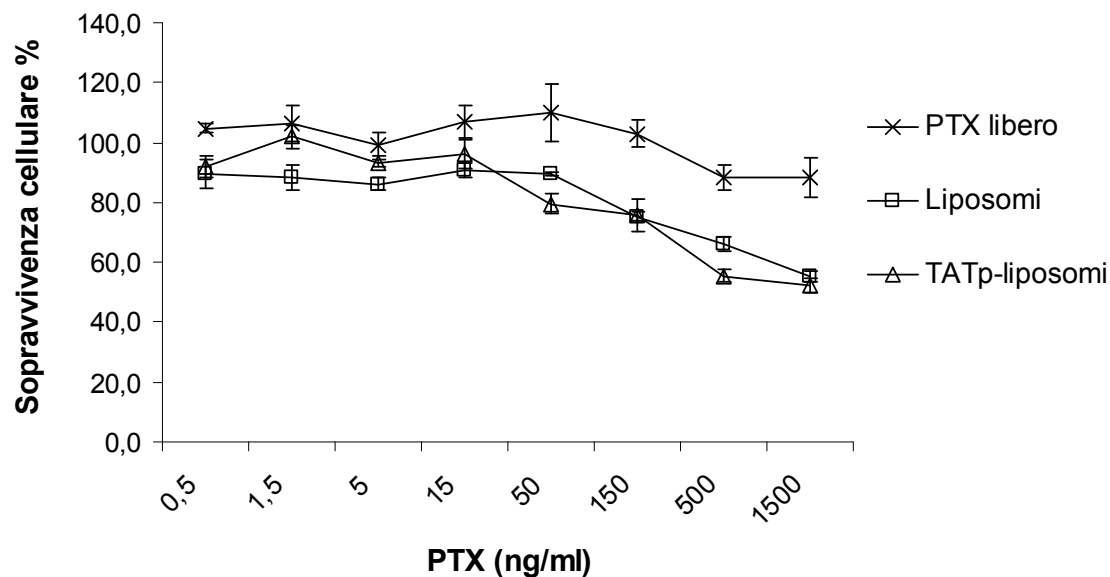


Figura76. Citotossicità su MCF-7 dei liposomi eggPC/Chol con PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

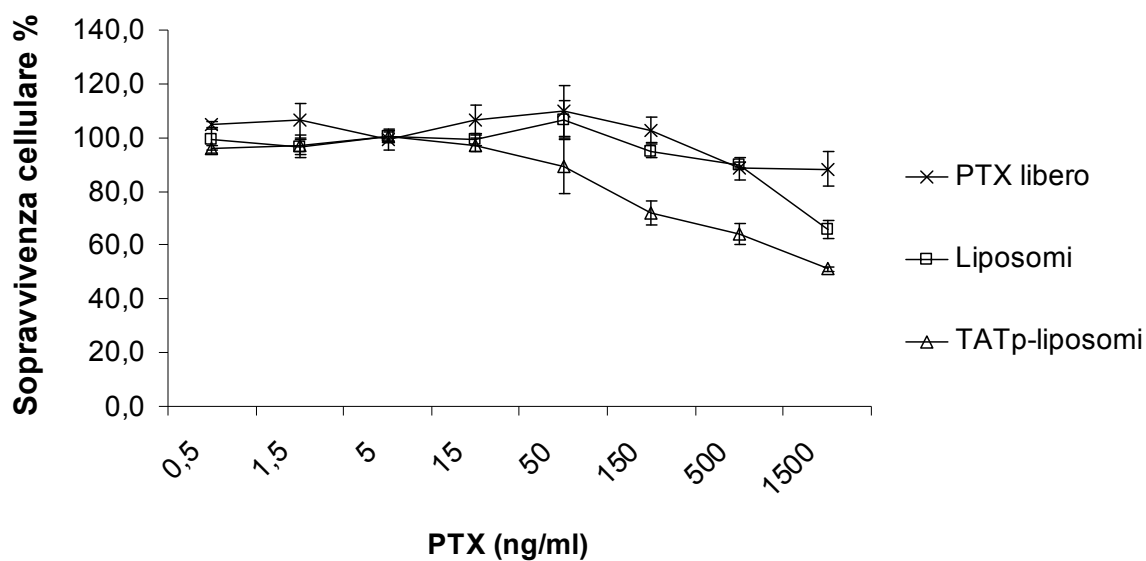


Figura77. Citotossicità su MCF-7 dei liposomi DPPC/eggPC/Chol/DSPG con PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

Sebbene vi fosse una differenza nella captazione e internalizzazione tra liposomi semplici e funzionalizzati con TATp, gli studi di citotossicità con entrambe le linee cellulari non hanno evidenziato una superiorità dei TATp-liposomi, almeno nel caso dei liposomi composti da ePC/Chol (7:3), mentre nel caso dei liposomi costituiti da DPPC/ePC/Chol/DSPG (4:3:3:1.5) sembra che ci sia una differenza tra le formulazioni semplici e quelle funzionalizzate, anche se diminuisce la differenza di efficacia tra i liposomi semplici ed il farmaco libero.

Per chiarire se la mancanza di una differenza in citotossicità, soprattutto per le formulazioni di ePC/Chol, fosse dovuta alla cattura dei liposomi in endosomi o lisosomi sono state preparate e testate le stesse formulazioni contenenti in aggiunta il DOTAP, lipide cationico, utilizzato per le sue proprietà fusogeniche e destabilizzanti della membrana anche come agente endosomolitico. Inoltre, per verificare che non ci fosse una influenza sulla efficacia del peptide dovuta alla lunghezza della catena del PEG coniugato con il TATp, sono state preparate e testate per la citotossicità le stesse formulazioni ma funzionalizzate con TATp-PEG3400-PE (anziché con TATp-PEG1000-PE, usato solitamente).

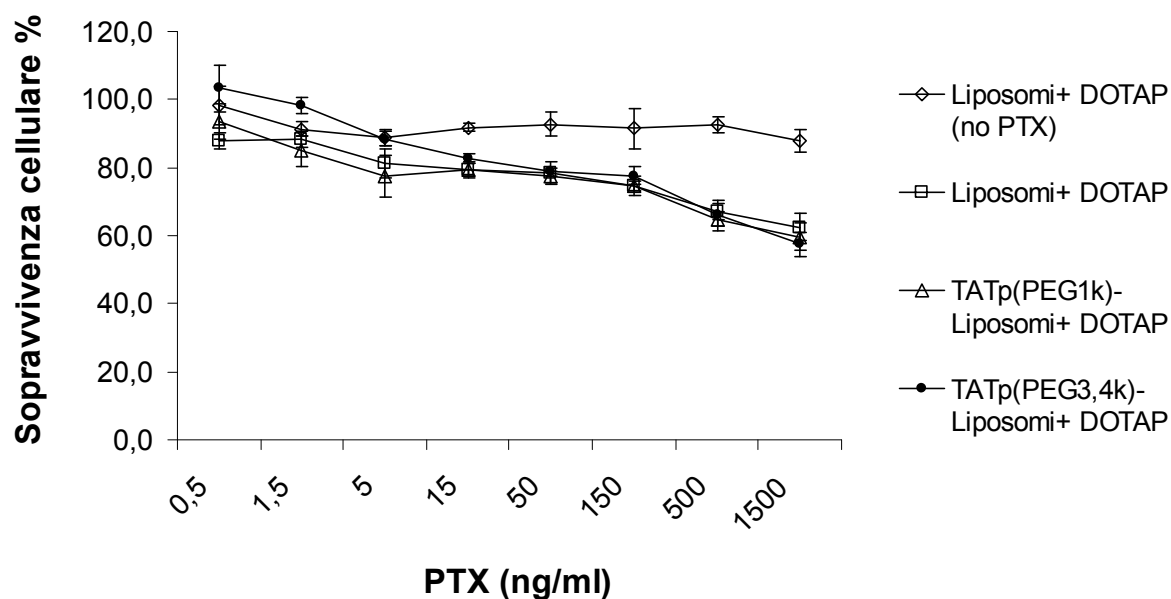


Figura78. Citotossicità su BT-20 dei liposomi eggPC/Chol con PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

