



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
PADOVA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE
IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA

**Sistemi liposomiali per la veicolazione di
molecole biologicamente attive**

RELATORE: prof. Gianfranco Pasut

LAUREANDA: Antonella Martin

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	8
RIASSUNTO.....	12
INTRODUZIONE	15
1 LE NANOTECNOLOGIE.....	15
2. I LIPOSOMI.....	16
2.1 I LIPOSOMI SUPER STEALTH	20
2.2 IMMUNOLIPOSOMI.....	21
2.3 TRASTUZUMAB.....	24
3. I METODI DI PREPARAZIONE DEI LIPOSOMI.....	25
4. METODI DI INCAPSULAZIONE DEL FARMACO.....	26
5. CARATTERIZZAZIONE DEI LIPOSOMI.....	27
6. IL TUMORE AL SENO	28
6.1 IL RECETTORE HER2.....	29
6.2 LA TERAPIA DEL TUMORE AL SENO.....	30
6.2.1 SINTESI DI IMMUNOLIPOSOMI PER LA TERAPIA DEL CARCINOMA MAMMARIO HER2+.....	32
7. LA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE	32
7.1 LA TERAPIA NELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE	36
7.1.2 NUOVI APPROCCI NELLA TERAPIA DELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE.....	39
7.2 SISTEMA DI DELIVERY PER IL PLASMIDE PCITO SHNFIK...41	
MATERIALI.....	44
METODI	48
1. SINTESI DI Mal-PEG _{5k} -DSPE ₂	48
2. DIGESTIONE DI TRASTUZUMAB	49
2.1 DIGESTIONE PROTEOLITICA DI TRASTUZUMAB PER OTTENERE IL FRAMMENTO F(ab') ₂	49
2.2 RIDUZIONE DEL FRAMMENTO F(ab') ₂ PER OTTENERE Fab'	50
3. PEGHILAZIONE DI Fab' CON Mal-PEG _{5K} -DSPE ₂	50

4. PREPARAZIONE DI LIPOSOMI CON LA TECNICA THIN LAYER EVAPORATION	52
4.1 PREPARAZIONE DI LIPOSOMI STEALTH (SL).....	52
4.2 PREPARAZIONE DI LIPOSOMI SUPER STEALTH (SSL ₂).....	52
5. INCORPORAZIONE DI DOXORUBICINA.....	53
5.1 EFFICIENZA DI INCAPSULAZIONE DI DOXORUBICINA (EE)	54
6. PREPARAZIONE DI IMMUNOLIPOSOMI TRAMITE <i>POST INSERTION</i>	55
6.1 <i>POST INSERTION</i> DI LIPOSOMI <i>STEALTH</i>	56
6.2 <i>POST INSERTION</i> DI LIPOSOMI <i>SUPER STEALTH</i>	56
7. MARCATURA CON VYBRANT® DiD DEI LIPOSOMI PER I TEST <i>IN VIVO</i>	56
8. STUDI <i>IN VIVO</i> : ALLESTIMENTO DEL MODELLO MURINO XENOGRAFT DI TUMORE OVARICO.	58
9. PREPARAZIONE DI LIPOSOMI CATIONICI CON LA TECNICA <i>THIN LAYER EVAPORATION</i>	58
9.1 INCORPORAZIONE DEL PLASMIDE.....	58
9.2 TEST <i>IN VITRO</i>	59
10. SAGGI.....	59
10.1 SAGGIO DI STEWART	60
10.1.1. SAGGIO DI STEWART IN CAMPIONI CONTENENTI DOXORUBICINA	61
11. TECNICHE STRUMENTALI.....	64
11.1 DYNAMIC LIGHT SCATTERING	64
11.2 MICROSCOPIO A TRASMISSIONE ELETTRONICA (TEM)	67
11.3. ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO.....	68
11.4 SDS-PAGE	69
RISULTATI.....	70
1. CARATTERIZZAZIONE DI Mal-PEG _{5k} -DSPE ₂	70
2. CARATTERIZZAZIONE DEL FRAMMENTO F(ab') ₂	72
3. CARATTERIZZAZIONE DEL FRAMMENTO Fab'	73
4. CARATTERIZZAZIONE DEGLI IMMUNOLIPOSOMI.....	74
4.1 <i>STEALTH LIPOSOMES-SL</i>	74
4.2 <i>STEALTH IMMUNO-LIPOSOMES-SIL</i>	75

INDICE

4.3 <i>SUPER STEALTH IMMUNO-LIPOSOMES 2-SSIL₂</i>	76
5. TEST <i>IN VIVO</i> SU MODELLO ZEBRAFISH	77
6. TEST <i>IN VIVO</i> SU MODELLO MURINO XENOGRAFT DI TUMORE OVARICO HER2-POSITIVO.....	78
7. CARATTERIZZAZIONE DEI LIPOSOMI <i>STEALTH</i> CON LIPOFECTAMINA®	80
7.1 CARATTERIZZAZIONE AL TEM DEI LIPOSOMI <i>STEALTH</i> CON LIPOFECTAMINA®	82
8. TEST <i>IN VITRO</i> DI LIPOSOMI <i>STEALTH</i> CON LIPOFECTAMINA®	83
DISCUSSIONE	85

INDICE

ABBREVIAZIONI

ABC, accelerated blood clearance

AFM, atomic force microscope

BCA, bicinchoninic acid assay

BMPS, N-idrossicuccinimidilestere dell'acido 3 maleimmidopropanoico

CD4/6, cluster of differentiation 4/6

CDR, complementary determining region

CH₂Cl₂, diclorometano

CHCl₃, cloroformio

CHOL, colesterolo

Da, Dalton

DAP, distrophine associated proteins

DCC, N,N'-dicicloesilcarbodiimide

DCU, dicicloesilurea

DDS, drug delivery System

DLS, dynamic light scattering

DMSO, dimetioisolfossido

DOPE dioleilfosfatidiletanolamina

DOSPA 2,3-dioleil ossi-N-[2(sperminecarbosi-amido)etil]-N,Ndimetil- 1-propanaminium trifluoroacetate

DOSY, diffusion ordered spectroscopy

DSPE, disteroilfosfatidiletanolamina

DOTAP 2,3 dioleoil, 3 trimetilammonio propano

DXR, doxorubicina

EDTA, acido etilendiammino tetraacetico

EPR, enhanced permeability and retention effect

ABBREVIAZIONI

eq, equivalenti

EtOH, etanolo

Fab', antigen binding fragment

Fc, fragment crystallisable

FDA, food and drug administration

FFF, field flow fractionation

FTIR, Fourier transformed infra-red

g, grammi

GC-MS, gas chromatography paired with mass spectroscopy

GFP, green fluorescent protein

Gly-Gly, glicil-glicina

Hc, heavy chain

HER2, human epidermal growth factor receptor 2

HPLC, high pressure liquid chromatography

HSPC, fosfatidilcolina di soia idrogenata

IgG, immunoglobuline di tipo G

K_d, costante di dissociazione

L, litri

Lc, light chain

LC-MS, liquid chromatography paired with mass spectroscopy

LTX, lipofectamina

LUVs, large unilamellar vesicles

M, molarità

MAb, anticorpo monoclonale

MAL, maleimide

Mal-PEG-DSPE, polietilenglicole maleimmide DSPE

MD, distrofia muscolare

MDR, *Multi Drug Resistance*

ABBREVIAZIONI

MeOH, metanolo
mPEG, metossi polietilen glicole
MLVs, multi lamellar vesicles
N, normalità
NHS, N-idrossi succinimmide
p/v, peso/volume
PBS, Phosphate buffer solution
PDI, indice di polidispersività
PEG, polietilene glicole
pH, $-\log[H^+]$
pKa; antilogaritmo della costante di dissociazione acida
PM, peso molecolare
RES, Sistema reticolo endoteliale
rpm, revolutions per minute
scFv, single chain Fv fragment
SCL, stealth cationic liposome
SDS, sodio dodecilsolfato
shNFIX, short hairpin Nuclear Factor X I
SKOV-3, linea cellulare umana di cellule cancerose ovariche a morfologia simile all'epiteliale
SIL, stealth immuno-liposome
SL, stealth liposome
SSIL₂, super stealth immuno-liposome
SSL₂, super stealth liposome
SUVs, small unilamellar vesicles
T, temperatura
T_m, main transition temperature
TAE, TRIS, EDTA e acido acetico

ABBREVIAZIONI

TEM, microscopio a trasmissione elettronica

TNBS, acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico

UPLC, ultra-pressure liquid chromatography

UV-Vis, ultravioletto-visibile

VH, heavy chain variable

VL, light chain variable

v/v, volume/volume

XRD, X-ray diffraction

β -Glu, acido β -glutammico

ϵ , coefficiente di estinzione molare

λ , lunghezza d'onda

RIASSUNTO

I liposomi sono microscopiche vescicole sferoidali sospese in un mezzo acquoso che racchiudono un nucleo idrofilico composte da un doppio strato fosfolipidico. Sono state scoperte e descritte dal biofisico Alec Bangham¹ nel 1995 e da allora sono state molto studiate per la loro similitudine alle membrane cellulari, per essere un sistema di veicolazione di farmaci e per la trasfezione di materiale genetico.

In questa tesi verrà messa in evidenza la versatilità di questo peculiare sistema di *delivery* declinandolo a veicolare un farmaco antitumorale e del materiale genetico.

In entrambi i casi si sono formulati liposomi *Stealth* (SL), ovvero liposomi invisibili al sistema dei monociti e macrofagi del RES, che permettono un prolungamento della farmacocinetica. Per formare i liposomi, si è utilizzata la tecnica *Thin Layer Evaporation*, secondo la quale si forma un film lipidico che viene poi idratato per permettere la formazione dei liposomi. Per rendere i liposomi *Stealth*, si sono utilizzate catene idrofiliche di PEG ancorate al doppio strato fosfolipidico grazie alla coniugazione con DSPE.

Nel progetto di *delivery* del farmaco oncologico sono stati preparati liposomi *Super-stealth* (SSL), formati da fosfatidilcolina e colesterolo e resi invisibili al RES con catene idrofiliche di PEG coniugate a due molecole di DSPE. La coniugazione di due molecole di DSPE è stata resa possibile grazie alla struttura ramificata del PEG che permette di aumentare il *loading* di molecole di DSPE e quindi l'ancoraggio al doppio strato fosfolipidico. Inoltre, i liposomi sono stati funzionalizzati con un agente direzionante esposto sulla superficie, in modo da aumentare l'accumulo dei liposomi nel sito target; tale agente veicolante è il frammento *Fab'* dell'anticorpo monoclonale Trastuzumab che lega, con elevata affinità, il recettore HER2 sovraespresso nel 25-30% dei carcinomi alla mammella². *Fab'* è stato ottenuto in seguito a digestione proteolitica dell'anticorpo Trastuzumab e successiva riduzione. Dopo coniugazione a PEG, *Fab'* viene inserito nel liposoma tramite la tecnica di *post insertion*. Il farmaco antitumorale veicolato è la doxorubicina, antibiotico chemioterapico, inserito nei liposomi con la tecnica di *Remote Loading*. Le dimensioni dei liposomi sono state valutate tramite DLS ed è stata determinata la quantità di doxorubicina incapsulata. In un primo studio *in vivo*, i liposomi sono stati testati su Zebrafish precedentemente inoculati con cellule di adenocarcinoma ovarico SKOV-3 sovraesprimenti il recettore HER2, per valutare l'effetto direzionante del *Fab'*. Per testare l'efficacia antitumorale *in vivo*, i liposomi SL e SIL sono stati somministrati in un modello murino xenogenico di tumore ovarico sovraesprimente HER2. In

tutti gli animali trattati l'utilizzo di questi liposomi ha indotto la morte cellulare delle cellule SKOV-3, i liposomi con l'agente direzionante si sono dimostrati estremamente selettivi ottenendo un netto beneficio terapeutico.

Nel progetto di *delivery* di materiale genetico, sono stati preparati liposomi *Stealth* cationici (SCL) per veicolare il plasmide pCito shNfix portante la sequenza genica per la codifica di un shRNA (*short hairpin* RNA) che silenzia l'espressione della proteina Nfix (*Nuclear Factor I X*). Ai fini di valutare l'efficacia di trasfezione è stato usato un plasmide che codifica la sequenza genica per l'espressione della proteina fluorescente *tdTomato*. I liposomi cationici sono stati ottenuti utilizzando fosfatidilcolina, colesterolo e mPEG-DSPE. Il film lipidico è stato idratato con una soluzione di lipofectamina®, contenente il lipide cationico DOSPA e il fosfolipide DOPE, e plasmide. I liposomi sono stati caratterizzati tramite DLS e TEM. Infine, sono stati condotti degli studi di trasfezione su cellule C2C12 (linea cellulare di mioblasti murini) per valutare l'espressione della proteina fluorescente *tdTomato* e quindi la capacità dei liposomi di veicolare e rilasciare il plasmide. Dagli studi *in vitro* purtroppo non si è avuta trasfezione, probabilmente perché abbiamo reso estremamente stabile la struttura di questi *nano carriers*.

INTRODUZIONE

1 LE NANOTECNOLOGIE

Le nanotecnologie sono tecnologie cui compete la dimensione dei nanometri e la loro applicazione in ambito medico viene definita nanomedicina.

In ambito farmaceutico, quando ci si riferisce alle nanotecnologie, ci si riferisce per lo più a *Drug Delivery System* (DDS) di dimensioni nanometriche e quindi a sistemi di trasporto di farmaci o altro materiale compresi nell'intervallo 1-1000 nm. Tali sistemi sono detti *nano carriers*.

Per i *nano carriers* si possono utilizzare diversi tipi di materiali quali silice, lipidi, polimeri, tensioattivi e metalli, e costituire identità strutturali molto diverse, quali lipidi, micelle e dendrimeri^{3,4}.

Il comune denominatore di tutte queste identità, però, è la dimensione.

Il motivo per cui si utilizzano questi *Drug Delivery Systems* (DDS) dalle dimensioni nanometriche è legato ai loro indiscutibili vantaggi, quali:

- la dimensione, essendo superiore al *cut-off* renale (15 nm⁵) permette di evitare la rapida *clearance* renale tipica dei piccoli farmaci. Per cui caricando i farmaci in questi DDS se ne può aumentare l'emivita plasmatica⁶;
- aumentano la stabilità dei farmaci proteggendoli dalla degradazione chimica ed enzimatica;
- si riduce la resistenza ai farmaci nota come *multi drug resistance* (MDR), dovuta all'azione delle pompe di efflusso cellulari che non riescono ad espellere i DDS⁷;
- un *carrier* ben progettato, inoltre, riesce ad implementare la solubilità del farmaco, se esso è lipofilico, in modo da poterne aumentare il dosaggio⁸;
- il direccionamento specifico tramite peptidi, anticorpi o frammenti di essi, vantaggio fondamentale per ridurre le reazioni indesiderate e ridurre la tossicità sistemica⁸;
- sfruttando l'effetto EPR diventano, per il trattamento di carcinomi, sistemi per il *targeting* passivo⁹.

Accanto agli aspetti positivi è doveroso citare anche gli svantaggi dei *nano carriers* quali:

- l'opsonizzazione: proteine plasmatiche dette opsonine tendono ad essere adsorbite sulla superficie del DDS che poi viene riconosciuto dal sistema dei monociti-macrofagi o RES (*Reticular Endothelial System*)⁸;
- la stabilità *in vitro* e *in vivo*: è fondamentale ottenere dei sistemi di trasporto che siano stabili dalla loro formulazione sino al momento della somministrazione al paziente e spesso parlando di sospensioni questo è un grosso limite dei nano trasportatori⁸.

2. I LIPOSOMI

Tra i *nano carriers* ritroviamo i liposomi.

I liposomi sono microscopiche vescicole sferoidali sospese in un mezzo acquoso, con un nucleo acquoso racchiuso da membrane lipidiche a doppio strato formate, per lo più, da fosfolipidi naturali o sintetici disposti in una struttura ordinata⁸. Oltre ai fosfolipidi possono essere presenti anche altri componenti, tra cui il colesterolo che modula le proprietà chimico fisiche del doppio strato fosfolipidico. I liposomi sono stati scoperti e descritti per la prima volta nel 1964-65 da Alec Bangham⁵, biofisico presso l'università Babraham Institute of Cambridge, ma solo nel 1995 sono apparsi nel mercato come *Drug Delivery System* della formulazione Doxil/ Caelyx® ed oggi sono uno dei sistemi di trasporto più popolari nel campo delle nanotecnologie.