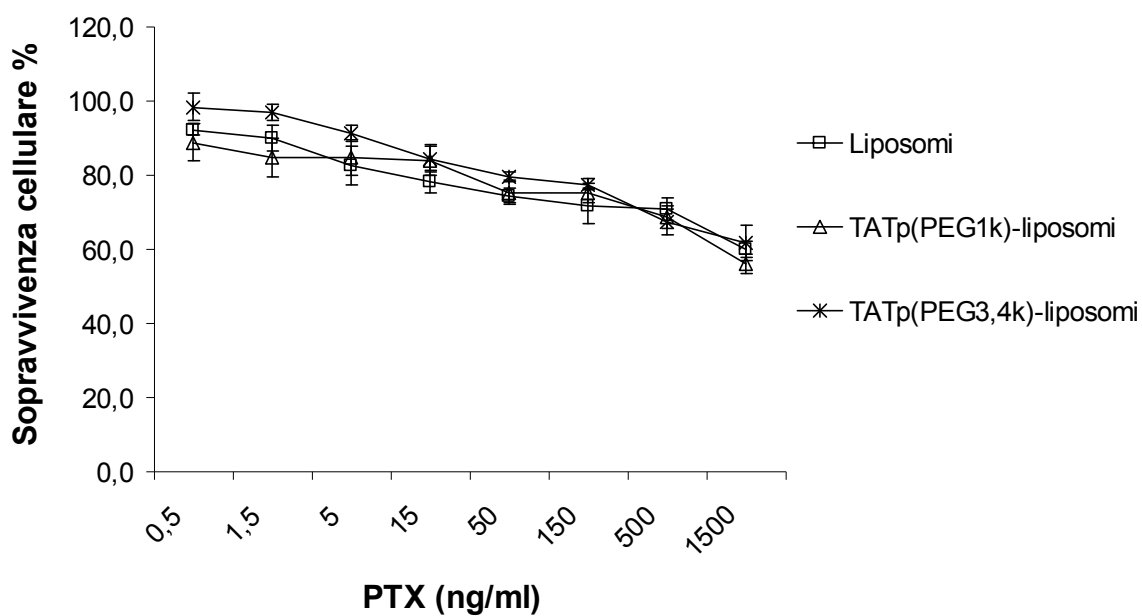


Figura79. Citotossicità su BT-20 dei liposomi eggPC/Chol con PTX ($n \geq 3$, media \pm S.E.M.).

Come per le precedenti formulazioni, anche in questo caso non è stato possibile ottenere un incremento significativo in citotossicità dei TATp-liposomi rispetto ai liposomi normali e il DOTAP aggiunto non ha portato ad alcun miglioramento.

Anche la lunghezza della catena del PEG coniugato con il TATp non sembra avere influenza nel cambiare l'azione citotossica dei liposomi.

4.2.7. Determinazione della apoptosi

Nell'ottica di studiare l'azione citotossica e di essere sicuri che non ci fosse differenza tra le preparazioni liposomiali normali e quelle funzionalizzate con il TATp, si è scelto di utilizzare anche un altro metodo di rilevamento della tossicità sulle cellule, diverso dal test dell'MTT: valutare la variazione del grado di apoptosi delle cellule indotta dal farmaco paclitaxel.

Per misurare l'apoptosi è stato utilizzato il citofluorimetro e come marcatori i due fluorocromi Annexina V-FITC e ioduro di propidio (PI). L'Annexina V possiede una alta affinità per legare la fosfatidilserina (PS), che nelle cellule apoptotiche viene traslocata dal lato interno a quello esterno della membrana plasmatica ed esposta all'ambiente esterno, mentre il PI si lega agli acidi nucleici delle cellule e che è in grado di marcare solo le cellule con la membrana compromessa e che sono in uno stadio avanzato di morte.

In questo test, le cellule che sono risultate positive solo all'Annexina V-FITC (fluorescenza verde) sono state considerate in apoptosi iniziale, le cellule positive solo al PI (fluorescenza rossa) sono state considerate necrotiche e quelle positive sia all'Annexina V-FITC sia al PI sono state considerate in apoptosi avanzata.

Anche in questo caso, cellule BT-20 sono state trattate per 2 ore con PTX libero e/o liposomi caricati con PTX, come descritto per i test di citotossicità, lavate con

PBS, incubate con mezzo di coltura fresco privo di campione per diversi tempi. Al termine dell'incubazione le cellule sono state raccolte, marcate con i fluorocromi secondo protocollo e lette al citofluorimetro. Per questa analisi le cellule non sono state fissate, poiché si crea una falsa risposta positiva.

I risultati ottenuti sono riassunti nelle figure 80-83. Vi è un grado di apoptosi basale che è dato dalle cellule di controllo, incubate senza nessun campione, che è costante a tutti i tempi (8, 12, 24, 48 e 72 ore) ed ha un valore di circa 10%, che corrisponde alla percentuale di cellule in apoptosi rispetto alle cellule totali. Il picco di apoptosi si ha tra 8 e 12 ore (figure 80,81), dopodichè andando a misurare la apoptosi a tempi superiori alle 24 ore emerge che i valori si avvicinano sempre di più al grado di apoptosi basale (figure 82-84). Questo sembra scontrarsi con i dati di citotossicità ma è spiegabile con il fatto che sono test diversi che misurano parametri diversi: nel test con l'MTT si misura la percentuale di cellule vitali, rispetto a cellule non trattate, che quindi crescono più velocemente. Il paclitaxel va ad interferire con la divisione cellulare, per cui si inizia a vedere una differenza tra cellule trattate e non solo dopo 48-72 ore. Con l'apoptosi, invece, si valuta una tossicità diretta che si manifesta in poche ore, dopodichè i valori del grado di apoptosi ritornano al livello di base.

Tuttavia, come per i test di citotossicità con MTT, neanche con la determinazione del grado di apoptosi è stato possibile evidenziare una differenza statisticamente significativa tra le differenti formulazioni testate.

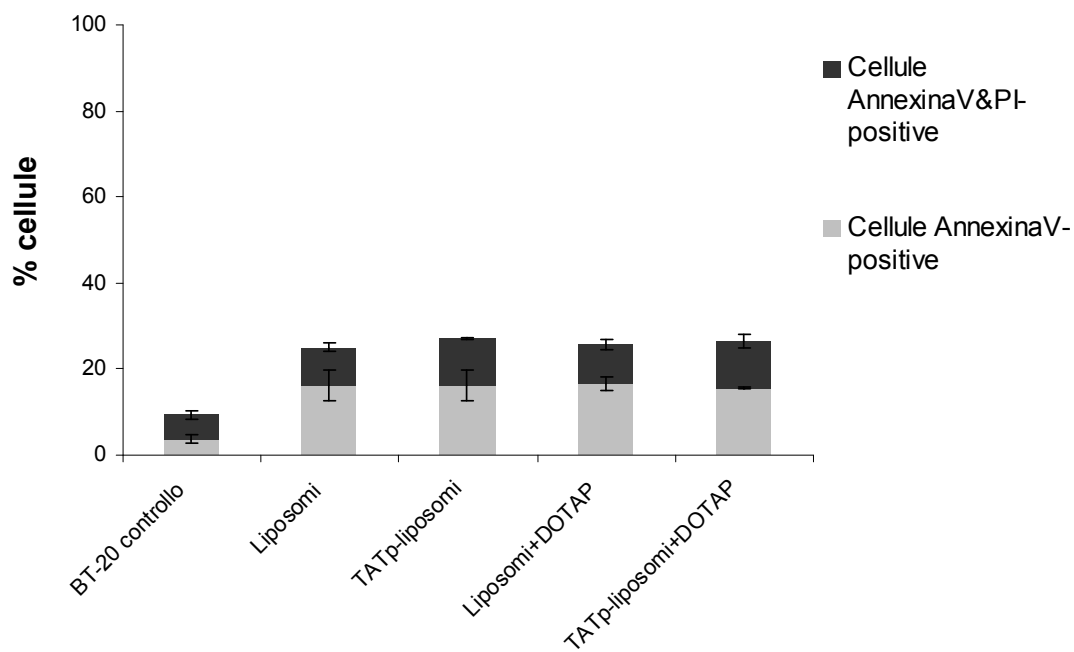


Figura80. Apoptosi indotta in BT-20 (dopo 8h) con liposomi eggPC/Chol con PTX.

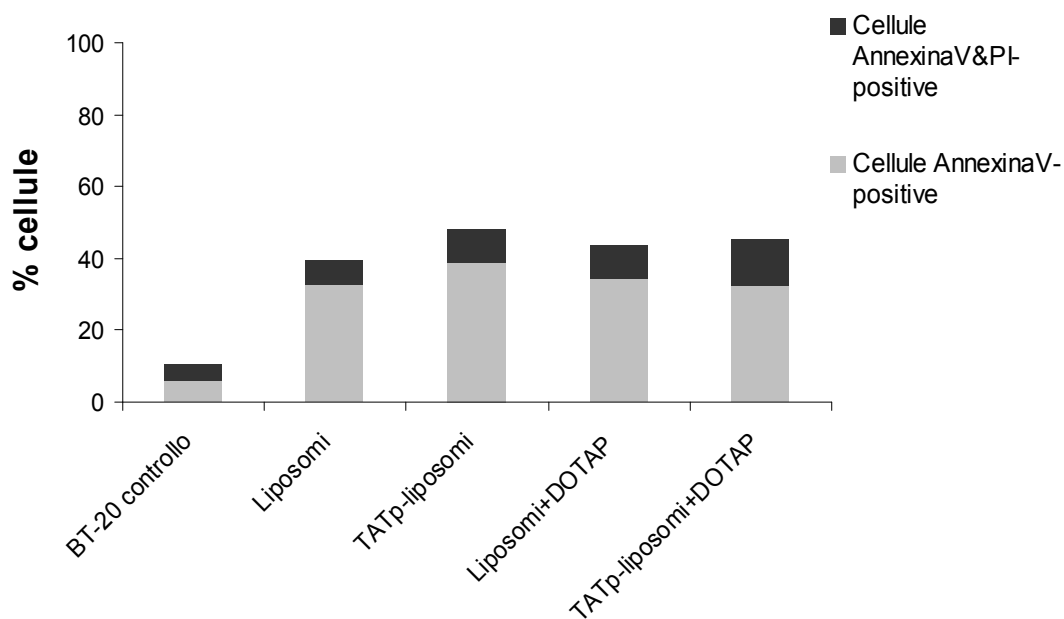


Figura81. Apoptosi indotta in BT-20 (dopo 12 ore) con liposomi eggPC/Chol con PTX.

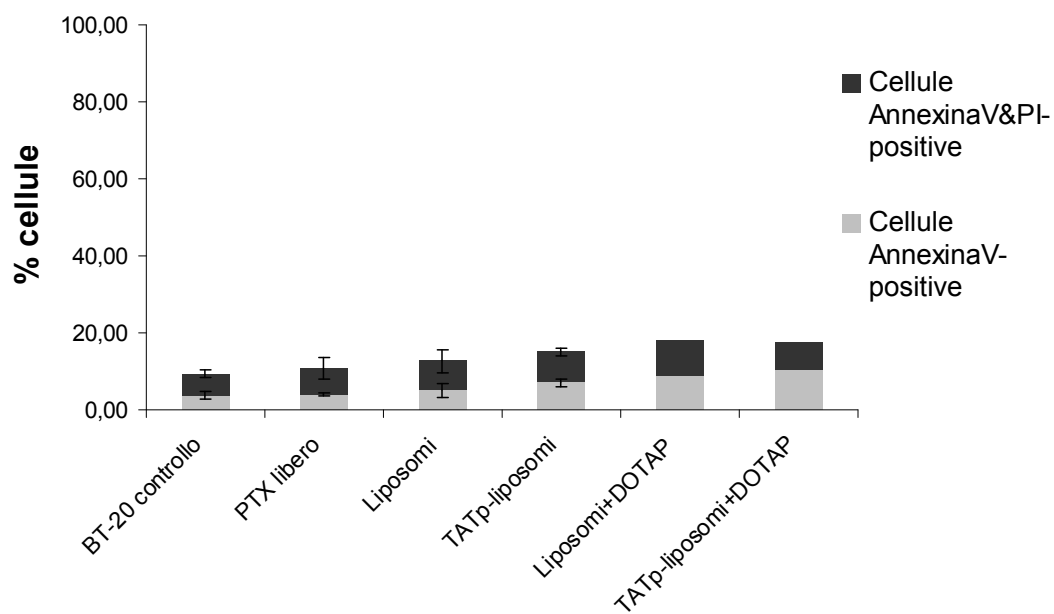


Figura82. Apoptosi indotta in BT-20 (dopo 24 ore) con liposomi eggPC/Chol con PTX.