Questa popolarità è dovuta ai notevoli vantaggi che i liposomi presentano quali la loro biodegradabilità e biocompatibilità, la loro versatilità nel trasportare sostanze idrofile, incapsulate nel comparto acquoso interno, e lipofile, tra i lipidi della membrana (Figura 1), le loro dimensioni subcellulari che garantiscono elevati *uptake* cellulari aumentando la loro biodisponibilità.

L'incapsulazione di farmaci permette di aumentare la solubilità degli stessi, di ridurre la tossicità, di proteggerli dal pH, dall'attacco degli enzimi e del sistema dei monociti-macrofagi del RES.

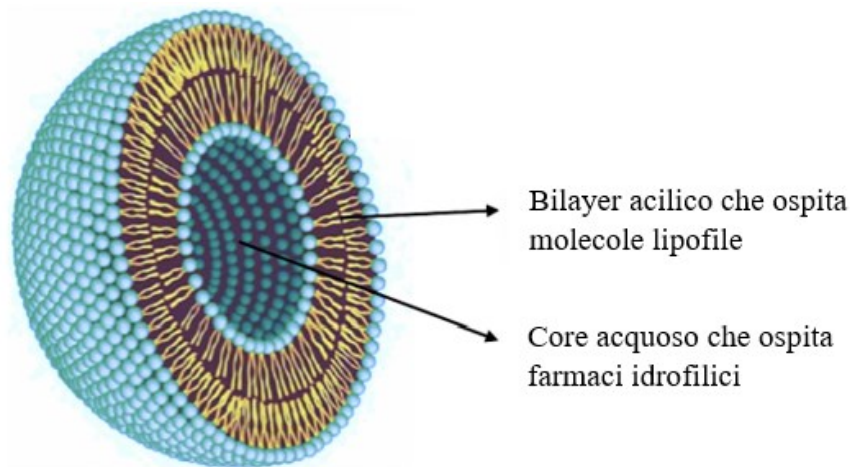


Figura 1. Rappresentazione schematica di una sezione di un liposoma

I liposomi vengono classificati¹⁰ secondo vari criteri: le dimensioni, il numero di lamelle, le loro caratteristiche. In base alle dimensioni, possiamo avere:

1. *Small unilamellar vesicles* (SUV): 20–100 nm;
2. *Large unilamellar vesicles* (LUV): > 100 nm;
3. *Giant unilamellar vesicles* (GUV): > 1000 nm;
4. *Oligolamellar vesicles* (OLV): 100–500 nm and
5. *Multilamellar vesicles* (MLV): > 500 nm.

La classificazione in base alle dimensioni diventa importante, a livello farmaceutico, quando si deve decidere quale via di somministrazione utilizzare, per cui avremo, ad esempio, i GUV per applicazioni topiche, mentre i SUV possono essere iniettati per via endovenosa.

Un'altra classificazione¹⁰, ci permette di distinguerli in base alle caratteristiche funzionali:

1. Liposomi cationici
2. Immunoliposomi
3. Liposomi sensibili al pH
4. Convenzionali
5. *Long circulating o Stealth*

I liposomi *long circulating*, o liposomi *stealth*, sono liposomi invisibili al sistema immunitario e permangono in circolo più a lungo.

Si ottengono con l'inserimento sulla superficie del liposoma di lunghe catene di polimeri idrofilici che, creando uno strato idrofilico, ostacolano l'aggregazione tra di essi, l'assorbimento di opsonine e l'interazione con il proteoma plasmatico, risultando in una emivita plasmatica maggiore.¹¹

Tra i polimeri idrofilici idonei ad effettuare tale mascheramento riconosciamo il polietilenglicole (PEG).

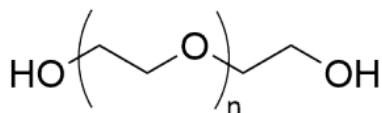


Figura 2: formula del PEG

Il PEG è uno dei polimeri più studiati ed è molto utilizzato in tecnologia farmaceutica perché è biocompatibile, poco immunogenico¹², non tossico, flessibile, solubile in acqua e in moltissimi solventi acquosi, sintetizzabile con una ridottissima polidispersività e funzionalizzabile.

In commercio oggi ci sono molti tipi di PEG acquistabili, dal PEG lineare, a quello ramificato, *Y-shaped*, funzionalizzato in modi diversi e con pesi molecolari variabili.

In questo lavoro si è deciso di utilizzare il PEG lineare con peso molecolare di 5000 Dalton che si è visto essere più performante rispetto ad altri tipi per ottenere *long circulating nano carriers*.

Per riuscire ad ancorare il PEG al sistema liposomiale è necessario coniugarlo ad un lipide che riesca ad interagire stabilmente con il *bilayer* fosfolipidico tramite interazioni idrofobiche. Il più usato è il DSPE (distereoilfosfatidiletanolamina)¹³. In figura 3 riportiamo un esempio dell'unione del metossi-PEG con il DSPE tramite un legame ammidico.

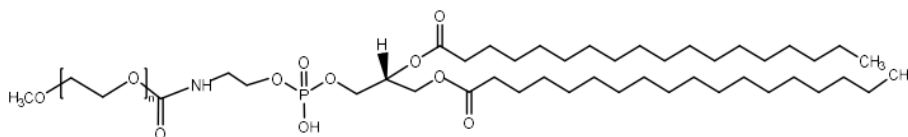


Figura 3. struttura del mPEGn-DSPE

La disposizione delle catene di PEG sulla superficie del liposoma è fondamentale per declinare le proprietà di *Stealth* del liposoma stesso.

In genere¹⁴ riconosciamo due disposizioni: A- *Brush* e B-*Mushroom* (Figura 4). La disposizione preferita è la *Brush* che si ottiene introducendo nelle formulazioni un quantitativo di PEG maggiore al 4% come rapporto molare rispetto ai lipidi totali. In tal modo le catene riusciranno a ricoprire meglio la superficie della nanoparticella e mascherarla meglio al RES anche se, così disposte, conferiscono al sistema una maggior rigidità. Passando dalla disposizione *Brush* a quella *Mushroom*, si hanno molte altre disposizioni intermedie con caratteristiche miste tra le due qui presentate.

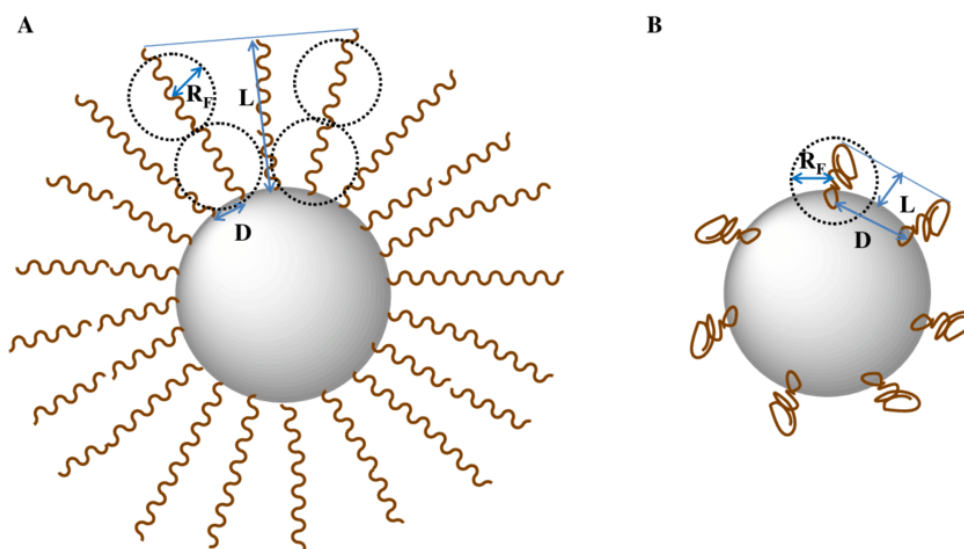


Figura 4: rappresentazione schematica della disposizione delle catene di PEG sulla superficie di una nanoparticella. D=distance, Rf=Radius of flory A. *Brush*, B. *Mushroom*¹⁴

I liposomi ricoperti da PEG-DSPE vengono detti *Stealth liposomes* e sono in grado, come appena menzionato, di sfuggire al sistema dei monociti macrofagi¹⁵.

In vivo i benefici di tali liposomi sono limitati perché avviene il distacco, operato dalle proteine plasmatiche, del PEG dalla superficie dei liposomi e ciò causa una riduzione della stabilità del sistema di *drug delivery*.

Oltre a ciò, la distribuzione delle catene di PEG sulla superficie spesso non è omogenea e si lasciano delle aree scoperte passibili di opsonizzazione. Tali problemi possono essere superati utilizzando i liposomi *Super Stealth* in cui una ramificazione funge da solida ancora per il PEG al liposoma e ciò esita in carriers molto più stabili¹⁶.

ramificato è stato utilizzato sia per formare il liposoma insieme agli altri lipidi, che per legare il Fab'.

2.2 IMMUNOLIPOSOMI

I liposomi possono attuare il *targeting* passivo nei tessuti tumorali per l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*), scoperto da Matsumura e Maeda¹⁷, ossia i tessuti tumorali sono iper vascolarizzati, ma tali vasi presentano fenestrature più ampie, l'assenza dei periciti e la membrana basale più discontinua, tanto che il *nano carrier* può extravasare nello spazio interstiziale, ove vi rimane più a lungo rispetto ad un tessuto sano perché il sistema di drenaggio linfatico è deficitario o del tutto assente nei tumori⁹.

Tuttavia, questo effetto, da solo, non è sufficiente a rendere il sistema così selettivo da avere una apprezzabile riduzione degli effetti collaterali dovuti ad una tossicità sistemica del farmaco che trasportano; inoltre, i *nano carriers* vengono usati anche in patologie differenti dal tumore solido come in tumori che non sono iper vascolarizzati⁹, anche se si è notato che la stessa morfologia tissutale si trova nei tessuti infiammati della patologia dell'intestino infiammato (IBD) e dell'artrite reumatoide¹⁸ facendo ipotizzare un'estensione dell'effetto EPR anche in queste patologie.

Avere, perciò, un sistema di *targeting* attivo o un agente direzionante diventa molto importante. In questo caso prenderemo in considerazione come agente direzionante il frammento *Fab'* dell'anticorpo Trastuzumab. Questa scelta ha notevoli vantaggi perché il *nano carrier* arriverà nell'ambiente tumorale, interagirà con il suo recettore e l'endocitosi del *nano carrier* stesso sarà favorita⁹.

Gli anticorpi, o immunoglobuline (Ig), sono glicoproteine di circa 150 kDa dalla caratteristica forma a Y prodotte dai linfociti B in forma solubile. Sono costituite da due catene pesanti (*Heavy chains, H*) e due catene leggere (*Light chains, L*) a loro volta costituite da domini globulari costanti (C) e variabili (V). In base alle caratteristiche dei domini costanti delle catene pesanti riconosciamo cinque classi di immunoglobuline: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. In terapia si utilizzano soprattutto le IgG e ci soffermeremo a descrivere solo questo sottotipo di immunoglobuline.

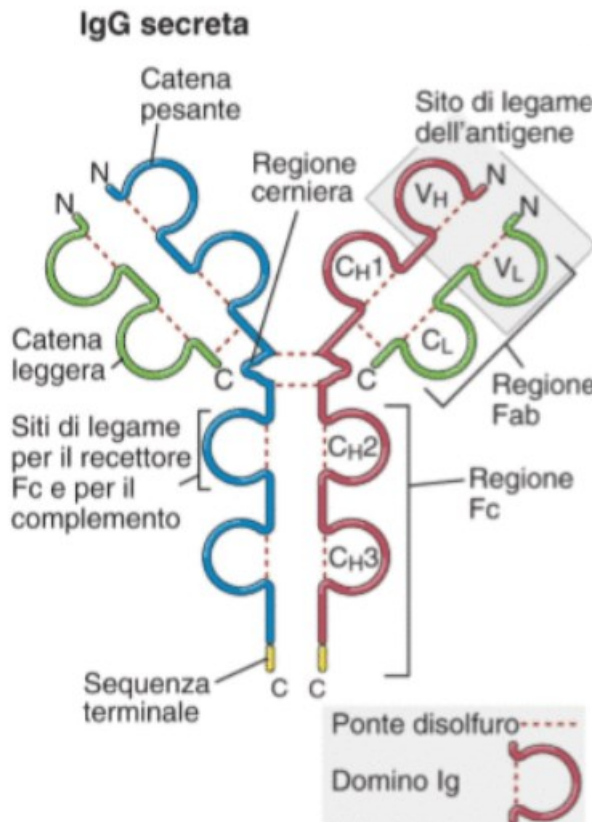


Figura 7: Rappresentazione schematica di una IgG umana¹⁹. Riadattato

Le IgG (Figura 7) sono caratterizzate da una regione Fc, il frammento cristallizzabile che presenta sequenze amminoacidiche molto conservate, e da una regione variabile, *Fab'*, frammento che lega l'antigene. Il frammento Fc e i frammenti *Fab'* sono separati da una sezione detta regione cerniera (*hinge region*) caratterizzata dalla presenza di ponti disolfuro. Questa regione viene idrolizzata dalla papaina o anche dalla pepsina secondo lo schema riportato in figura 8.

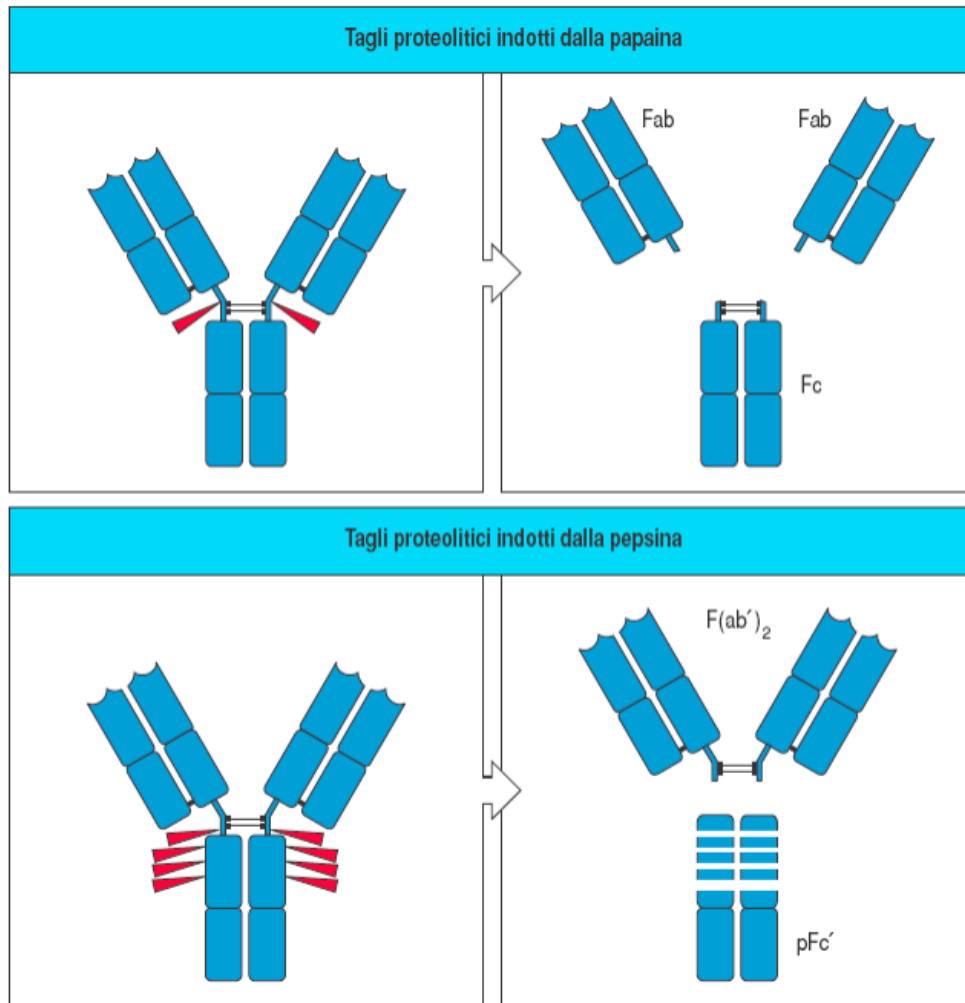


Figura 8: tagli proteolitici della IgG attuati dalla papaina, in alto, e pepsina, in basso. Si noti che la pepsina degrada anche il frammento Fc, oltre ad effettuare una proteolisi nella *hinge region*.