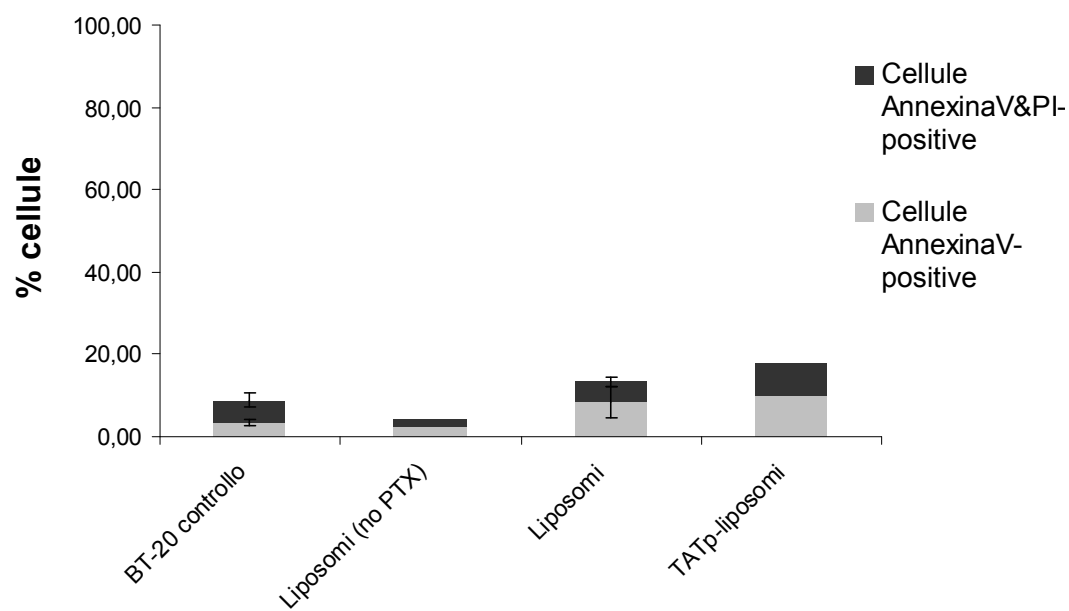


Figura83. Apoptosi indotta in BT-20 (dopo 48 ore) con liposomi eggPC/Chol con PTX.

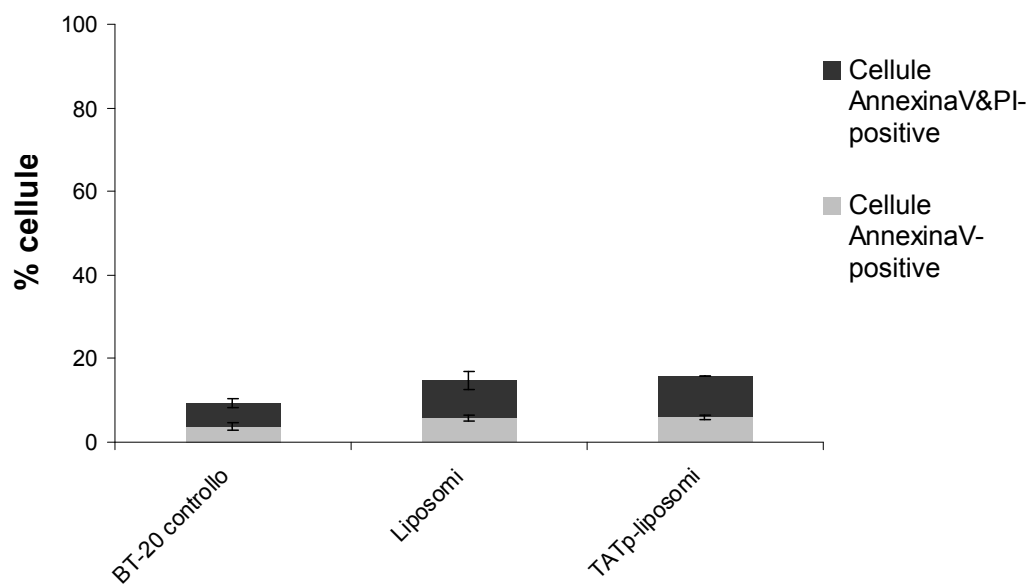


Figura84. Apoptosi indotta in BT-20 (dopo 72 ore) con liposomi eggPC/Chol con PTX.

5. DISCUSSIONE

Per trovare nuove formulazioni per aumentare la biodisponibilità dei farmaci antitumorali con caratteristiche sfavorevoli, portando ad un aumento dell'efficacia e ad una diminuzione della tossicità, sono state impiegate le nanotecnologie farmaceutiche. In particolare sono stati studiati nanosistemi a base di lecitina e chitosano (NLC), per la veicolazione del tamoxifene citrato, liposomi e micelle, per la veicolazione del paclitaxel.

I nanosistemi lecitina/chitosano si sono dimostrati molto efficienti nell'incorporare e solubilizzare un farmaco lipofilo e scarsamente solubile in acqua come il tamoxifene citrato, arrivando ad un caricamento del farmaco fino al 30% (p/p). Nello studio di incapsulamento, variando la concentrazione di tamoxifene citrato, è stata rilevata una forte influenza del farmaco sulla struttura, evidente fin dall'inizio dai risultati delle analisi dimensionali, anche se il potenziale zeta è rimasto sostanzialmente invariato e sancisce che la superficie è caricata positivamente. Confrontando questi nanosistemi lecitina/chitosano/tamoxifene con sistemi in assenza di chitosano si è visto che il tamoxifene viene incorporato nel doppio strato fosfolipidico della lecitina (poiché la carica superficiale è opposta a quella dei liposomi di sola lecitina); questo è probabilmente dovuto ad una interazione di tipo elettrostatico tra la lecitina, carica negativamente, ed il tamoxifene, carico positivamente, che entra in competizione con il chitosano, anch'esso carico positivamente. Si è pensato che il farmaco rimpiazzasse in parte il chitosano, quando quest'ultimo è presente nella preparazione. Una iniziale conferma di questa teoria si è avuta dalle analisi morfologiche all'AFM che indicano che quando nella preparazione è presente anche il tamoxifene citrato, la struttura è meno rigida e più appiattita, in confronto con le nanoparticelle senza farmaco: il chitosano, che conferisce una certa rigidità, sembra essere meno coinvolto nella struttura.

Anche dalle immagini TEM e crio-TEM emerge chiaramente una differenza sostanziale nella struttura dei nanosistemi chitosano/lecitina in assenza e in presenza del farmaco: il tamoxifene sembra conferire un maggiore ordine, creando un sistema multistrato, come inoltre dimostrato dalla caratterizzazione fatta da un punto di vista fisico, con analisi di small angle neutron scattering e raggi X [112].

Per confermare da un punto di vista più analitico che quando il farmaco è presente il chitosano è meno coinvolto nella struttura dei nanosistemi, è stato dosato con saggio colorimetrico il chitosano presente in soluzione, o comunque meno legato alla lecitina, alla fine del processo di formazione delle nanoparticelle. I risultati sono stati che la quantità di chitosano in soluzione aumenta con l'aumentare della quantità di farmaco nella preparazione e raggiunge un valore di circa il 100% con il sistema NLC-TAM1200µg/ml. La presenza del chitosano in queste preparazioni, tuttavia, è molto importante poiché è stato verificato che interagisce in qualche modo con il colloide svolgendo una azione stabilizzante, poiché nei liposomi di lecitina con elevate concentrazioni di tamoxifene il sistema non è stabile e floccula.

Dopo aver caratterizzato questi nanosistemi in presenza ed in assenza di farmaco, è stato valutato il rilascio del tamoxifene citrato in fluido gastrico simulato a partire dalla sospensione colloidale. E' stato visto che la concentrazione di TAM raggiunge subito un plateau che rimane pressochè costante anche fino a 24 ore. In realtà non è un vero e proprio rilascio poiché nel mezzo è stata trovata una quantità di TAM uguale o leggermente superiore alla quantità di farmaco che non è incapsulata (ovvero quella che è già in soluzione). Analizzando nel tempo al light-scattering il sistema colloidale messo in fluido gastrico simulato, si vede che esso non si rompe e resiste anche a lungo nell'ambiente fortemente acido. Quindi si può concludere che il sistema NLC praticamente non rilascia il tamoxifene citrato, almeno quello

incapsulato negli strati più interni, ma potrebbe essere in grado di veicolarlo fino al tessuto bersaglio.

Successivamente, da queste nanosospensioni sono state prodotte delle polveri tramite spray-drying, utilizzando come eccipiente le β -ciclodestrine. Sebbene da una prima analisi di dimensioni e carica superficiale del sistema colloidale fosse sembrato che l'introduzione delle β -ciclodestrine non avesse influenza, da una ulteriore analisi del caricamento del farmaco nelle nanoparticelle si è visto che questo eccipiente sposta l'equilibrio del farmaco a favore dell'ambiente esterno, diminuendone l'incapsulamento e questo effetto è proporzionale alla quantità di eccipiente aggiunto. Dati questi risultati e dal momento che il tamoxifene citrato è una molecola con caratteristiche tali per cui può interagire con le β -ciclodestrine, in seguito anche a conferma tramite analisi DSC, è stato verificato che si forma un complesso di inclusione. L'impiego di questo eccipiente ha portato alla produzione di polveri con una buona resa di processo e buone caratteristiche tecnologiche. Le microparticelle così ottenute hanno una distribuzione dimensionale con diametro compreso tra $1\mu\text{m}$ e $10\mu\text{m}$ ed un recupero del farmaco vicino al 100%. Dall'analisi morfologica effettuata al SEM si può notare che le microparticelle hanno una superficie liscia e una bassa densità.

Queste polveri di β -ciclodestrine si ridisperdono facilmente in acqua, ricostituendo una sospensione colloidale, anche se di dimensioni maggiori rispetto ai nanosistemi di partenza, probabilmente a causa del processo di spray-drying.

Testando il rilascio di tamoxifene citrato dalle microparticelle, sempre in fluido gastrico simulato, essendo destinate ad una somministrazione orale, si può notare che il profilo di rilascio si scompone in due parti: una prima fase molto rapida, in cui una certa quantità di farmaco diviene subito disponibile, e una seconda fase stazionaria in cui la quantità di farmaco presente in soluzione non tende ad aumentare. Inoltre, variando la quantità di β -ciclodestrine si può “modulare” la

quantità di farmaco rilasciato immediatamente, poiché spostano l'equilibrio tra farmaco incapsulato e farmaco in soluzione a favore di quest'ultimo formando complessi di inclusione.

Per verificare la citossicità sia dei sistemi colloidali iniziali sia delle polveri spray-dried con e senza farmaco, sono stati effettuati dei test su cellule del tumore alla mammella, sensibili all'azione del tamoxifene citrato. Dai risultati emerge che entrambe le formulazioni posseggono una azione citotossica e sono attive quanto il farmaco libero o anche di più, con una differenza statisticamente significativa nel range di concentrazione della EC50, che è stato trovato essere di circa 10µg/ml di tamoxifene citrato. Anche nel caso che la citotossicità di farmaco libero e farmaco nelle nanoparticelle fosse la stessa è da tenere in conto che, per confrontare uguali concentrazioni di tamoxifene citrato, è stato necessario sciogliere il principio attivo come tale in metanolo, mentre in realtà la sua solubilità in ambiente acquoso è molto più bassa, problema a cui i nanosistemi e le microparticelle di β-ciclodestrine pongono rimedio.

Infine, essendo prevista una somministrazione orale e tenendo conto che nell'assorbimento intestinale la via più probabile per particelle di dimensioni fino a 500nm è il passaggio transcellulare dovuto all'endocitosi ad opera degli enterociti, si è pensato di valutare con un test *in vitro* la captazione e l'internalizzazione dei nanosistemi usando come modello cellule CACO2. Dai risultati sembra che la captazione avvenga in tempi molto brevi e si raggiunga quasi subito un plateau che prosegue fra 3 e 8 ore, con un leggero aumento solo alla ventiquattresima ora. Inoltre l'interazione con le cellule dei nanosistemi contenenti tamoxifene è leggermente inferiore a quella misurata per i nanosistemi senza il farmaco. Questo potrebbe essere dovuto ad una lieve azione citotossica del tamoxifene, che potrebbe modificare le capacità di internalizzazione delle cellule, o ad una differenza delle caratteristiche di superficie, probabilmente più dovuto alla composizione (minor

quantità di chitosano nelle preparazioni con il farmaco) poiché la carica è positiva per entrambi e il valore del potenziale zeta è paragonabile. Per verificare, inoltre, che la fluorescenza misurata fosse dovuta ad una internalizzazione e non ad un semplice adsorbimento aspecifico dei nanosistemi sulla superficie cellulare, lo stesso esperimento è stato condotto oltre che a 37°C, temperatura ottimale per l'attività cellulare, anche a 4°C, temperatura a cui sia il trasporto attivo sia quello passivo dovrebbero essere bloccati o quantomeno rallentati, mentre l'adsorbimento aspecifico dovrebbe essere indipendente dalla temperatura. A 4°C non è stata vista una differenza di fluorescenza tra cellule incubate con NLC e cellule incubate con NLC-TAM, ma soprattutto la fluorescenza ottenuta è stata di gran lunga inferiore, almeno fino alla ottava ora, quando c'è stato un considerevole aumento. Alla ventiquattresima ora la percentuale di cellule fluorescenti aumenta molto di più a 4°C che non a 37°C perché le cellule sono sofferenti e probabilmente hanno la membrana danneggiata perché non sono nel loro microambiente ideale. Tutto questo porta a pensare che i sistemi NLC, con e senza farmaco, quando messi a contatto con CACO2 vengano captati ed internalizzati. Inoltre, da analisi al microscopio a fluorescenza, queste nanoparticelle sembrano accumularsi nell'area perinucleare delle cellule.

Sulla base di questi risultati, i nanosistemi di lecitina/chitosano si sono rivelati un veicolo a base acquosa non tossico e idoneo a solubilizzare il tamoxifene citrato, producendo dei nanosistemi stabili e che possono essere a loro volta trasformati in microsistemi ancora più stabili che costituiscono polveri, facilmente ridispersibili in acqua, destinate alla produzione di forme farmaceutiche solide per la somministrazione orale.