Nelle regioni variabili, sono presenti tre sequenze iper-variabili, dette CDR (*complementary determining region*) che sono responsabili del legame molto specifico con l'antigene.

Per questa ragione e per il fatto che il frammento Fc ha funzioni addizionali, dette effettrici, quali fissare il complemento e attivare le cellule del sistema immunitario, spesso si utilizzano solo i frammenti *Fab'*. L'utilizzo del solo *Fab'* permette di mantenere la specificità verso l'antigene, ma anche di avere delle molecole di peso notevolmente inferiore e una facilità maggiore di costruire dei nano trasportatori adeguati. Usare solo il *Fab'*, però, ha anche degli svantaggi, perché l'anticorpo può essere riciclato tramite il suo Fc e vengono meno le suddette funzioni effettrici ADCC (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) e CDC (*Complement Dependent Cytotoxicity*).

Per costituire gli immunoliposomi, i frammenti *Fab'* vengono legati ad una catena di polimero idrofilico, il PEG, via addizione di Michael con le cisteine presenti sulla proteina. Il PEG, che viene usato, presenta all'estremità opposta un fosfolipide (DSPE) che permetterà l'interazione col liposoma. Il coniugato *Fab'*-PEG-DSPE forma delle micelle in acqua che, mescolate ai liposomi precostituiti e, con una metodologia definita *post insertion*, portano all'inserimento del coniugato sulla superficie del liposoma, andando a costituire gli immunoliposomi²⁰. In figura 9 una rappresentazione schematica della metodologia di *post insertion*.

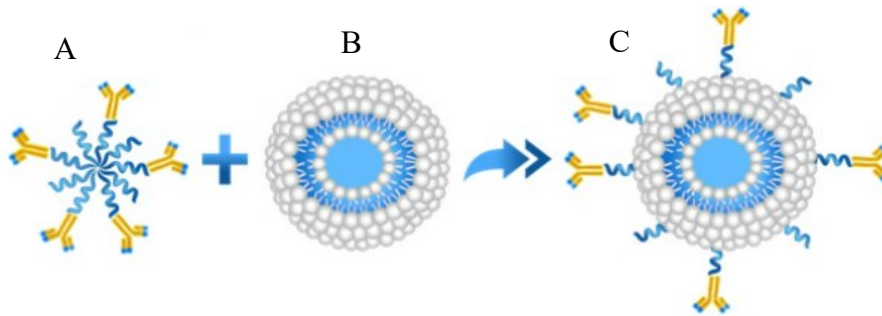


Figura 9: rappresentazione schematica della metodologia *post insertion* per formare gli immunoliposomi: **A.** micella di IgG, PEG e DSPE; **B.** liposoma; **C.** immunoliposoma²⁰.

Come detto utilizzeremo solo il frammento *Fab'* del Trastuzumab.

2.3 TRASTUZUMAB

Il Trastuzumab è un anticorpo monoclonale umanizzato appartenente alle IgG1 κ , sviluppato da Genentech Inc. (San Francisco, California) e commercializzato con il nome di Herceptin®, per il trattamento dei tumori al seno HER2+ metastatizzati e già trattati con un altro chemioterapico. Nel 1998 ha ottenuto la prima approvazione da FDA.

Il Trastuzumab viene prodotto da colture cellulari di CHO (*chinese hamster ovary*) e con ibridoma. L'anticorpo è costituito da una struttura umana e solo le CDR sono murine e precisamente le V_L -CDR₁, V_L -CDR₂, V_L -CDR₃ e V_H -CDR₁, V_H -CDR₂, V_H -CDR₃ e lega con un'alta affinità il sottodominio IV della porzione extra cellulare del recettore HER2 ($K_d=5$ nmol).

Il Trastuzumab riduce il *signaling* intracellulare inibendo la dimerizzazione del recettore, aumentando l'endocitosi del recettore, riducendo il distacco del dominio extracellulare che comporta un'attivazione del dominio tirosin-chinasico (p95-HER2) e attuando la ADCC che porta alla lisi della cellula tumorale².

Il Trastuzumab presenta un'emivita molto lunga che ne garantisce somministrazioni ben distanziate nel tempo².

Si sono verificate reazioni avverse come un'ipersensibilità acuta nel 10% dei pazienti trattati, risolubile con antiinfiammatori, antistaminici e corticosteroidi².

Si è notato che solo il 50% delle pazienti risponde al Trastuzumab perché sembra che alcune pazienti abbiano una resistenza intrinseca o acquisita al farmaco, sia nei siti primari che metastatici del tumore²¹. Tale resistenza porta ad avere metastasi e recidive del tumore al seno. Diversi studi imputano questa resistenza al Trastuzumab a mutazioni PIK3CA, alti livelli di p95-HER2, all'attivazione del IGF-IR (*insuline like growth factor I receptor*), aberrazioni del MET, una scarsa risposta immunitaria, ad alterate interazioni tra il recettore e l'anticorpo e all'attivazione di altri recettori tirosin-chinasici che attivano ugualmente il signaling cellulare^{22,23}. Altri studi indicano che la resistenza al Trastuzumab sia dovuta alla presenza iniziale o indotta di cellule staminali cancerose del seno²¹.

3. I METODI DI PREPARAZIONE DEI LIPOSOMI

Esiste una ampia gamma di metodologie di preparazione dei liposomi e la scelta può andare ad influire sulle proprietà stesse di tali *nano carrier*, quali la dimensione, la lamellarità e l'efficienza di incapsulazione²⁴.

I metodi di preparazione possono essere classificati in tradizionali o innovativi.

Il *thin layer evaporation method*, noto anche come *Bangham method*, è molto semplice e molto utilizzato e consiste nell'ottenimento di un film lipidico, che poi viene idratato con una soluzione acquosa (Figura 10).

Più in dettaglio i lipidi vengono solubilizzati in un solvente organico, tipicamente cloroformio, metanolo, etere o miscele di solventi organici, in un pallone rotondo non a fondo piatto, il solvente viene fatto evaporare e si forma un sottile film lipidico che viene quindi idratato con una soluzione acquosa e si ha la formazione dei liposomi.

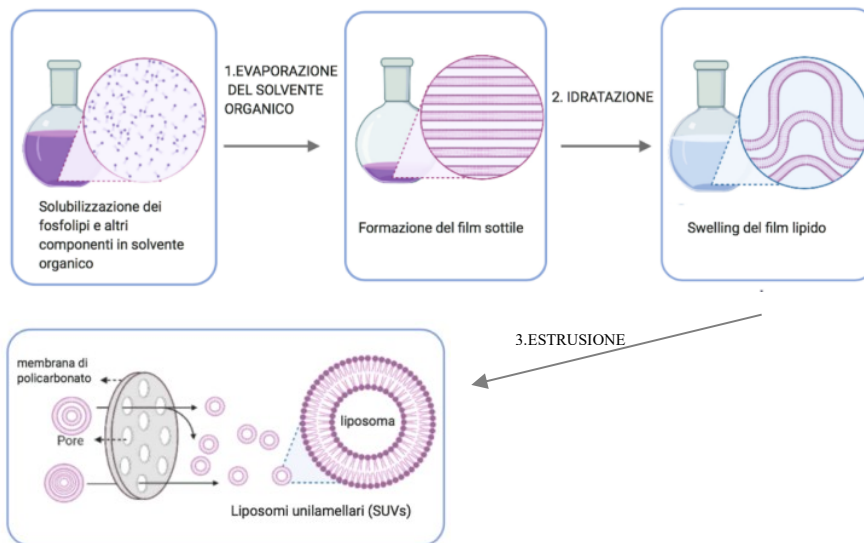


Figura 10: Rappresentazione schematica del metodo per preparare i liposomi definito come *Bangham Method o Thin Film Hydration Method*.

I lipidi, per minimizzare l'entropia del sistema, si disporranno in doppi strati fosfolipidici che poi durante l'idratazione si richiederanno tra di loro a formare vescicole per massimizzare la stabilità del sistema.

I principali svantaggi di tale metodo sono, però, il rischio di non allontanare completamente il solvente organico, la difficoltà di *scale up* e la possibilità di ottenere miscele eterogenee di liposomi di grandi dimensioni²⁵.

Per ridurre l'eterogeneità del sistema è necessario far seguire alla sintesi dei liposomi uno step di riduzione delle dimensioni ed omogeneizzazione che nel caso di questo lavoro è stato fatto tramite il processo di estrusione²⁵. La sospensione liposomiale viene fatta passare numerose volte attraverso delle membrane con i pori a dimensione fissa che nel nostro caso sono di policarbonato con dimensioni pari a 400 nm, 200 nm, 100 nm e 50 nm. Questo metodo rispetto alla sonicazione e all'omogeneizzatore ha il vantaggio di richiedere volumi ridotti e pressioni ridotte²⁵.

4. METODI DI INCAPSULAZIONE DEL FARMACO

La selezione dell'appropriato metodo di incapsulazione del farmaco nei liposomi, affinché svolgano il loro ruolo di *nano carrier*, dipende da numerosi fattori quali le proprietà del farmaco, il rapporto farmaco/lipide, la stabilità del sistema, la sterilità, la necessità di *scale-up* ed i costi²⁶. Inoltre, la quantità di farmaco incapsulato varia in funzione alle caratteristiche del farmaco, dei liposomi e del metodo utilizzato per produrli²⁴. Possiamo però suddividere

grossolanamente in due i metodi di incapsulazione e, precisamente, metodi passivi ed attivi.

Il metodo passivo prevede la dissoluzione del farmaco in un solvente acquoso e l'idratazione del film lipidico con esso. Se invece il farmaco è lipofilo esso verrà solubilizzato in un solvente organico, quindi, mescolato con i fosfolipidi dei liposomi, interagirà con le code aciliche e il solvente verrà allontanato. Il metodo passivo presenta come svantaggi la bassa concentrazione di farmaco nel liposoma e l'elevato *leakage* per i farmaci che sono in parte lipofili²⁶⁻²⁸. Tale metodo è stato utilizzato in questo lavoro per l'incapsulazione del plasmide pCito shNfix nei liposomi cationici.

Il metodo attivo, definito anche *Reverse Loading* o *Remote Loading*, sfrutta un gradiente transmembrana per spingere il farmaco all'interno dei liposomi. I liposomi devono essere già costituiti per utilizzare questo metodo ed è applicabile solo a farmaci che hanno gruppi acido-base deboli²⁹. Il gradiente di pH si viene a generare tra il comparto acquoso interno e quello esterno dove il farmaco viene solubilizzato. Nel comparto esterno il farmaco deve essere neutro per poter diffondere attraverso il *bilayer* lipidico dei liposomi; quindi, quando raggiunge il comparto interno, deve diventare carico in modo tale da non poter retro diffondere e fuoriuscire dai liposomi stessi e questo è garantito da un pH che sia inferiore alla pK_a del farmaco. Inoltre, per l'equilibrio di massa, l'equilibrio acido-base all'esterno del liposoma si sposterà in modo netto verso la forma neutra che man mano viene a sottrarsi dalla soluzione, perché diffonde nel liposoma. In questo lavoro di tesi il *Remote Loading* è stato applicato alla doxorubicina. Con questo metodo si riescono ad ottenere efficienze di incapsulazione molto alte ed il *leakage* è molto ridotto²⁹.

5. CARATTERIZZAZIONE DEI LIPOSOMI

Una volta preparati i liposomi e dopo essere stati modificati per l'incapsulazione del farmaco o per l'ancoraggio dell'agente di targeting essi vanno caratterizzati chimico-fisicamente per garantire le loro *performances in vitro* e *in vivo*.

Molte sono le tecniche che ci permettono di analizzare la dimensione, la forma, la lamellarità, la carica e l'efficienza di incapsulazione e alcune sono state riportate in tabella 1²⁵, mentre quelle utilizzate nel presente lavoro sono state descritte nella sezione METODI.

Caratteristica	Tecnica analitica
Dimensione	DLS, NMR, FFF, SEC, TEM, AFM
ξ -potential	Laser doppler electrophoresis, DLS
forma	TEM, AFM, small angle X-Ray Scattering, ^{31}P -NMR
Lamellarità	DSC
Comportamento di fase	TGA, NMR, FTIR, XRD
Efficienza di incapsulazione	HPLC, UPLC, LC-MS, GC-MS, NMR
Rilascio del farmaco	Metodi spettrofotometrici, HPLC e UPLC

Tabella 1: tecniche analitiche usate per la caratterizzazione dei liposomi. Adattato²⁵.

6. IL TUMORE AL SENO

Il tumore o neoplasia indica una condizione patologica in cui le cellule sottostanno ad una crescita incontrollata con la potenzialità di diventare maligne per l'acquisizione di differenti caratteristiche aberranti come l'indipendenza nei segnali di crescita cellulare, insensibilità verso i segnali di non crescita cellulare, angiogenesi smodata, insensibilità ai segnali pro apoptotici ed instabilità genetica³⁰⁻³³. I tumori possono essere benigni ed avere un rapporto di compressione con l'ambiente circostante o maligni ed avere un rapporto di infiltrazione con l'ambiente circostante. Tutti i tessuti possono sviluppare tumori benigni e maligni. Nei tumori benigni la massa presenta confini netti e le caratteristiche istologiche simili al tessuto di origine. Nei tumori maligni invece non si hanno confini netti, ma sono cellule infiltrate e infiltranti.

Il tumore al seno metastatico è un tumore diffuso anche ad altri tessuti e le metastasi più probabili si hanno alle ossa, al cervello, al fegato e ai polmoni. Anche in seguito a rimozione del tumore primario, le micro-metastasi che non sono rilevabili possono causare l'insorgenza di un altro tumore che in genere è differente dal tumore primario e che può rispondere alla terapia in modo diverso. Il tumore al seno nel 30% dei casi esiterà in una forma di metastasi³⁴.

Il tumore al seno oggi ha un'incidenza nelle donne del 24,5% ed una mortalità del 15,5% (680000 casi nel mondo) rispetto a tutti i tumori diagnosticati nel 2020 che quindi lo pone come la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari³⁵. Di questi circa il 15-20% è risultato positivo all'HER2 e viene definito HER2+ ed è una forma particolarmente aggressiva della patologia con un'intrinseca malignità tanto che fino agli anni '90 solo il 2-5% delle pazienti con tale tumore poteva sopravvivere sino a 5 anni³⁴.

Un tumore HER2+ indica la presenza di cellule con una sovra espressione del recettore transmembrana tirosin-chinasico HER2, sovra espressione di circa 100 volte rispetto alle cellule normali.

6.1 IL RECETTORE HER2

Il recettore *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2, noto anche come ErB2, HER2/neu o c-erbB2 è un recettore di transmembrana da 185kDa con attività tirosin-chinasica. Appartiene alla famiglia dei recettori HER: HER1, HER2, HER3 e HER4, ma è l'unico di cui non si conosce il ligando fisiologico, tanto che viene anche definito *ligandless receptor*; tuttavia, è il partner preferito per le etero-dimerizzazioni con gli altri recettori della medesima famiglia. In contrasto con gli altri recettori della stessa famiglia, l'HER2 presenta una struttura extra cellulare che assomiglia a quella degli altri recettori quando sono attivati del ligando. Quando etero-dimerizzano tali recettori attivano un potentissimo segnale proliferativo. Questa glicoproteina attiva diversi *pathway* intracellulari di differenziazione, proliferazione ed attività antiapoptotica³⁶. In figura 11 uno schema riassuntivo dei percorsi di segnalazione intracellulare che tali recettori attivano.

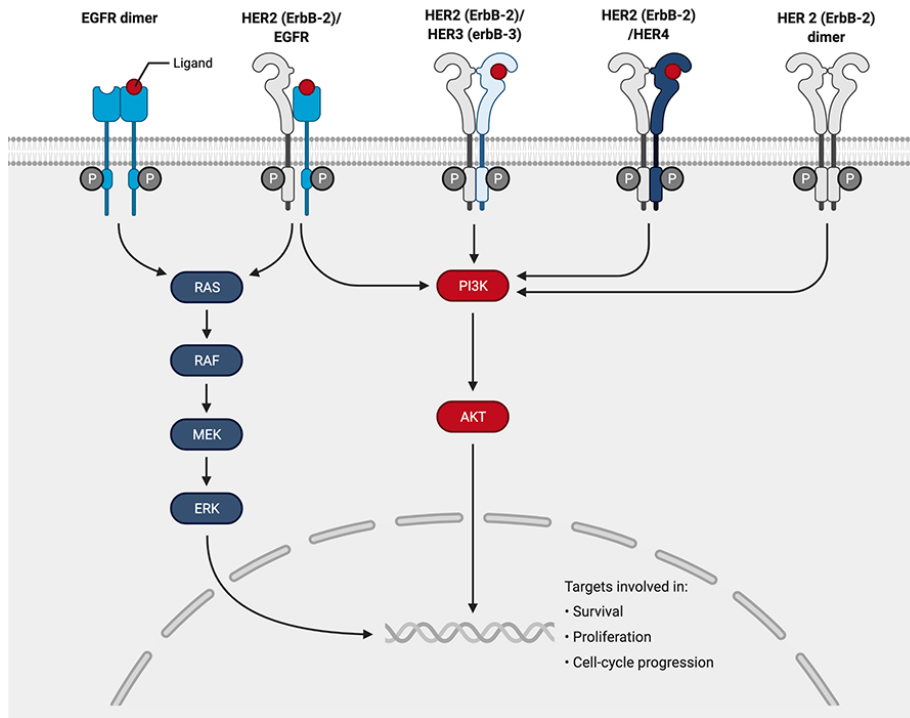


Figura 11: signaling pathways di HER2. Biorender.com

Il dominio extra cellulare dell'HER2 è suddivisibile in quattro sottodomini (I-IV), i sottodomini II e IV sono ricchi di cisteine e sono coinvolti nella etero e omodimerizzazione³⁶. Il sottodominio IV viene legato dal Trastuzumab, mentre il sottodominio II dal Pertuzumab, un altro anticorpo monoclonale umanizzato³⁶. Il legame di questi due anticorpi con il recettore HER2 inibisce la dimerizzazione e quindi ostacola le cascate del segnale intracellulare.

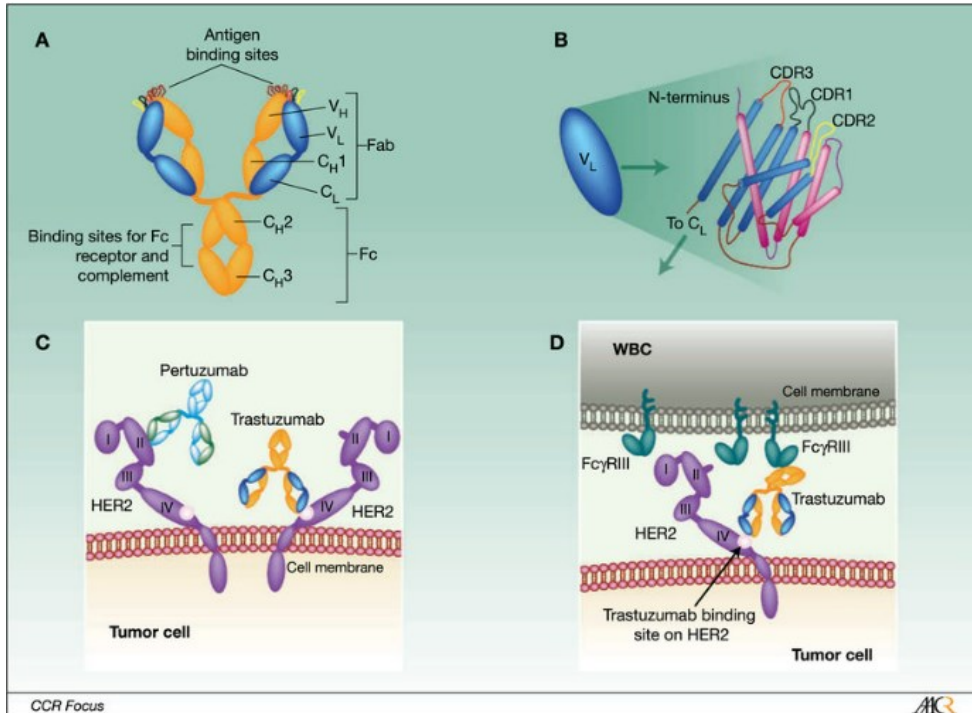


Figura 12: **A:** struttura schematizzata del Trastuzumab; **B:** struttura della regione V_L del Trastuzumab con evidenziate le tre CDR; **C:** legame del Trastuzumab e Pertuzumab ai due diversi domini extracellulari del HER2; **D:** le funzioni effettrici del Trastuzumab dovute al suo Fc (WBC indica i leucociti)²⁶.Adattato.

Nelle cellule normali il recettore HER2 riveste un ruolo importante in tutte le fasi dello sviluppo cellulare³⁶. Mentre la sua sovra espressione o mutagenesi porta alla cancerogenesi e alla metastasi. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la soppressione dell'HER2 porta all'apoptosi delle cellule tumorali del seno, per questo è diventato il target ideale per le terapie antitumorali selettive che con l'Herceptin hanno avuto il loro farmaco di avvio^{21,34}.

6.2 LA TERAPIA DEL TUMORE AL SENO.

Le strategie terapeutiche per il tumore al seno consistono in trattamenti loco-regionali (chirurgia e radioterapia) e terapie adiuvanti (chemioterapia, terapia ormonale, terapia a bersaglio molecolare)²³.

Nella malattia allo stadio iniziale il trattamento standard è la chirurgia conservativa associata a radioterapia o mastectomia. Dopo la chirurgia viene proposto un trattamento sistemico adiuvante per ridurre il rischio di recidiva e di morte ad esso associata. Nelle pazienti con carcinoma mammario in fase iniziale HER2 positivo operato e ad alto rischio di recidiva (linfonodi ascellari positivo o recettori ormonali negativi) in associazione alla chemioterapia associata a Trastuzumab oggi è disponibile anche l'anticorpo monoclonale Pertuzumab³⁷.

Nella malattia metastatica, che nel 6-7% dei casi si presenta già alla diagnosi, la scelta del trattamento sistemico si basa sulla caratteristica del tumore e dei parametri biologici. Nella malattia con recettori ormonali positivi ed HER2 negativa, si utilizzano gli inibitori delle cicline CD4/6 accanto all'ormonoterapia³⁷.

Nei tumori metastatici HER2+ si utilizza il doppio blocco anti HER2, Trastuzumab e Pertuzumab, associato al docetaxel (appartenente alla famiglia dei taxani ad azione antimitotica, EMA)²³.

Negli altri casi la chemioterapia rimane il *gold standard*³⁷.

Per il tumore alla mammella i chemioterapici principali sono le antracicline, i taxani, come docetaxel e paclitaxel, il 5-fluorouracile, la capecitabina, il metotressato e i derivati del platino.

Presentano meccanismi di azione differenti, ma il più interessante risulta essere la doxorubicina perché è uno dei farmaci più efficaci, non solo nei confronti del carcinoma mammario ma anche per i carcinomi alle ovaie, all'utero, alla tiroide, per la leucemia linfoblastica, il linfoma di Hodgkin, il tumore al polmone a piccole cellule e la leucemia mieloblastica acuta³⁸⁻⁴⁰.

La doxorubicina è un antibiotico antraciclino che deriva dal battere *Streptomyces peucetius*, e si utilizza sin dagli anni '60 come chemioterapico⁴¹. Il suo meccanismo di azione primario deriva dalla sua abilità di intercalarsi alle basi azotate del DNA causando la rottura del doppio filamento e inibendo la sintesi del DNA e dell'RNA⁴¹. La doxorubicina inibisce anche l'enzima topoisomerasi II, causando un danno al DNA e l'induzione all'apoptosi⁴¹. Se in combinazione col ferro, la doxorubicina causa un danno ossidativo mediato dai radicali liberi al DNA, limitando ulteriormente la sintesi del DNA⁴¹. In figura 13 la struttura della doxorubicina che rende conto immediatamente della sua capacità di intercalarsi alle basi azotate del DNA.

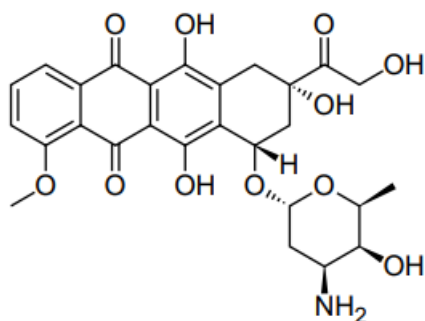


Figura 13: formula di struttura della doxorubicina.

Viene somministrata per infusione endovenosa circa ogni 21 giorni ed è facilmente riconoscibile per la sua colorazione rossa dovuta al sistema planare rigido di dieni coniugati.

Si distribuisce rapidamente ai tessuti ed ha un'emivita di circa 48 ore.

Le reazioni avverse sono molto comuni e comprendono affaticamento, alopecia, nausea, vomito e piaghe nel cavo orale. Possono anche verificarsi mielosoppressione e diagnosi di tumori maligni secondari. L'extravasazione di doxorubicina durante la somministrazione può causare ulcerazioni tissutali gravi e necrosi che peggiorano nel tempo. La doxorubicina è anche associata alla tossicità cardiaca che ne limita l'uso prolungato. Il meccanismo alla base della tossicità cardiaca è diverso dalla sua capacità antitumorale. Coinvolge un aumentato stress ossidativo, una down-regolazione di geni specifici cardiaci e la apoptosi dei miociti cardiaci. La tossicità acuta cardiaca appare nell'11% dei pazienti trattati con doxorubicina pochi giorni dopo la sua somministrazione^{42,43}. La tossicità acuta cardiaca si manifesta come miopericardite reversibile, disfunzione al ventricolo sinistro o aritmie. Le aritmie legate alla doxorubicina si verificano nel 26% dei pazienti trattati. La tossicità cardiaca tardiva e cronica può verificarsi dopo somministrazione di doxorubicina ed è il più grave e serio effetto avverso e si verifica nel circa 1,7% dei casi in trattamento. Si può anche verificare infarto cardiaco che nel 50% dei casi è mortale.

6.2.1 SINTESI DI IMMUNOLIPOSOMI PER LA TERAPIA DEL CARCINOMA MAMMARIO HER2+

Un primo obiettivo di questa tesi sarà la sintesi di immunoliposomi *super stealth* con incapsulata la doxorubicina per il trattamento del carcinoma mammario HER2+.

7. LA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

La distrofia muscolare di Duchenne è una malattia neuromuscolare fatale che colpisce un maschio su 3500- 5000 nuovi nati⁴⁴. È perciò considerabile come una malattia rara (Orphanet). È caratterizzata da un progressivo indebolimento e deterioramento muscolare. Causa un progressivo peggioramento nei movimenti muscolari poiché colpisce i muscoli scheletrici, ma anche causa problemi cardiaci perché anche i miociti ne sono affetti. I maschi affetti da DMD mostrano i primi sintomi attorno ai 2 anni, ma già verso i 10 anni necessitano della sedia a rotelle e attorno ai 20 anni necessitano del respiratore automatico. L'aspettativa di vita oggi è inferiore

ai 30 anni e si muore per complicazioni cardiache o complicazioni respiratorie^{45,46}. È una malattia genetica ereditaria di tipo recessivo legata al cromosoma X in cui si ha una mutazione al gene DMD che codifica per la distrofina, una proteina che lega l'actina citoscheletrica nelle fibre muscolari alla matrice extracellulare formando una rete con le glicoproteine del sarcolemma.

La distrofina è una proteina intracellulare di 3685 amminoacidi, che pesa 427 kDa, è molto flessibile e la possiamo suddividere in 4 regioni:

- l'N-terminale che presenta il principale sito di legame con la F-actina;
- una regione filamentosa consistente di 25-26 sequenze ripetute che mostrano analogie con la molecola spectrina;
- una regione ricca di cisteine;
- e la regione C-terminale che è necessaria, insieme alla precedente, per legarsi al sarcolemma mediante il complesso delle proteine distrofina-associate (DAP).

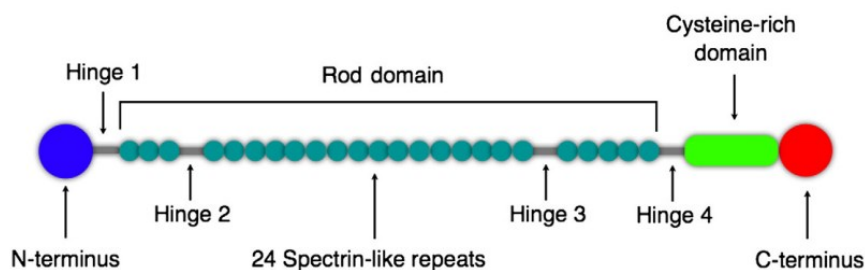


Figura 14: Rappresentazione schematica della distrofina⁴⁷

Il complesso transmembrana DAP, di cui fanno parte i sarcoglicani e i distroglicani, prende contatto con il complesso extracellulare di 156kDa ed interagisce con la laminina che a sua volta lega i componenti della matrice extracellulare.

La distrofina si autoassembla in dimeri antiparalleli con un dominio legante la F-actina e un dominio legante il DAP ad ogni estremità⁴⁸.

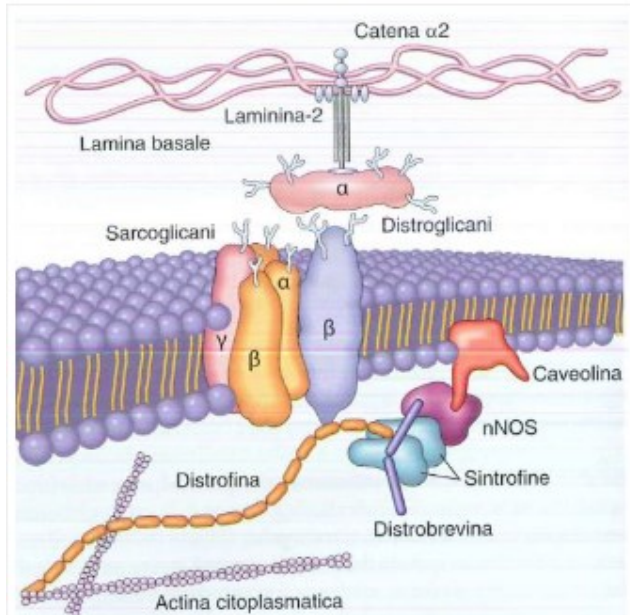


Figura 15: struttura molecolare della distrofina e del DAP⁴⁹.

Questo complesso proteico, che è distribuito lungo l'intera superficie del sarcolemma, è essenziale:

- per evitare che si formino lesioni del sarcolemma durante la contrazione muscolare,
- trasferire alla matrice extracellulare l'attività del muscolo,
- assicurare la cooperatività delle fibre muscolari.

Il gene che codifica per la distrofina (figura 16), il gene DMD, è lungo 2,4 Mb ed è composto da 79 esoni, rendendolo il più lungo gene umano noto. Ci sono vari promotori che possono attivare la trascrizione del gene. Ci sono tre promotori che attivano la completa trascrizione del gene e sono espressi nel cervello, nei muscoli scheletrici e nelle cellule di Purkinje del cervelletto. Sono state identificate sette principali isoforme⁵⁰ della distrofina, ma in verità ci sono moltissime isoforme dovute ad uno *splicing* alternativo di tale gene che traducono poi per proteine di lunghezza diversa.