La seconda parte della ricerca ha riguardato lo studio di sistemi liposomiali e micellari per la veicolazione del farmaco antitumorale paclitaxel, praticamente insolubile in ambiente acquoso. Dopo uno studio formulativo iniziale con diversi componenti per la selezione delle formulazioni migliori, sono state scelte le preparazioni di liposomi di ePC/Chol (7:3), liposomi di DPPC/ePC/Chol/DSPG (4:3:3:1.5) e micelle di PEG2000-PE/Vitamina E (1:0,4). I liposomi hanno diametro medio di circa 200nm e carica superficiale negativa (quelli contenenti DPPC e DSPG in più hanno un valore di potenziale zeta maggiore in valore assoluto), le micelle invece hanno dimensioni di 10-15nm e carica superficiale vicina alla neutralità. Entrambi i tipi di sistema colloidale sono stati trovati capaci di dissolvere ed incorporare il farmaco fino ad un valore di caricamento del 3% (p/p). Le preparazioni acquose di micelle si sono rivelate migliori per la stabilità in confronto a quelle di liposomi, mentre come polveri liofilizzate sono entrambe stabili, mantenendo la distribuzione dimensionale e il contenuto in paclitaxel dei preparati di partenza. Le stesse formulazioni sono state anche funzionalizzate introducendo sulla superficie il peptide TAT, promotore della penetrazione cellulare, aggiungendo ai componenti il coniugato TATp-PEG-PE. Anche questi nanosistemi sono stati caratterizzati per dimensioni, carica superficiale e caricamento di farmaco, confermando i valori ottenuti per le formulazioni non funzionalizzate.

Poichè per queste sospensioni colloidali la via di somministrazione prevista è quella endovenosa, sono stati effettuati studi di captazione ed internalizzazione direttamente su cellule del tumore alla mammella, che è un possibile tessuto bersaglio su cui il paclitaxel deve svolgere la sua azione. I risultati sono molto differenti per i due tipi di nanosistemi: per i liposomi, infatti, si nota un aumento della fluorescenza delle cellule tempo-dipendente e, soprattutto, una marcata differenza tra liposomi semplici e TATp-liposomi, indicando una captazione maggiore di questi ultimi, come atteso, dal momento che sulla superficie è presente il TATp; per le micelle, invece, non solo non è stato possibile cogliere alcuna

differenza di internalizzazione tra micelle semplici e micelle funzionalizzate con il TATp, ma non c'è stato neanche un discostamento dalla fluorescenza basale delle cellule incubate con i campioni, almeno fino a 6 ore. La schermatura operata dal PEG, utile per evitare l'opsonizzazione *in vivo* e creare sistemi a lunga circolazione, in questo caso sembra diminuire o impedire l'interazione con le cellule. Tuttavia le micelle potrebbero essere un utile e poco tossico veicolo per il farmaco, praticamente insolubile in ambiente acquoso, accumularsi preferenzialmente nell'area patologica, in virtù delle loro dimensioni molto piccole, e liberare il farmaco che può entrare nelle cellule e svolgere la propria azione citotossica.

In termini di citotossicità, misurata sia come sopravvivenza cellulare sia come grado di apoptosi, micelle e liposomi si sono rivelati più efficaci del farmaco da solo. Non è stata invece rilevata alcuna differenza tra le formulazioni normali e quelle funzionalizzate con il TATp, come invece ci si aspettava dal momento che sembrano essere internalizzate maggiormente, almeno nel caso dei liposomi. Ipotizzando che la mancanza di una tossicità superiore dei nanosistemi funzionalizzati fosse dovuta al fatto che questi rimanessero intrappolati in endosomi citoplasmatici, è stato introdotto nella formulazione il DOTAP, lipide cationico con proprietà endosomolitiche, che però ha portato a risultati invariati. La mancanza di una differenza di citotossicità *in vitro* tra le formulazioni funzionalizzate e quelle semplici rimane purtroppo un problema irrisolto.

Concludendo, la funzionalizzazione con il peptide TAT non ha portato al miglioramento di efficacia sperato nel caso di micelle e liposomi, ma questi sistemi colloidali sono un efficiente veicolo per il paclitaxel, che ha grandi problemi di solubilità, a base acquosa e non tossici.

BIBLIOGRAFIA.

1. Darnell J, Lodish H, Baltimore D: Caratteristiche delle cellule tumorali in *Biologia molecolare della cellula*. I ed., Zanichelli, Bologna, 1994, 958-962
2. Peacock JL., O'Brien S.: Cancer Stading. *Oncology special edition*, 2000 [www.mcmahonmed.com]
3. Bonadonna / Robustelli: *Oncologia Medica*. Masson Italia 1997, 42, 942-945
4. Sparreboom A., de Jonge M.J., Verweij J.: The use of oral cytotoxic and cytostatic drugs in cancer treatment. *Eur J Cancer* 2002, 38, 18-22.
5. DeMario M.D., Ratain M.J.: Oral chemotherapy: rational and future directions. *J Clin Oncol* 1998, 16 (7), 2557-67.
6. Osborne C.K.: Tamoxifen in treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998, 339 (22), 1609-1618.
7. Colombo P., Castellani P.L., Gazzaniga A., Menegatti E., Vidale E.: *Principi di tecnologie farmaceutiche*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2004.
8. Lobenberg R., Amidon G.L.: Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm* 2000, 50 (1), 3-12.
9. Kruijtzter CMF, Beijnen JH, Schellens JHM: Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. *The Oncologist* 2002, 7, 516-530.
10. Win K.Y., Feng S.S.: Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005, 26 (15) 2713-2722.
11. Artursson P. and Borchardt T.: Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco2 and beyond. *Pharm Res* 1997, 14 (12), 1655-58.
12. Artursson P., Palm K., Luthman K.: Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Del Rev* 2001, 46, 27-43.

13. Stenberg P., Luthman K., Artursson P.: Virtual screening of intestinal drug permeability. *J Control Rel* 2000, 65, 231-243.
14. Moghimi S. M., Hunter A. C. and Murray J. C.: Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J.* 2005, 19 (3), 311–330.
15. Torchilin V.P.: Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *The AAPS Journal* 2007, 11, 9 (2), E128-47.
16. Brannon-Peppas L., Blanchette J.O: Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Del Rev* 2004, 56, 1649– 1659.
17. Torchilin V.P.: ed. Nanoparticulates as Pharmaceutical Carriers. London, UK, Imperial College Press, 2006.
18. Letchford K., Burt H.: A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2007, 65 (3), 259-69.
19. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W. and Feeney P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2000, 46, 3-36.
20. Yokogawa K., Nakashima E., Ishizaki J., Maeda H., Nagano T. and Ichimura F.: Relationships in the structure-tissue distribution of basic drugs in the rabbit. *Pharm. Res.*1990, 7, 691-696.
21. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y. and Hori K.: Tumor vascular permeability and the epr effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Rel.* 2000, 65, 271-284.
22. Maeda H., Sawa T., Konno T.: Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Rel* 2001, 74, 47-61 .
23. Uchegbu I. F.: Science in pharmacy. Parenteral drug delivery: 1. *Pharmaceutical Journal* 1999, 7060 (263), 309-318.
24. Torchilin V.P.: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4, 145–160.