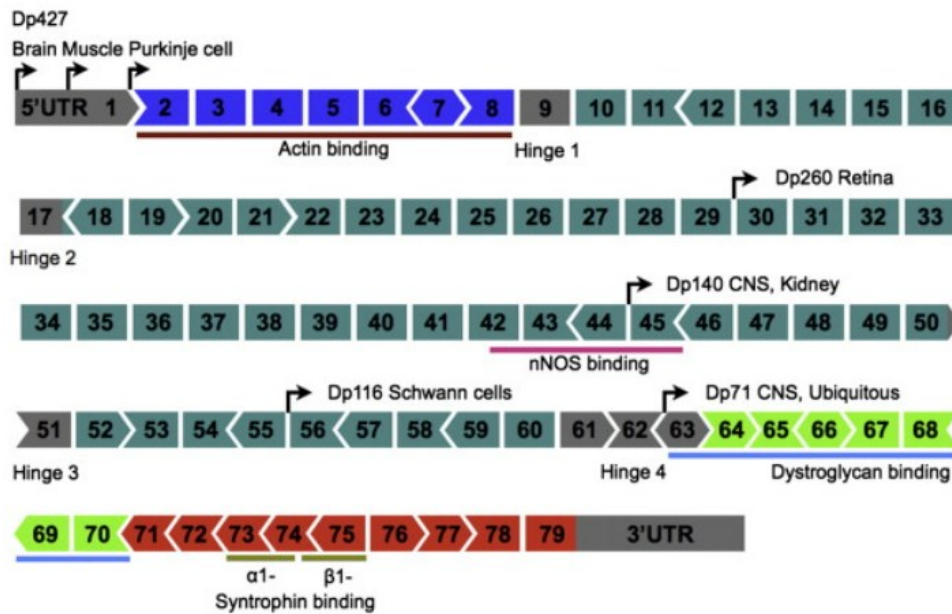


Figura 16: rappresentazione del riarrangiamento in esoni del mRNA. Le frecce indicano i vari promotori. Dp427 è la distrofina, mentre Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 sono alcune isoforme più corte. I vari colori degli esoni rappresentano i domini che tradurranno e che sono rappresentati in figura 14 e 15. Gli esoni sono stati anche rappresentati con forme differenti: il rettangolo indica che l'esone inizia e finisce con una tripletta, le linee oblique indicano che la tripletta inizia e/o finisce nell'esone successivo e/o precedente⁴⁷.

Con questo schema in mente è chiaro che una mutazione della distrofina che porti ad una mancanza di una sua estremità causa un sistema disfunzionale. Nella DMD di solito i pazienti presentano una mutazione che porta alla mancanza del dominio C-terminale.

Nella DMD si sono riscontrate circa il 70% di delezioni, il 7% di duplicazione e il 23% di mutazioni puntuali relative ad uno o più esoni. Se la delezione riguarda gli esoni 48, 49 e 50 si avrà una lettura out of frame e una proteina troncata. Se invece la delezione riguarda gli esoni 48 e 49 la reading frame viene mantenuta e si avrà una distrofina più corta ma funzionale. Questo secondo caso compete alla distrofia di Becker che è molto meno grave della DMD e talora è asintomatica fino ai 60 anni. Nella DMD si trovano tuttavia anche fibre di distrofina funzionali, sono le *revertrant fibres*, fibre che si hanno per uno splicing in cui c'è un salto spontaneo di esoni per evitare in una corretta *reading frame*⁴⁷.

7.1 LA TERAPIA NELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

Oggi la *gold standard therapy* per la DMD sono i corticosteroidi. Anche se esattamente non ne è noto il meccanismo in questa patologia, hanno un effetto antiinfiammatorio e, nonostante non influenzino la rigenerazione delle fibre, aumentano la forza dei muscoli scheletrici, migliorando la respirazione e la deambulazione e prolungando l'aspettativa di vita^{44,51}. Tuttavia, questa non è una cura, ma un trattamento palliativo ed inoltre i pazienti devono fare i conti con i numerosi effetti collaterali dovuti ai corticosteroidi quali aumento di peso, osteoporosi, cataratta, ecc^{44,51}.

Ci sono più di 50 progetti che hanno come obiettivo la cura della DMD, tra cui la terapia genica, la terapia cellulare, l'editing genomico e l'*exon skipping*.

Nella terapia genica si cerca di agire sul danno genetico e a ripristinare la produzione della distrofina funzionale veicolando il gene sano all'interno del tessuto muscolare. Questo approccio si è rivelato problematico per la scarsa trasfezione dovuta alle grandi dimensioni del gene e all'attivazione di una risposta immunitaria perché si sono utilizzati vettori virali. Tuttavia più recentemente si è cercato di transfettare geni di dimensioni ridotte (mini- o micro-distrofina) ma funzionali della distrofina veicolati da vettori virali adeno-associati; questo approccio è derivato dall'osservazione della distrofia di Becker in cui è presente una proteina più corta ma comunque sufficientemente funzionale⁴⁴.

Nella terapia cellulare si forniscono all'organismo le cellule staminali in grado di colonizzare il tessuto muscolare con cellule sane che riescono a produrre distrofina funzionale. Si sono attuati trapianti eterologhi di mesoangioblasti, cellule staminali normalmente associate ai vasi sanguigni che sono capaci di rigenerare il tessuto muscolare danneggiato⁵². Questi studi sono ostacolati però da problemi di rigetto e scarsa veicolazione sistemica delle cellule trapiantate e dalla morte massiccia delle cellule trapiantate^{44,53}. Studi più recenti si stanno focalizzando sull'uso di cellule staminali pluripotenti umane.

Nella terapia dell'editing genomico che sfrutta il sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated Protein 9*) si veicola l'endonucleasi 9 in un sito specifico del genoma e converte la mutazione da *out-of-frame* a *in-frame* originando una distrofina più corta ma funzionale come nella distrofia di Becker. Per veicolare la piattaforma CRISPR/Cas9 si usano vettori virali (virus adeno-associati), che causano molto frequentemente una risposta dal sistema immunitario ed uno

scarso *pay-load* e vettori non virali⁵⁴. Questi studi sono ancora in corso per la necessità di ottimizzare la strategia di *delivery*.

Nella terapia dell'*exon skipping* si usano piccole sequenze antisense per ristabilire il corretto schema di lettura, eliminando l'esone in cui è presente la mutazione. Nel 2016 la FDA ha approvato l'eteplirsen (Sarepta Therapeutics Cambridge, MA), come farmaco contro la DMD, ma l'EMA (Agenzia Europea del Farmaco) non lo ha ancora approvato. L'eteplirsen si utilizza su pazienti ancora trattabili e prevede il salto dell'esone 51 in pazienti cui mancano gli esoni 49 e 50, mutazione che colpisce circa il 14% della popolazione affetta da DMD⁴⁴. Per ripristinare lo schema di lettura corretto si usano analoghi sintetici degli acidi nucleici chiamati oligonucleotidi antisense che interferiscono con l'mRNA immaturo, pre-splicing. Tali oligonucleotidi antisense si accoppiano con l'mRNA e ostacolano lo spliceosoma esitando nel salto di uno o più esoni dal trascritto finale.

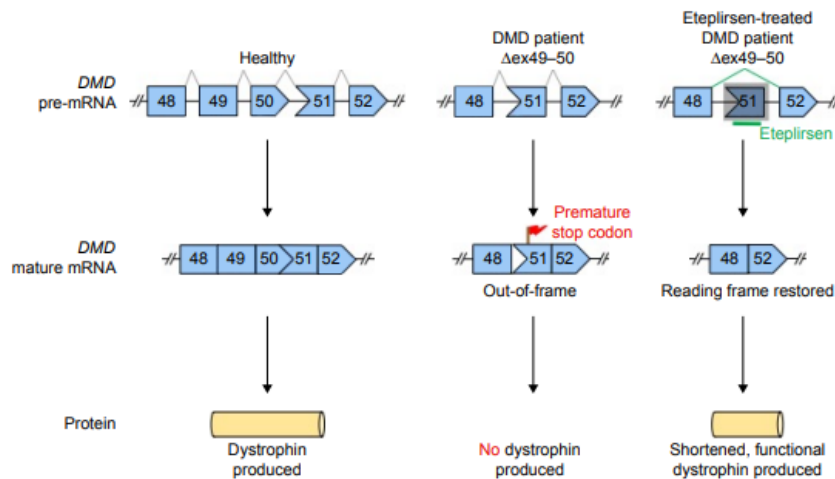


Figura 17: schema dell'azione dell'eteplirsen. A sinistra si ha il gene sano che esita nella sintesi della proteina fisiologica. Al centro il gene affetto dalla mutazione di delezione degli esoni 49 e 50 che esita nella non produzione della distrofina. A destra l'azione dell'eteplirsen che esita nella sintesi di una proteina non fisiologica ma funzionale⁴⁴.

L'eteplirsen è un oligomero di 30 nucleotidi morfolino fosforodiamidati, ovvero le strutture morfoliniche sono legate da una struttura fosfoamminica neutra (figura 18) che rende conto della stabilità del farmaco e della sua sicurezza terapeutica⁴⁴.

INTRODUZIONE

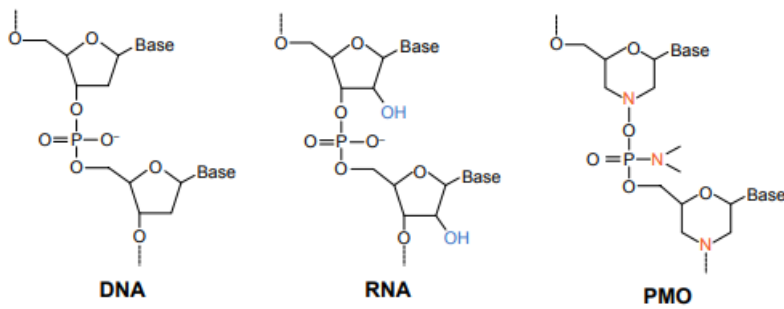


Figura 18: strutture chimiche del DNA, RNA e del morfolino-oligomero (PMO)⁴⁴.

È importante notare che l'eteplirsen non è una cura perché non ripristina il gene sano o sintetizza la proteina fisiologica, ma una terapia per ridurre la gravità della malattia.

Nella terapia delle mutazioni nonsense ritroviamo l'unico farmaco approvato dall'EMA per la DMD, l'ataluren (translarna, PTC Therapeutics International limited, Dublin, Ireland) e approvato dall'AIFA nel 2014. Circa il 13% dei pazienti affetti da distrofinopatie presentano mutazioni nonsense o out-of-frame che esitano in un prematuro stop codon, causano perciò una terminazione anzitempo della traduzione (Figura 19) e in genere si hanno proteine troncate, non stabili e disfunzionali⁵⁵.

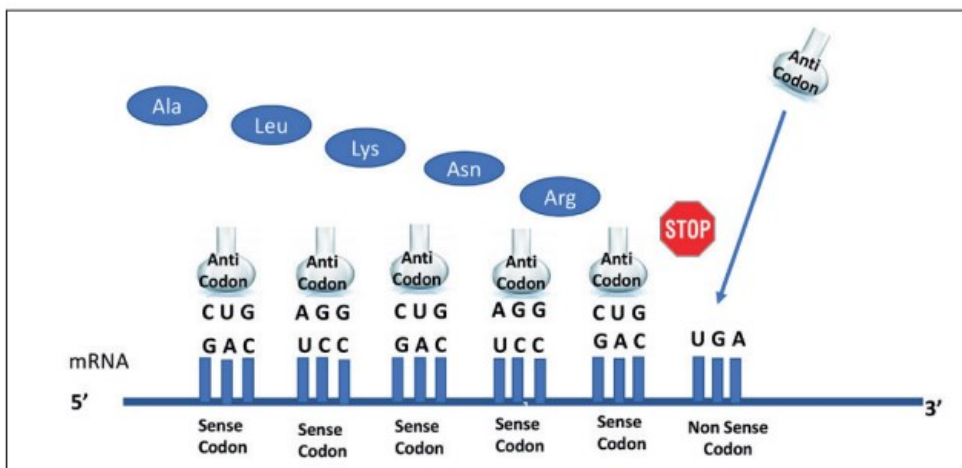


Figura 19: rappresentazione schematica dello stop nella sintesi proteica⁵⁶

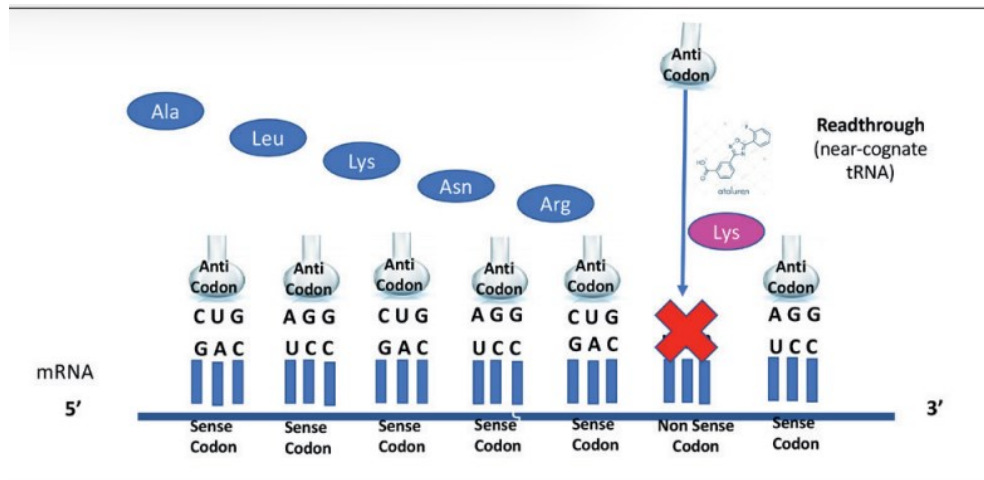


Figura 20: meccanismo di azione dell'ataluren⁵⁶

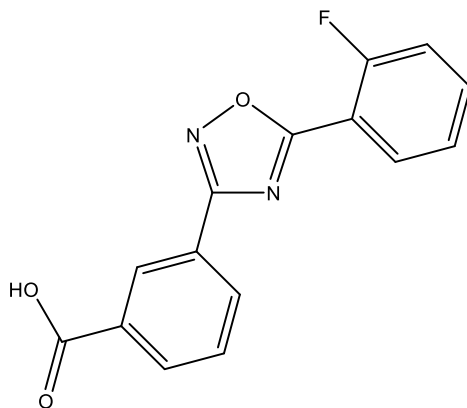


Figura 21: Struttura chimica dell'Ataluren

Questa piccola molecola (figura 21) che si assume per via orale è in grado di superare questa mutazione non-senso e permette di produrre distrofina fisiologica fino al 60% della sua quantità normale, raggiungendo tutti i muscoli scheletrici⁵⁶. E' selettiva per gli stop codon dovuti alla mutazione non-senso e non a quelli fisiologici⁵⁶.

7.1.2 NUOVI APPROCCI NELLA TERAPIA DELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

Fino ad ora però il numero di pazienti elegibile per questi trattamenti è molto limitato, e sono quelli più giovani e con tessuto muscolare integro o poco compromesso, perché non si è ancora riusciti a ricostituire le fibre muscolari

danneggiate che vengono sostituite da tessuto fibrotico. Si è visto che le fibre a lenta contrazione e di tipo ossidativo sono più protette dal danno degenerativo e dallo stress ossidativo⁵⁷. Nei topi che mancavano della proteina Nfix la rigenerazione in seguito a danno era più lenta e si avevano fibre di tipo ossidativo a lenta contrazione. In quest'ottica si è pensato che avere come target l'Nfix fosse di possibile utilizzo nella terapia per la DMD⁵⁷. L'Nfix è un fattore di trascrizione nucleare che è coinvolto nella mutazione nella miogenesi dall'embrione al feto. In particolare, i topi senza Nfix dimostravano di avere muscoli di tipo ossidativo e a lenta contrazione tipici dell'embrione. Dopo la nascita l'Nfix è fondamentale per le corrette tempistiche nella ricostituzione del tessuto dopo un danno. È stato dimostrato che rallentare la rigenerazione permette di avere fibre muscolari meno fibrotiche e quindi in contrasto con i tentativi che si stanno facendo di accelerare la rigenerazione muscolare⁵⁷.

Per rallentare la rigenerazione si cerca di silenziare la sintesi dell'Nfix e per farlo si utilizza uno shRNA (*short hairpin RNA*) codificato da un DNA che viene inserito in un plasmide che viene identificato come pCito shNfix (Figura 22).

Il plasmide presenta anche la sequenza genica che codifica per la proteina *red Tomato*, una proteina fluorescente sul rosso che è un indicatore dell'avvenuta trasfezione.