25. Lukyanov. A. N., Elbayoumi T. A., Chakilam A. R., Torchilin V. P.: Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. *J Control Rel* 2004, 100, 135-144.
26. Ni S., Stephenson SM., Lee RJ.: Folate receptor targeted delivery of liposomal daunorubicin into tumor cells. *Anticancer Res* 2002, 22 (4), 2131-5.
27. Gabizon A., Shmeeda H., Horowitz A. T. and Zalipsky S.: Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv Drug Del Rev* 2004, 56, 1177-92.
28. Sawant R. M., Hurley J. P., Salmaso S., Kale A., Tolcheva E., Levchenko T. S. and Torchilin V. P.: "SMART" Drug Delivery Systems: Double-Targeted pH-Responsive Pharmaceutical Nanocarriers. *Bioconjugate Chem.* 2006, 17, 943-949.
29. Torchilin VP.: Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006, 8, 343-75.
30. Breunig M., Bauer S., Goepferich A.: Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting?. *Eur J Pharm Biopharm* 2008, 68, 112–128.
31. Green M., Loewenstein PM.: Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus TAT trans-activator protein. *Cell* 1988, 55, 1179–88.
32. Frankel AD., Pabo CO.: Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988, 55,1189-93.
33. Schwarze SR., Dowdy SF.: In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000, 21, 45–48.
34. Nori A., Kopecek J.: Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. *Adv Drug Del Rev* 2005, 57, 609– 636.
35. Kale A.A. and Torchilin V. P.: Enhanced transfection of tumor cells in vivo using "Smart" pH-sensitive TAT-modified pegylated liposomes. *J Drug Targ* 2007, 15 (7–8), 538–545.
36. Ansel H. C., Allen L. V. and Popovich N. G.: Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Kluwer, Norwell, Massachusetts, 1999.

37. Yalkowsky S. H.: Techniques of Solubilization of Drugs. Marcel Dekker, New York, 1981.
38. Ray R., Kibbe A. H., Rowe R., Shleskey P. and Weller P.: Handbook of Pharmaceutical Excipients. APhA, Washington, District of Columbia, 2003.
39. Jung T. et al: Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm* 2000, 50, 147-160.
40. Florence A.T.: Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting. *J Drug Target* 2004, 12 (2), 65-70.
41. Florence A.T.: The oral absorption of micro- and nanoparticles: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res* 1997, 14 (3), 259-266.
42. Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C.: Diffusion of univalent ions across lamellae os swollen phospholipids. *J mol Biol* 1965, 13, 238-252.
43. Torchilin V.P. and Weissig V.: Liposomes - A Practical Approach. Oxford University Press, 2003.
44. Forssen EA., Tökés ZA.: Improved therapeutic benefits of doxorubicin by entrapment in anionic liposomes. *Cancer Res* 1983, 43 (2), 546-50.
45. Torchilin V.P.: Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm Res* 2007, 24 (1), 1-16.
46. Jones M. and Leroux J.: Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 1999, 48, 101-111.
47. Lasic D. D.: Mixed micelles in drug delivery. *Nature* 1992, 355, 279-280.
48. Rainer H. MuÈller, Karsten MaÈder, Sven Gohla: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000, 50, 161-177.
49. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M.: "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Rel.* 2004, 100, 5-28.

50. Chourasia M. K. and Jain S. K.: Polysaccharides for Colon Targeted Drug Delivery Drug Delivery. *Drug Del* 2004, 11, 129–148.
51. Sengupta et al.: Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature* 2005, 436, 568-572.
52. Ma B., Zhang S., Jiang H., Zhao B., Lv H.: Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J Control Rel.* 2007, 123 (3), 184-94.
53. Henriksen I., Smistad G., Karlsen J.: Interactions between liposomes and chitosan. *Int J Pharm* 1994, 101, 227–236.
54. Henriksen I., Vagen S.R., Sande, S.A., Smistad, G., Karlsen J.: Interactions between liposomes and chitosan II. Effect of selected parameters on aggregation and leakage. *Int J Pharm* 1997, 146, 193–204.
55. Hartig SM., Greene RR., Dikov MM., Prokop A., Davidson JM.: Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharm Res* 2007, 24 (12), 2353-69.
56. Sonvico F., Cagnani A., Rossi A., Motta S., Di Bari M.T., Cavatorta F., Alonso M.J., Deriu A., Colombo P.: Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 298, 1015–1019.
57. Batzri S., Korn E.D.: Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 298, 1015–1019.
58. Betageri G.V., Jenkins S.A., Parsons D.L.: Liposome drug delivery systems. Technomic Publishing Company, 1993, Lancaster PA, USA.
59. Arai K., Kinumaki T., Fujita T.: Toxicity of chitosan. *Bull Tokai Feg Fish Res Lab* 1968, 56, 89-95.
60. Artursson P., Illum L., et al: Effect of chitosan on the permeability of monolayer of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1994, 11, 1358-1361.
61. Schipper N.G.M., Artursson P. et al: Chitosan as absorption enhancer for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res* 1997, 14 (7), 923-929.
62. Shipper N.G.M., Artursson P. et al: Chitosan as absorption enhancer for poorly absorbable drugs 3: influence of muco on absorption enhancement. *Eu J Pharm Sci* 1999, 8 (4), 335-343.

63. Illum L.: Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 1998, 15 (9), 1326-31.
64. Singla A. K. and Chawla M.: Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J Pharm Pharmacol* 2001, 53, 1047-1067.
65. Sinha V.R., Singla A.K, Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S.: Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs *Int J Pharm* 2004, 274, 1-33.
66. Cafaggi S., Russo E., Stefani R., Leardi R., Caviglioli G., Parodi B., Bignardi G., De Toter D., Aiello C., Viale M.: Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin-alginate complex. *J Control Rel.* 2007, 121 (1-2), 110-23.
67. Tiyaboonchai W., Limpeanchob N.: Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int J Pharm* 2007, 329 (1-2), 142-9.
68. Irie T. and Uekama K.: Pharmaceutical applications of cyclodextrines. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 1997, 86 (2), 147-162.
69. Loftsson T., Duchene D. : Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2007, 329 (1-2), 1-11.
70. Carrier R. L., Miller L. A., Ahmed I.: The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J Control Rel.* 2007, 123, 78-99.
71. Rowinsky E.K., Donehower R.C.: Paclitaxel (Taxol). *N. Engl. J. Med.* 1995, 332, 1004-1014.
72. Spencer C.M., Faulds D.: Paclitaxel. *Drugs* 1994, 48, 794-847.
73. Foa R., Norton L., Seidman A.D.: Taxol (paclitaxel): a novel anti-microtubule agent with remarkable anti-neoplastic activity. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1994, 24, 6-14.
74. Horwitz S.B., Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol.Sci.* 1992, 13, 134-136.
75. Chervinsky D.S., Brecher M.L., Hoellele M.J.: Cremophor-EL enhances taxol efficacy in a multi-drug resistant C1300 neuroblastoma cell line. *J. Anticancer Res.* 1993, 13, 93-96.

76. TAXOL® , Product information, Bristol-Myers Squibb Company.
77. Webster L., Linsenmeyer M., Millward M., Morton C., Bishop J., Woodcock D.: Measurement of cremophor EL following taxol: plasma levels sufficient to reverse drug exclusion mediated by the multidrug-resistant phenotype. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85, 1685–1690.
78. Nicolaou K.C., Guy R.K., Pitsinos E.N., Wrasidlo W.: A water-soluble prodrug of taxol with self-assembling properties. *Angew. Chem. Int.* 1994, 33, 1583–1587.
79. Sharma U.S., Balasubramanian S.V., Straubinger R.M.: Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (taxol) complexes with cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 1995, 84, (1995) 1223–1230.
80. Kang BK., Chon SK., Kim SH., Jeong SY., Kim MS., Cho SH., Lee HB., Khang G.: Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Int J Pharm* 2004, 22, 286 (1-2), 147-56.
81. Devalapally H., Shenoy D., Little S., Langer R., Amiji M.: Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluations. *Mol Pharm.* 2005, Sep-Oct, 2 (5), 357-66.
82. Peltier S., Oger JM., Lagarce F., Couet W., Benoît JP.: Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res.* 2006, 23 (6), 1243-50.
83. Gao, Z., Lukyanov, A.N., Chakilam, A.R., Torchilin, V.P.: PEG–PE/phosphatidylcholine mixed immunomicelles specifically deliver encapsulated taxol to tumor cells of different origin and promote their efficient killing. *J. Drug Target* 2003, 11, 87–92.
84. Dabholkar RD., Sawant RM., Mongayt DA., Devarajan PV., Torchilin VP.: Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine conjugate (PEG-PE)-based mixed micelles: some properties, loading with paclitaxel, and modulation of P-glycoprotein-mediated efflux. *Int J Pharm.* 2006, 6, 315 (1-2), 148-57.
85. Sharma A., Straubinger R.M.: Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm. Res.* 1994, 11, 889–896.