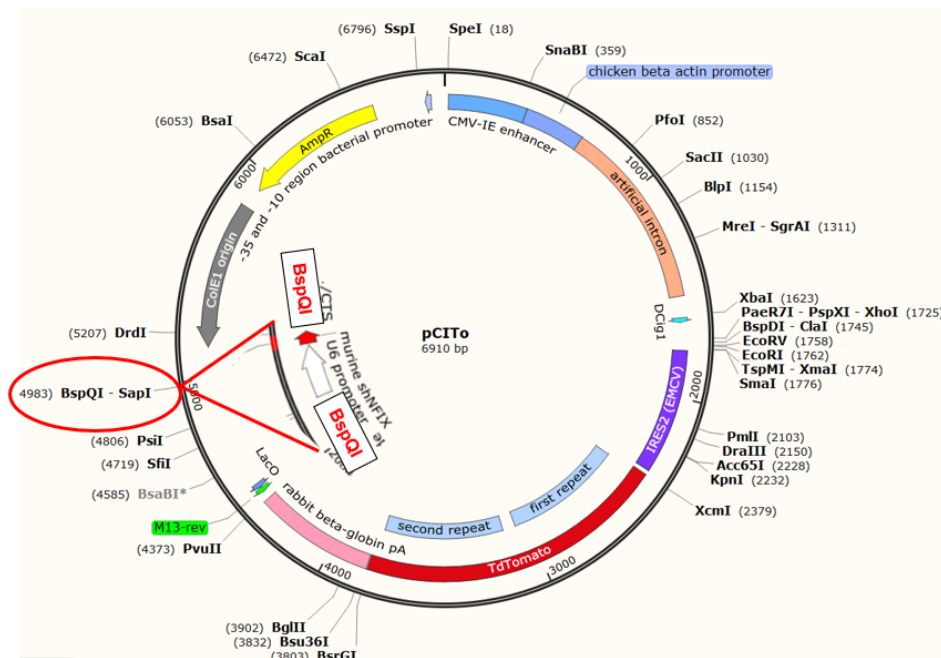


Figura 22: Mappa del plasmide pCito shNfix

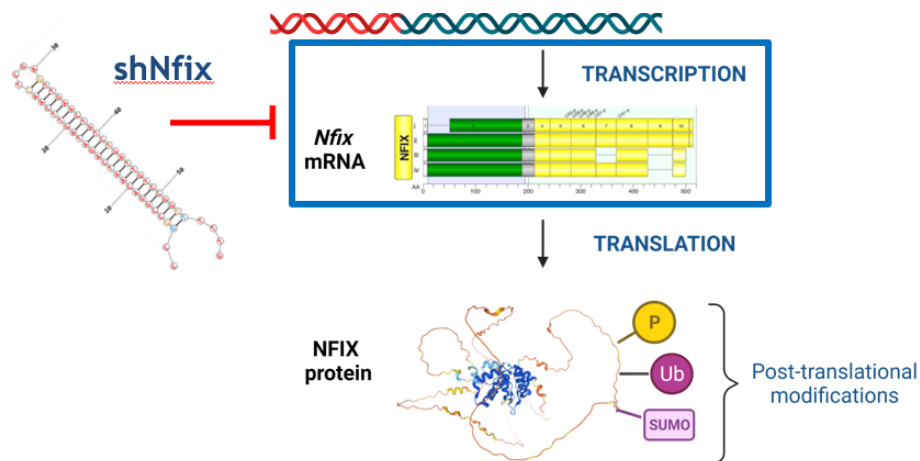


Figura 23: azione dell'shRNA nel bloccare la traduzione della proteina Nfix.

L'shRNA trascritto riesce a silenziare il mRNA di Nfix, con la conseguente riduzione di traduzione della proteina Nfix. L'shRNA viene tagliato da un enzima in miRNA, frammenti corti di meno di 30 bp, e tali miRNA vengono incorporati in un complesso endonucleasico noto come RISC (*RNA-induced silencing complexes*). Il RISC-miRNA si associa all'mRNA complementare ai mi-RNA e la formazione di questo RNA duplex porta alla degradazione del RNA ad opera delle endonucleasi del RISC o all'inibizione della traduzione⁵⁸.

7.2 SISTEMA DI DELIVERY PER IL PLASMIDE PCITO SHNFIX.

Fino ad ora gli studi sono stati fatti su topi silenziando il gene Nfix, ma si vuole provare a transfettare su soggetti affetti da DMD il sistema per silenziare il gene Nfix. Il nostro secondo obiettivo di questo lavoro di tesi sarà quello di sintetizzare un sistema di trasporto per tale plasmide e riuscire a transfettare il plasmide nei muscoli, il cui successo si evidenzierà dalla colorazione fluorescente rossa. Il sistema di delivery prevede la formazione di nano sistemi cationici che inglobano il plasmide e tale sospensione verrà iniettata a livello topico nei muscoli delle cavie per silenziare il fattore di trascrizione Nfix.

Questi nano carriers per endocitosi attraverseranno la membrana cellulare e libereranno il plasmide attraverso un processo definito *endosomal escape*. Il plasmide attraverserà i pori nucleari entrerà nel nucleo e attuerà il suo meccanismo atto a silenziare l'mRNA che codifica per il Nfix.

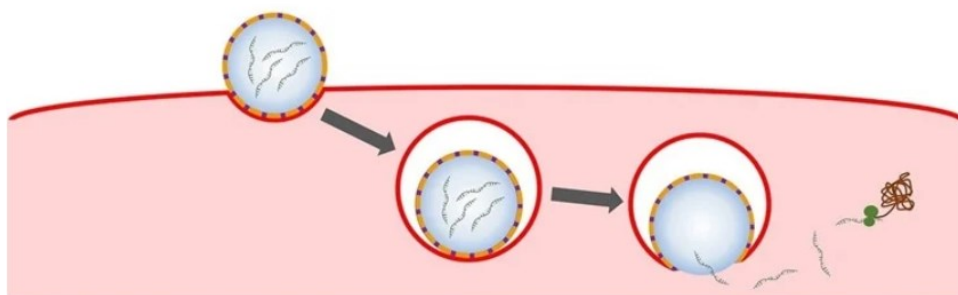


Figura 24: Immagine adattata da Angewandte Chemie International edition

MATERIALI

I solventi usati come acetonitrile, acido trifluoroacetico, cloroformio, dimetilsolfossido, etanolo, metanolo, etere etilico, diclorometano, i solventi deuterati come cloroformio deuterato e acqua deuterata oltre al tensioattivo Triton X sono stati acquistati da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

I sali utilizzati come cloruro di sodio, solfato di ammonio, borato di sodio, cloruro di potassio, potassio fosfato dibasico, tiocianato di ammonio, sono stati acquistati da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

Il tricloruro di ferro esaidrato è stato acquistato dalla Carlo Erba, Milano.

L'agarosio è stato acquistato da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

La doxorubicina è stata acquistata da 21CEC PX Pharma Ltd. (Eastbourne, East Sussex, Regno Unito).

Il plasmide pCito shNfix shNfix è stato preparato dai laboratori di biologia cellulare della prof.ssa Graziella Messina presso l'Università di Milano.

La lipofectamina® e il Reagent plus® sono stati acquistati da Thermofisher scientific (Waltham Massachussets, USA).

DOPE è stato acquistato da Avanti Polar Lipids, (Alabama, USA).

HSPC e DSPE sono acquistati da Nof Corporation (Tokyo, Giappone).

Il colesterolo è stato acquistato da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

NHS, β -Glu, DCC, Gly-Gly e TNBS sono stati acquistati da Fluka Chemika (Messerschmittstr, Germany) e da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

BMPS è stato acquistato da ProteoChem (Hurricane, USA).

Il colorante fluorescente Vybrant® DiD è stato acquistato da Thermofisher scientific.

Gel Red ® è l'intercalante fluorescente per DNA e RNA è stato acquistato da Thermofisher.

L'anticorpo monoclonale Trastuzumab è stato acquistato dalla farmacia vaticana.

m-PEG-DSPE è stato acquistato dalla Nof Corporation (Tokyo, Giappone).

mPEG β Glu β Glu β Glu β Glu β e NH $_2$ PEGDSPE $_2$ erano stati precedentemente sintetizzati in questo laboratorio.

MATERIALI

La cisteammina è stata acquistata da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

La pepsina è stata acquistata da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

Si sono usate le bilance Gibertini mod. E50S/2 Semi-Micro Balance 0.01 mg (Milano, Italia) e Sartorius mod. Entris 2201-1S (Goettingen, Germany).

Per misurare il pH è stato usato Seven Easy della Mettler Toledo (Columbus, Ohio, Stati Uniti) o il Metrom 794 Basic della Tritino (Herisau, Svizzera) o le cartine tornasole Tritest della Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Neumann-Neander, Germania).

Per sonicare si è usato Branson-Emerson 5210 Ultrasonic Cleaner (Danbury, CT, USA).

Per le formulazioni di liposomi è stato utilizzato l'estrusore della Avestin Europe GmbH (Manheim, Germania) LipoFast Bifasic Extruder e si sono usati i filtri Whatman® di policarbonato Nucleopore TrackEtched di 400nm, 200nm, 100nm e 50nm.

Per la purificazione si sono usate colonne SEC PD-10 Sephadex G-25 di GE Healthcare Life Science (Malborough, Massachusetts, USA) e resina Sepharose CL-4B di Sigma Aldrich s.r.l. (Milano, Italia).

Per concentrare le sospensioni si sono usate Amicon Ultra-15 in centrifuga Sorvall™ ST 16 della Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Per filtrare le soluzioni acquose si è usato filtro Millipore di cellulosa acetato da 0.22 µm (Billerica, MA USA).

Per concentrare si sono usate le PES (Pierce Protein Concentrator) della Thermo Fisher e centrifuga Speed Micro Centrifuge della Scilogex LLC (Rocky Hill, Connecticut, USA).

Per evaporare i solventi organici si è usato il Rotavapor Buchi II (Flawil, Svizzera).

Per liofilizzare si è usato il Liofilizzatore Hetosic HETO (Allerød, Danimarca).

Si è utilizzato lo spettrofotometro UV-Vis Evolution 201 di Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Per misurare Z-Average e ζ-potential si è usato lo strumento Ltd. Zetasizer Nano ZS di Malvern (West Worcestershire, UK).

MATERIALI

Si è utilizzato l'NMR della Brüker Avance III 400 MHz.

Si è utilizzato il microscopio a trasmissione elettronica Tecnai G2 (FEI) abbinato alla camera digitale Veleta (Olympus Soft Imaging System).

METODI

1. SINTESI DI Mal-PEG_{5k}-DSPE₂

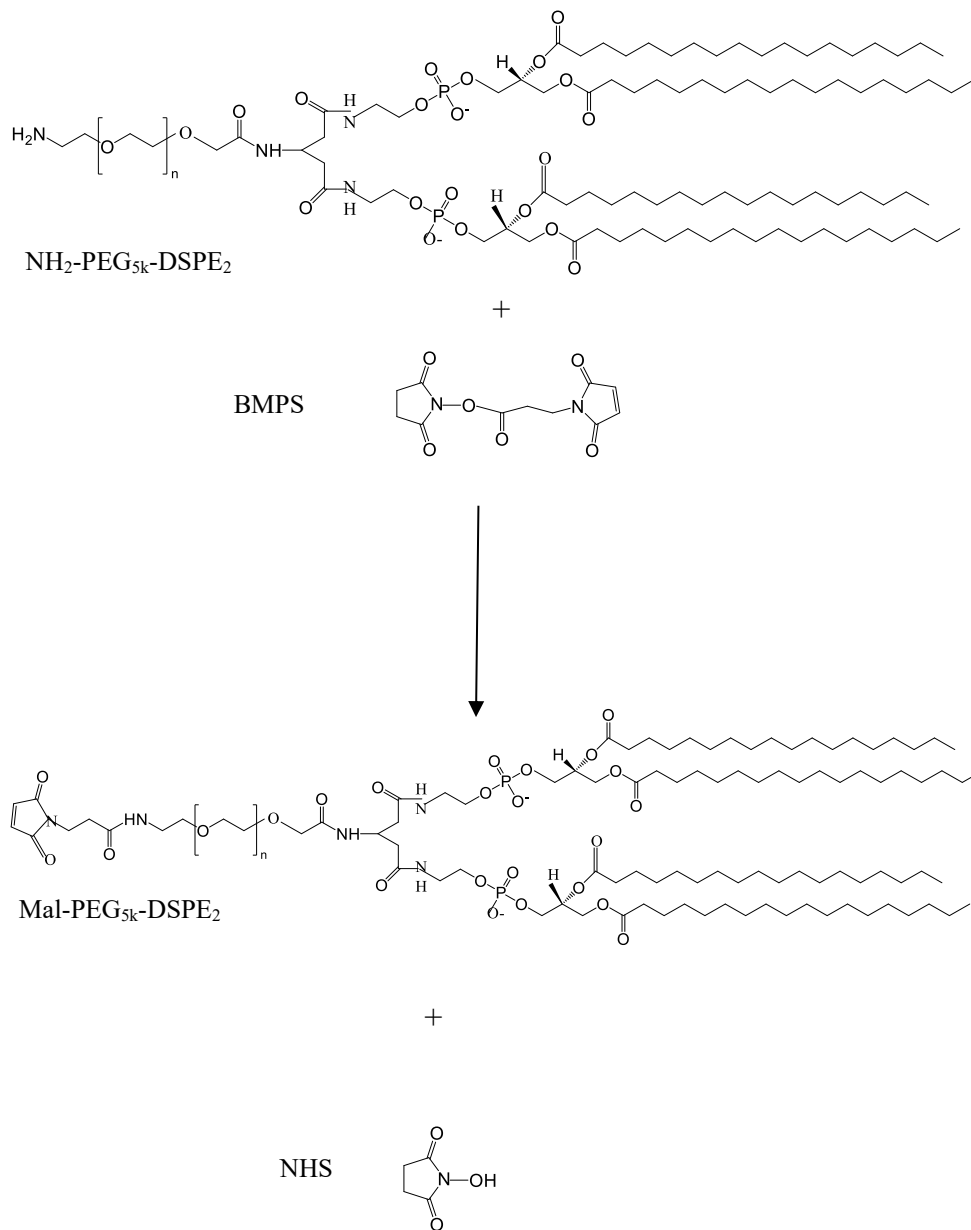


Figura 25: Sintesi di Mal-PEG_{5k}-DSPE₂

Si pesano 0,1 g di NH₂-PEG-DSPE₂ (MW 6184uma) e si solubilizzano in 5ml di PBS 1X pH=7,2. Per costituire il tampone PBS 10X abbiamo utilizzato i seguenti sali: NaCl 80,66 g, KCl 2,01g, Na₂HPO₄·2H₂O 17,8g, KH₂PO₄ 2,72g solubilizzati in 1l di H₂O milli-Q.

Alla soluzione di PEG si aggiungono 1,67ml di ACN sotto forte agitazione. Si solubilizzano 35 mg di BMPS (MW 266,21uma) in 700 µl di DMSO.

Si introduce la soluzione di BMPS nella soluzione di polimero goccia a goccia e sotto forte agitazione. Si aggiunge NaOH 5N per mantenere il pH=7,2 perché NHS che si libera è un acido e fa aumentare l'acidità del sistema. La reazione procede per 45 minuti a temperatura ambiente.

Si dializza la soluzione per eliminare NHS usando una membrana con un cut-off da 14KDa per tutta la notte in acqua milli-Q e cambiando l'acqua 2 volte. Si congela e si liofilizza.

Il prodotto di reazione (Figura 1) viene quindi analizzato tramite spettroscopia NMR ¹H e ¹H-DOSY a 400 MHz in CDCl₃.

2. DIGESTIONE DI TRASTUZUMAB

2.1 DIGESTIONE PROTEOLITICA DI TRASTUZUMAB PER OTTENERE IL FRAMMENTO F(ab')₂

Per la digestione di trastuzumab (Figura 26) si utilizza l'enzima proteolitico pepsina in rapporto Enzima : Substrato (E/S) 1:50 p/p. A 15,31 mg di trastuzumab alla concentrazione di 22,85 mg/ml in tampone acetato 0,1M pH=3,8 si aggiunge l'enzima pepsina (0,3 mg) precedentemente solubilizzato nello stesso tampone.

Si fa decorrere la reazione di riduzione per 3 ore a 37°C e 300 rpm in thermomixer.

Si purifica il F(ab')₂ dall'anticorpo non reagito e dai frammenti di Fc utilizzando una colonna Superose 12 10/300 GL eluendo con PBS 1X pH=7,2 al flusso di 0,5 ml/min, in condizioni isocratiche (detector impostato a λ= 280 nm).

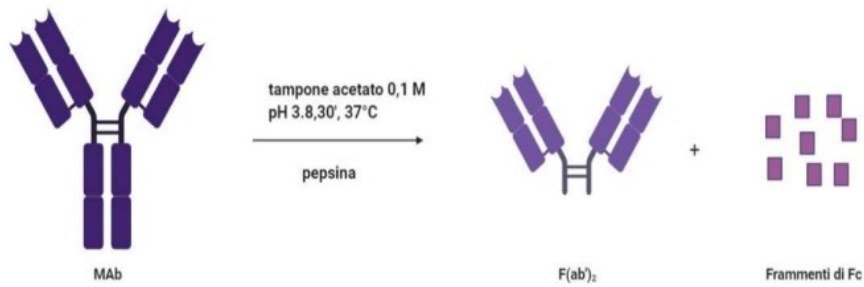


Figura 26: rappresentazione schematica della digestione proteolitica dell'anticorpo Trastuzumab con pepsina che porta ad ottenere F(ab')₂ e frammenti della frazione Fc.

Il F(ab')₂ recuperato viene quantificato mediante BCA (paragrafo 10.2).

2.2 RIDUZIONE DEL FRAMMENTO F(ab')₂ PER OTTENERE Fab'

Il F(ab')₂ ottenuto viene fatto reagire per 30 minuti a 25°C in tampone fosfato 0,1M pH=7,2 con 10 mM cisteamina (MW 77,15 uma) ad una concentrazione di 10 mg/ml. In questo modo la cisteamina riduce i ponti disolfuro della regione cerniera (*hinge region*) preservando invece i ponti disolfuro che sono presenti tra le catene leggere e pesanti del frammento (Figura 2.2.1).

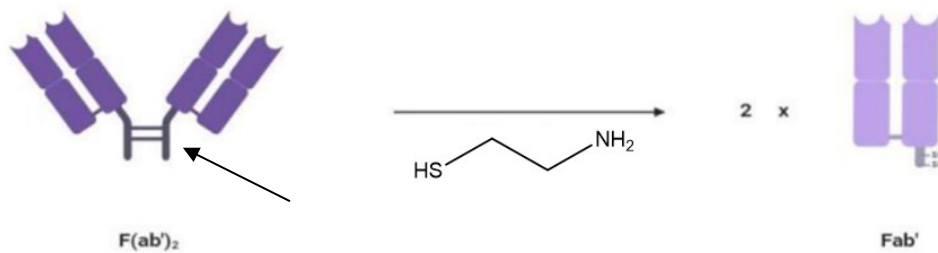


Figura 27: rappresentazione schematica della riduzione operata dalla cisteamina. La freccia indica la regione cerniera, *hinge region*.

Per la purificazione di Fab' si usa una colonna Superdex 200 Increase10/300 GL, con eluente PBS 1X pH=5 con EDTA 10 mM. L'EDTA è necessario per evitare che i tioli di Fab' si riossidino. Fab' viene concentrato in Vivaspinn da 10kDa. La concentrazione del frammento viene determinata tramite saggio BCA.

3. PEGHILAZIONE DI Fab' CON Mal-PEG_{5K}-DSPE₂

METODI

Per la peghilazione di Fab', il Mal-PEG_{5k}-DSPE₂ è stato solubilizzato in PBS 1X pH=7,2 a 60 °C ed è stato fatto reagire con Fab' 10 equivalenti di Mal-PEG_{5k}DSPE₂ rispetto a Fab' a 25°C, pH=7, 300rpm in thermomixer per 18ore.

Questa reazione è un'addizione di Michael che avviene tra il tiolo del Fab' e la maleimmide del PEG (Figura 28). La reazione avviene tra un range di pH tra 6,5 e 7,5 in modo da evitare l'addizione nucleofila delle ammine deprotonate del Fab' alla maleimmide. Le lunghe catene di DSPE in soluzione acquosa andranno a stabilizzarsi costituendo delle micelle con il frammento del Trastuzumab disposto per lo più all'esterno delle micelle stesse.

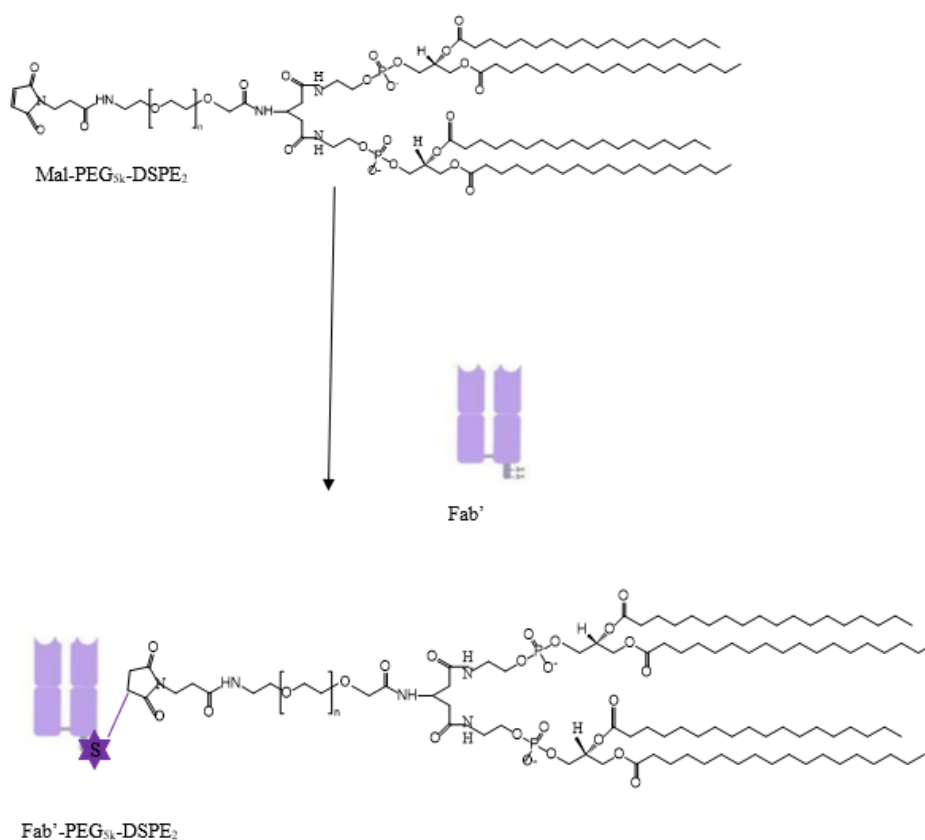


Figura 28: addizione del Fab' a Mal-PEG_{5k}-DSPE₂ tramite reazione di Michael

4. PREPARAZIONE DI LIPOSOMI CON LA TECNICA THIN LAYER EVAPORATION

4.1 PREPARAZIONE DI LIPOSOMI STEALTH (SL)

Per ottenere i liposomi si è utilizzato il metodo tradizionale di Bangham¹. Si sono utilizzati, come lipidi, HSPC (MW=785,1 uma), colesterolo (386,65 uma) e mPEG-DSPE (6116 uma) in rapporto molare:

16:8:1

HSPC: CHOL: mPEG-DSPE

Si sono sciolti i lipidi in una miscela costituita da 3 parti di CHCl_3 e una parte di metanolo per un volume totale di 2 ml. La miscela di solventi è stata evaporata in Rotavapor a 40 °C; quindi il film lipidico è stato lasciato essiccare per 18 ore.

Il film è stato successivamente idratato con 1,2 ml di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mM, pH=5, a 60 °C per un'ora. La sospensione di liposomi che si è formata viene estrusa a 60 °C per renderla omogenea con membrane di policarbonato di dimensioni progressivamente decrescenti da 400 nm, 200 nm, 100 nm e 50 nm.

Il tampone di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250mM, pH=5 è stato scambiato con PBS 1X pH=7,4 utilizzando una colonna di desalting (o gel filtration) PD 10 Sephadex G25.

Per verificarne le dimensioni è stata eseguita una misura di DLS e per valutare la concentrazione di lipidi è stato eseguito un saggio di Stewart.

4.2 PREPARAZIONE DI LIPOSOMI SUPER STEALTH (SSL₂)

Per preparare i liposomi *Super Stealth* sono stati utilizzati i seguenti lipidi: HSPC (MW=785,1 uma), colesterolo (386,65 uma) e mPEG-DSPE₂ (7059 uma) in rapporto molare di 16:8:1 (HSPC: CHOL:mPEG-DSPE₂). I liposomi sono stati ottenuti con il metodo di Bangham¹ riportato al paragrafo 4.1.

I lipidi sono stati solubilizzati in 2ml di una miscela di CHCl_3 /metanolo 3:1 che è stata poi evaporata in Rotavapor a 40 °C; dopo 18h in essiccatore, il film è stato idratato con 1,2 ml di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250mM, pH=5, a 60°C per un'ora. Per rendere omogenea la sospensione, è stata estrusa come precedentemente descritto. Prima dell'estrusione la sospensione viene diluita 1:3 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250mM per facilitare il processo di estrusione.

Il tampone di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250mM, pH=5 è stato scambiato con PBS 1X pH=7,4 utilizzando una colonna di desalting (o gel filtration) PD 10 Sephadex G25.

I liposomi sono stati caratterizzati come descritto al paragrafo 4.1.

5.INCORPORAZIONE DI DOXORUBICINA

Il farmaco doxorubicina è stato introdotto con la tecnica del *Remote loading*⁵⁹ sfruttando il gradiente transmembrana dell'ammonio.

I liposomi hanno all'interno una fase acquosa a pH=5 dovuta al solfato di ammonio e all'esterno un pH=7,4 dovuto al tampone fosfato.

Questa differenza di pH fa sì che la doxorubicina all'esterno dei liposomi sia per lo più neutra e riesca ad attraversare il *bilayer* lipidico dei liposomi, ma all'interno, nel comparto acquoso a pH=5, il suo equilibrio acido-base sarà spostato verso la forma protonata e quindi la sua fuoriuscita dal liposoma è molto sfavorita. Inoltre per l'elevata concentrazione all'interno del liposoma la doxorubicina tenderà a precipitare o a formare con gli anioni solfato una struttura assimilabile ad un gel ostacolando ancora di più la sua fuoriuscita.⁵⁹

La figura 29 riporta uno schema degli equilibri chimici principali che si hanno attraverso il doppio strato lipidico del liposoma.

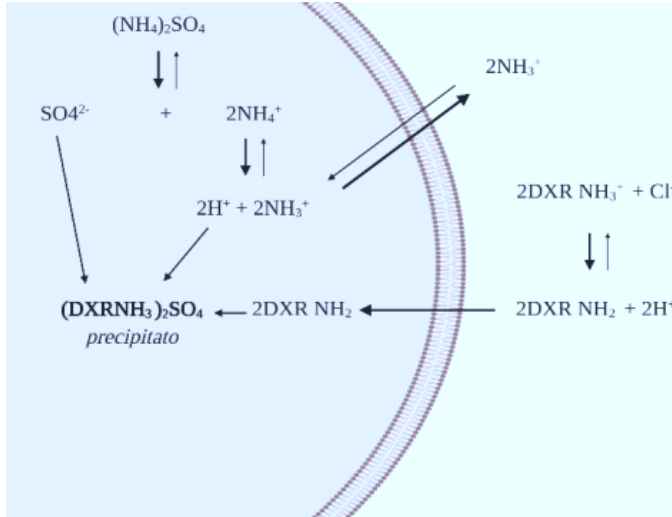


Fig. 29: *Remote loading* di DXR ed equilibri chimici che si instaurano all'interfaccia dei liposomi⁶⁰

In tutte le fasi in cui si utilizza la doxorubicina, essa sarà sempre protetta dalla luce del sole perché è fotosensibile⁶⁰.

La doxorubicina viene solubilizzata in soluzione fisiologica a 45°C e 400 rpm utilizzando il thermomixer per il tempo necessario alla sua completa dissoluzione.

Quindi viene aggiunta alla sospensione di liposomi in rapporto massa su massa:

$$\text{DXR: HSPC}=1:2$$

Si lascia incubare per 75 minuti a 60°C (temperatura di melting di HSPC) a 350 rpm. Si attende che la temperatura della sospensione scenda fino a raggiungere temperatura ambiente, si purifica in colonna PD-10, Sephadex G25 per separare i liposomi dalla doxorubicina libera.

Si esegue nuovamente una misura al DLS ed il test di Stewart per valutare le dimensioni dei liposomi e la loro concentrazione rispettivamente. Si misura anche l'efficienza di incapsulazione per stimare quanta doxorubicina è presente all'interno dei liposomi.

5.1 EFFICIENZA DI INCAPSULAZIONE DI DOXORUBICINA (EE)

L'efficienza di incapsulazione, *Entrapment Efficiency*, è una misura spettrofotometrica di assorbimento della luce UV a 477nm, essendo la

doxorubicina un cromoforo. Si diluisce il campione in metanolo in modo che la concentrazione finale di HSPC sia 1mM; quindi, si aggiungono 4 μ l di Triton X100 1M e si lascia incubare in Thermomixer a 60°C per 15 minuti a 400 rpm. Dopo aver riportato la sospensione a temperatura ambiente si legge l'assorbanza. L'utilizzo del Triton X100 e la temperatura di incubazione servono per rompere l'integrità del doppio strato fosfolipidico e permettere alla doxorubicina incapsulata di fuoriuscire.

Si esegue la misura in triplicato e si effettua il bianco in cui al posto del campione di liposomi si mette un uguale volume di PBS 1X pH=7,4.

Si ottiene perciò, da una misura di assorbanza, la concentrazione di doxorubicina, noto il coefficiente di estinzione molare della doxorubicina a 477 nm in metanolo ($\epsilon_{477}=13050 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La formula per calcolare l'efficienza di incapsulazione percentuale è:

$$\text{Efficienza di incapsulazione \% (EE \%)} = \frac{\text{DXR incapsulata (mg)}}{\text{DXR iniziale introdotta (mg)}} \cdot 100$$

6. PREPARAZIONE DI IMMUNOLIPOSOMI TRAMITE *POST INSERTION*

Per incorporare le micelle di Fab'-PEG-DSPE₂ ai liposomi contenenti doxorubicina si è utilizzata la tecnica della *post insertion*²⁰ (Figura 30).

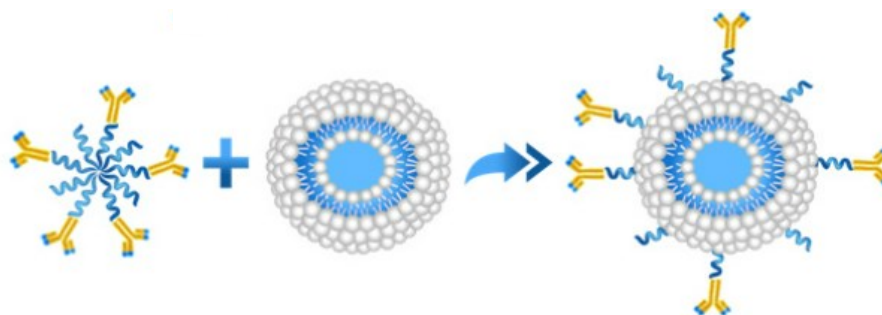


Fig.30: schema della *post insertion* delle micelle di Fab'-PEG-DSPE₂ ai liposomi con incapsulato il farmaco²⁰.

6.1 *POST INSERTION* DI LIPOSOMI *STEALTH*

Non volendo avere più del 6% molare di PEG nel sistema finale ed essendo già presente un 4% mol di PEG nei liposomi,⁹ il rimanente 2% di PEG è stato introdotto come Fab'-PEG-DSPE e mPEG-DSPE in rapporto molare 1:3.

Si fanno reagire 2 eq di acido tioglicolico (92,12uma) con 1 eq di Fab'-PEG-DSPE per 15 minuti, a 25°C e 300 rpm in modo che l'acido tioglicolico possa inattivare ulteriori possibili reazioni di nucleofili con l'alchene della maleimmide non reagita.

Quindi si aggiungono i liposomi *Stealth* (vedi paragrafo 4.1) e mPEG-DSPE. La reazione di *post insertion* viene fatta decorrere 60 minuti a 60°C a 300rpm.

In questo modo si sono ottenuti i liposomi SIL: *stealth immuno-liposomes*.

I liposomi vengono purificati in Sepharose CL-4B con eluente PBS pH=7,4 1X ad un flusso di circa 2 ml/min, per separare gli immunoliposomi dalle micelle di mPEG-DSPE e Fab'-PEG-DSPE.

Si determinano le dimensioni al DLS, si esegue il saggio di Stewart per determinare la concentrazione di HSPC e si calcola la concentrazione di doxorubicina con il metodo descritto al paragrafo 5.1.