86. Crosasso P., Ceruti M., Brusa P., Arpicco S., Dosio F., Cattel L.: Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J Control Rel.* 2000, 3, 63 (1-2), 19-30.
87. Jun Wu, Qing Liu, Robert J. Lee. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *Int. J Pharm* 2006, 316, 148–153.
88. NOLVADEX®, PHYSICIANS' DESK REFERENCE®1999, 3425-3428.
89. Tamoxifen Citrate, SIGMA product information.
90. Braga RM., Carvalho RD., Fonseca SG., Strattmann R., De Santana DP., De Albuquerque MM.: In vitro dissolution test of tamoxifen citrate preparations. *Boll Chim Farm* 2001, 140 (6), 467-470.
91. Stearns V., Johnson MD., Rae JM., Morocho A., Novielli A., Bhargava P., Hayes DF., Desta Z., Flockhart DA.: Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95 (23), 1758-64.
92. Jin Y., Desta Z., Stearns V., Ward B., Ho H., Lee KH., Skaar T., Storniolo AM., Li L., Araba A., Blanchard R., Nguyen A., Ullmer L., Hayden J., Lemler S., Weinshilboum RM., Rae JM., Hayes DF., Flockhart DA.: CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97, (1), 30-9.
93. Fuchs WS., Leary WP., Van der Meer MJ., Gay S., Witschital K, Von Nieciecki A.: Pharmacokinetics and bioavailability of tamoxifen in postmenopausal healthy women. *Arzneimittelforschung* 1996, 46 (4), 418-422.
94. Memisoglu-Bilensoy E., Duchene D., et al: Tamoxifen citrate loaded amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles: in vitro characterization and cytotoxicity. *J Control Rel* 2005, 104, 489-496.
95. Gref R., Couvreur P. et al. : New self-assembled nanogels based on host-guest interactions: Characterization and drug loading. *J Control Rel* 2006, 111, 316–324.
96. Fontana G., Maniscalco L., Schillaci D., Cavallaro G., Giammona G.: Solid Lipid Nanoparticles Containing Tamoxifen Characterization and In Vitro Antitumoral Activity. *Drug Del* 2005, 12, 385–392.

97. Harivardhan Reddy L., Vivek K., Nishant Bakshi and Murthy R.S.R.: Tamoxifen Citrate Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLNTM): Preparation, Characterization, In Vitro Drug Release, and Pharmacokinetic Evaluation. *Pharm Dev Tech* 2006, 11, 167–177.
98. Brigger I., Couvreur P., et al: Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *Int J Pharm* 2001, 214, 37-42.
99. Chawla JS., Amiji MM: Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm* 2002, 249, 127-138.
100. Shenoy BD., Amiji MM: Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharm* 2005, 293, 261-270.
101. Hu F.X., Neoh K.G., Kang E.T.: Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. *Biomaterials* 2006, 27, 5725–5733.
102. Buchanan CM., Buchanan NL., Edgar KJ., Little JL., Malcolm MO., Ruble KM., Wachter VJ., Wempe MF.: Pharmacokinetics of tamoxifen after intravenous and oral dosing of tamoxifen-hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin formulations. *J Pharm Sci* 2007. 96 (3), 644-60.
103. Kale AA., Torchilin VP.: Enhanced transfection of tumor cells in vivo using "Smart" pH-sensitive TAT-modified pegylated liposomes. *J Drug Target* 2007, 15 (7-8), 538-45.
104. Lukyanov A.N., Torchilin V.P.: Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv Drug Del Rev* 2004, 56, 1273– 1289.
105. Muzzarelli RA.: Colorimetric determination of chitosan. *Anal Biochem.* 1998, 260 (2), 255-7.
106. Ciapetti G., Cenni E., Pratelli, L., Pizzoferrato A.: In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 1993, 14 (5), 359-364.
107. White N.S., Errington R.J.: Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice. *Adv Drug Deliv Rev* 2005. 57(1),17-42.

108. Ibrahim S.F., van den Engh G.: Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007. 106, 19-39.
109. van Genderen H., Kenis H., Lux P., Ungeth L., Maassen C., Deckers N., Narula J., Hofstra L., Reutelingsperger C.: In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nat Protoc* 2006. 1(1), 363-7.
110. Vybrant® Apoptosis Assay #3, product information, Molecular Probes™, Invitrogen.
111. Wattiaux R., Jadot M., Warnier-Pirotte M.T., Wattiaux-De Coninck R.: Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Letters* 1997, 417, 199-202.
112. Gerelli Y., Di Bari M. T., Deriu A., Cantu L., Colombo P., Como C., Motta S., Sonvico F. and May R. P.: Structure and organization of phospholipid/polysaccharide nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter*. Accepted, in press.

RINGRAZIAMENTI

Sono molte le persone che desidero ringraziare e che hanno reso possibile la realizzazione di questo progetto.

In primo luogo vorrei esprimere tutta la mia gratitudine al mio supervisore, Prof. Colombo, per la sua guida ed i suoi preziosi insegnamenti in questo percorso di studi.

Ringrazio vivamente Fabio Sonvico, per il suo indispensabile aiuto e costante supporto, tutti i Professori ed i Ricercatori del Dipartimento Farmaceutico, nonché gli studenti di Dottorato, colleghi e amici.

Vorrei esprimere il mio apprezzamento a tutti coloro che hanno collaborato al progetto di ricerca: Emilia Corradini e il Dipartimento di Patologia e Medicina del Laboratorio della Facoltà di Medicina e Chirurgia di Parma; il Prof. Deriu, Yuri Gerelli e il Dipartimento di Fisica dell'Università di Parma; il Prof. Coppi e la Prof.essa Tiozzo che hanno reso possibile la collaborazione con l'Università di Modena, con la grande disponibilità delle Dottoresse Maria Antonietta Croce e Monica Montanari, il cui contributo è stato fondamentale.

Sono grata, inoltre, al Prof. Torchilin ed a tutti i suoi collaboratori del Center for Pharmaceutical Biotechnology and Nanomedicine, Northeastern University, (Boston, MA, USA), con cui ho avuto l'opportunità di lavorare.

Si ringrazia il Ministero dell'Università e della Ricerca per il finanziamento PRIN 2006.

I ringraziamenti finali vanno alla mia famiglia ed ai miei amici, per il loro affetto e supporto continuo.