6.2 *POST INSERTION* DI LIPOSOMI *SUPER STEALTH*.

La procedura è simile a quella descritta nel paragrafo 6.1 ad eccezione dei rapporti molari per la formazione delle micelle. In questo caso il 2% di PEG è stato introdotto come Fab'-PEG-DSPE₂ e mPEG-DSPE₂ in rapporto molare 1:1.

In questo modo si sono ottenuti i liposomiSSIL₂: *super stealth immuno liposomes*. Il numero 2 indica la tipologia della ramificazione che in questo caso è a due moli di DSPE per mole di PEG.

7. MARCATURA CON VYBRANT® DiD DEI LIPOSOMI PER I TEST *IN VIVO*

Per eseguire i test *in vivo* è preferibile che i liposomi siano marcati con una sostanza fluorescente che sia stabile all'interno dei liposomi stessi e si è scelto a tale scopo la sostanza fluorescente Vybrant® DiD della Thermo Fisher (1052,07 uma) (Figura 31) che presenta un massimo di emissione di fluorescenza nel rosso (Figura 32) poiché le cellule SKOV-3 usate in questo

saggio sono state trasfettate con GFP, proteina fluorescente, che ha un massimo di emissione di fluorescenza alla lunghezza d'onda del verde.

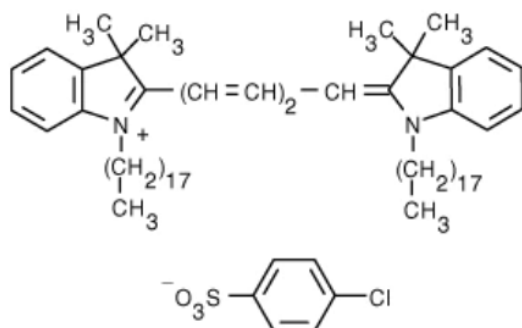


Figura 31: formula chimica del Vybrant® DiD

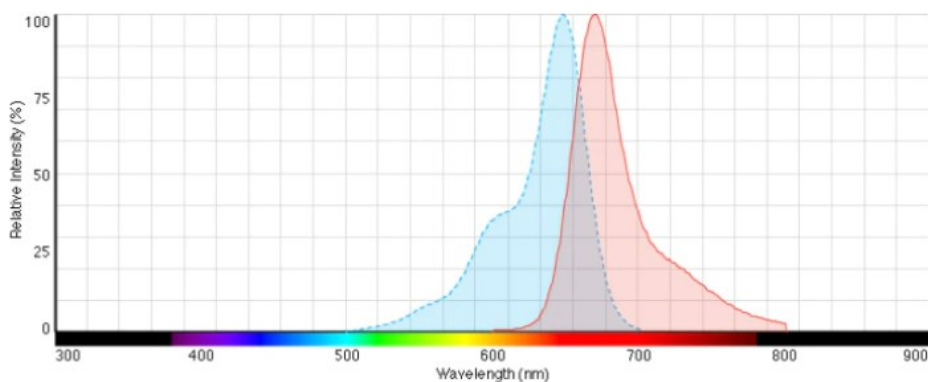


Figura 32: Spettro di assorbimento (in blu) ed emissione (in rosso) del Vybrant® DiD

Per incorporare il DiD è stato utilizzato il seguente rapporto molare:

$$\text{HSPC: DiD}=1:0,005$$

DiD è stato introdotto nelle sospensioni liposomiali e fatto reagire per 75 minuti a 37°C e 300 rpm. Dopo aver portato la sospensione a temperatura ambiente, è stata purificata dal DiD non incorporato con una colonna SEC in PD-10 con eluente PBS 1X pH=7,4. Per valutare quanto DiD è stato incorporato si è eseguita una misura di assorbimento a 647 nm, con il coefficiente di estinzione molare pari a $245000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

8. STUDI *IN VIVO*: ALLESTIMENTO DEL MODELLO MURINO XENOGRAFT DI TUMORE OVARICO.

Tutte le procedure condotte sugli animali sono state approvate dal comitato etico dell'Università di Padova (Organismo Preposto al Benessere degli Animali, OPBA) e dal Ministero della Salute Italiano. Le cellule tumorali SK-OV-3 sono state inoculate nel fianco destro dei topi del ceppo SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) per sviluppare un modello di tumore ovarico localizzato e facilmente monitorabile.

Le SKOV-3 sono cellule di adenocarcinoma ovarico *Her2-positive*, isolate da un soggetto femmina di 64 anni. Le cellule sono state mantenute in coltura in terreno *McCoy's Modified Medium*, arricchito del 10% di FBS, dell'1% di L-glutammina e dell'1% di *PenStrep*, a una temperatura di 37°C e un'atmosfera umidificata con 5% di CO₂. Ogni animale è stato inoculato con 10x10⁶ di cellule SKOV-3 risospese in PBS-matrigel.

A partire dal giorno dell'inoculo, l'animale è stato controllato ogni due giorni e le dimensioni del tumore sono state misurate con un calibro digitale. Al raggiungimento di un volume di circa a 85 mm³ è stato iniziato il trattamento per via endovenosa con le formulazioni alla dose di 10 mg/kg in doxorubicina. Sono state effettuate 4 somministrazioni, una ogni 5 giorni.

9. PREPARAZIONE DI LIPOSOMI CATIONICI CON LA TECNICA *THIN LAYER EVAPORATION*.

Per preparare i liposomi cationici si è utilizzata la tecnica di Bangham ¹. Colesterolo (386,65 uma), HSPC (785,1 uma) e mPEG_{5k}-DSPE (6116 uma) sono stati solubilizzati in CHCl₃; quindi, sono stati riuniti in un pallone da 50 ml e si è aggiunto metanolo in modo che nel volume finale i due solventi organici fossero in rapporto volumetrico tra di loro di 1:3 (metanolo: cloroformio). Il solvente è stato fatto evaporare in Rotavapor a 40°C. Il film lipidico così ottenuto è stato lasciato ad essiccare tutta la notte.

9.1 INCORPORAZIONE DEL PLASMIDE

Il plasmide pCito shNfix contenente shRNA è stato introdotto nei liposomi cationici idratando il film lipidico con una soluzione acquosa del plasmide stesso in cui era presente la lipofectamina®.

20 µl di lipofectamina® (1 mg/ml) sono stati diluiti con 500 µl di acqua autoclavata. Si è mescolato gentilmente per 5 minuti a temperatura ambiente in thermomixer a 300 rpm. Si sono aggiunti 20 µl di plasmide pCito shNfix

(0,1 mg/ml) e si è mescolato gentilmente per 20 minuti a temperatura ambiente in thermomixer a 300 rpm.

Questa soluzione acquosa è stata utilizzata per idratare il film lipidico per 2 ore a 37°C.

La sospensione ottenuta è stata caratterizzata con DLS, per determinare dimensioni e ξ -potential, sono state raccolte le foto al TEM ed è stata eseguita una elettroforesi su gel di agarosio.

9.2 TEST *IN VITRO*

La trasfezione delle cellule eucariotiche è stata condotta utilizzando il reagente lipofectamina®, costituita da una miscela di lipidi capaci di interagire con il DNA plasmidico in ambiente acquoso. Le cellule C2C12 (linea cellulare di mioblasti murini) sono state seminate in un *plate* da 6 pozzetti (5000/cm²). La reazione di trasfezione si basa su due miscele: la prima contiene la lipofectamina® e la seconda contiene il DNA plasmidico e il reagente Plus® che aumenta l'efficienza di trasfezione. La prima miscela è preparata a partire da 6,25 μ l di lipofectamina® e Opti-MEM (*Minimal Essential Medium*, Gibco) fino ad un volume finale di 250 μ l. La miscela 2 è preparata con 2,5 μ g di DNA, 2,5 μ l Reagent Plus® e Opti-MEM (*Minimal Essential medium*, Gibco) fino ad un volume finale di 250 μ l. Una volta preparati, le due miscele vengono unite e lasciate a temperatura ambiente per 30 minuti per consentire l'interazione tra la lipofectamina® e il DNA. Successivamente, la miscela risultante e 1,5 ml di Opti-MEM vengono aggiunti alle cellule in piastra, lasciandole incubare per circa 16 ore a 37°C e il 5% di CO₂ in atmosfera. In modo simile alcune C2C12 piastrate sono state incubate con i liposomi *Stealth* con lipofectamina® utilizzando circa 2,5 μ g di DNA plasmidico incapsulato, sulla base della concentrazione relativa. Finita l'incubazione il terreno delle cellule verrà sostituito con del terreno completo e fresco composto da DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Euroclone), 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco), 1% penicillina/streptomina (Euroclone ECB 3001D) e l'1% L-glutamina (Euroclone ECB 30000D). A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza (DMI6000B; Leica) con una fotocamera digitale (DFC365FX; Leica) per valutare l'espressione della proteina fluorescente tdTomato. Il conteggio delle cellule è stato eseguito con il software ImageJ.

10.SAGGI

10.1 SAGGIO DI STEWART

Il saggio di Stewart⁶¹ permette la quantificazione dei fosfolipidi presenti in un solvente organico tramite la formazione di un complesso colorato con l'ammonio ferro tiocianato (detto reattivo di Stewart) $\text{NH}_4\text{FeSCN}_3$, che assorbe a 485nm. Tale saggio è molto sensibile e permette la quantificazione di fosfolipidi in un range tra 15 nmol e 150 nmol.

Si è scelto tale saggio e non altri, come ad esempio quello di Barlett, perché il saggio di Stewart non è sensibile alla presenza di fosfato inorganico e quindi lo si può eseguire in tampone fosfato oltre ad essere vantaggioso perché è un rapido saggio colorimetrico.⁶¹

Per eseguire tale saggio è necessario preparare la soluzione acquosa contenente il reattivo di Stewart: si pesano 27,03 g di $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (270,33 uma) e 30,4 g di NH_4SCN (76,12 uma) e si solubilizzano con 1l di acqua milli-Q. La soluzione così ottenuta è stabile per mesi a temperatura ambiente.

È necessario fare una retta di calibrazione per poter correlare l'assorbanza con il contenuto di fosfolipidi.

Tale retta di taratura si esegue preparando le soluzioni riportate in Tabella 2:

Tabella 2: retta di taratura per il saggio di Stewart.

	HSPC 0,2 mg/ml	CHCl_3 (ml)	$\text{NH}_4\text{FeSCN}_3$ (ml)
BIANCO	-----	2	2
1	100 μl	1,9	2
2	200 μl	1,8	2
3	300 μl	1,7	2
4	400 μl	1,6	2
5	500 μl	1,5	2
6	600 μl	1,4	2

Si mescolano energicamente su vortex le due fasi in modo da permettere l'intimo contatto del ferro tiocianato di ammonio con i fosfolipidi per la formazione del complesso colorato; quindi, si centrifuga a 1000 rpm, 4°C per 10 minuti per permettere alla fase organica di separarsi rapidamente dalla fase acquosa soprastante.

Si preleva la fase organica e si misura l'assorbanza a 485 nm. Con una regressione lineare si ottiene la retta di taratura che permette di correlare l'assorbanza alla concentrazione secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

Per allestire i campioni di liposomi si segue la medesima procedura (Tabella 3):

Tabella 3: allestimento campioni per saggio di Stewart

	campione	CHCl ₃ (ml)	NH ₄ FeSCN ₃ (ml)
1	n µl	2	2
2	n µl	2	2
3	n µl	2	2

Si Per una previsione qualitativa, si aggiunge una certa aliquota, ad esempio 10 µl della sospensione liposomiale, si agita su vortex e si fa una prima valutazione rapida cercando di capire se il colore ricade all'interno dei punti della retta di taratura, altrimenti si aggiunge altro volume di soluzione liposomiale o si prepara un nuovo campione con meno soluzione liposomiale.

Si preparano dunque i tre campioni, si agitano su vortex, si centrifugano a 1000 rpm, 4°C per 10 minuti e si misura la assorbanza. Utilizzando la retta di taratura si fa la regressione lineare e si determina la concentrazione del campione, nota la sua assorbanza.

10.1.1. SAGGIO DI STERWART IN CAMPIONI CONTENENTI DOXORUBICINA

Nel caso di sospensioni liposomiali in cui sia contenuta doxorubicina è necessario modificare leggermente tale saggio perché la doxorubicina assorbe anche a 485 nm e dà interferenza.

Si esegue perciò il bianco per la doxorubicina secondo la tabella 4:

Tabella 4: allestimento bianco per campioni con doxorubicina

	Campione	H ₂ O milli-Q (ml)	CHCl ₃ (ml)
1	n µl	2	2
2	n µl	2	2
3	n µl	2	2

Si procede preparando i campioni della retta di taratura e si allestiscono i tre campioni della sospensione liposomiale (paragrafo 10.1). Si preparano 3 campioni di bianco per la doxorubicina inserendo lo stesso volume di sospensione liposomiale introdotto per i campioni a concentrazione incognita. Si misura l'assorbanza dei campioni, si calcola il valore medio e si sottrae il valore medio dell'assorbanza dei bianchi di doxorubicina.

10.2 SAGGIO DI SMITH O SAGGIO DELL'ACIDO BICINCONINICO (BCA ASSAY)

Tale saggio, descritto per la prima volta da Smith⁶², permette la determinazione della concentrazione di un peptide, con almeno tre amminoacidi, o di una proteina attraverso una colorazione colorimetrica che prevede la formazione di un complesso color viola con lo ione rameoso che assorbe a 562nm. In questa tesi si utilizzerà una metodologia simile che prevede l'utilizzo dell'acido bicinconinico (BCA) direttamente nell'ambiente di reazione e questo lo si fa per aumentare di 100 volte la sensibilità di tale saggio e descritta da Walker et al., 1996.

In tal modo si possono determinare concentrazioni di proteine tra 0,05 mg/ml e 2 mg/ml.

Nel primo step di reazione avviene la riduzione del rame da ione rameico a ione rameoso da parte dei legami peptidici della proteina (Figura 33):

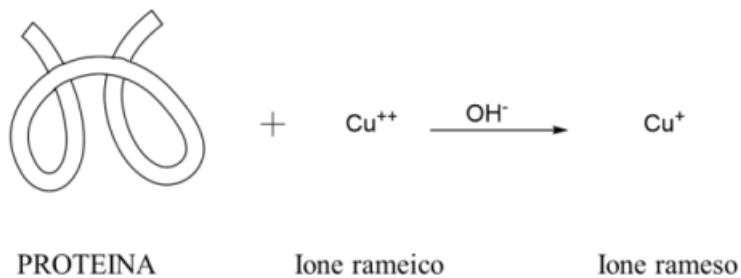


Figura 33: riduzione del Cu²⁺ a Cu⁺ ad opera dei legami peptidici in ambiente basico.

Nel secondo step di reazione lo ione rameoso interagisce con l'acido bicinconinico (344,33 uma) per formare un complesso colorato sul viola che assorbe a 562 nm (Figura 34).

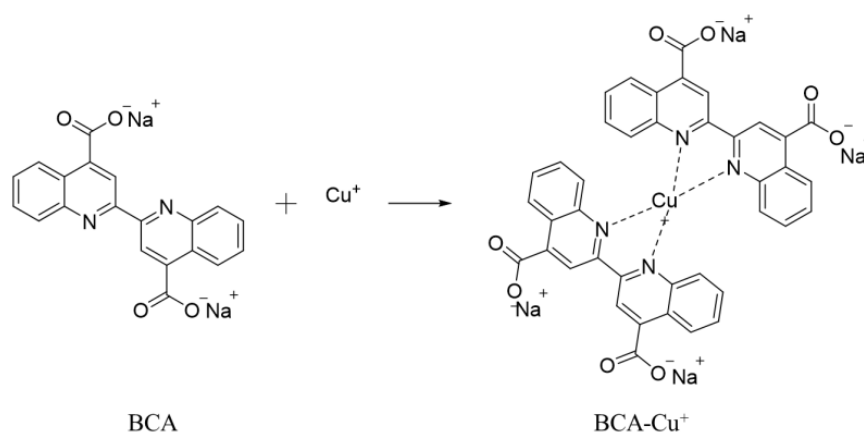


Figura 34: chelazione dello ione Cu⁺ da parte dell'BCA

Tale reazione avviene tra due moli di BCA ed una di Cu⁺ formando un complesso solubile in acqua e la cui intensità di colore è direttamente proporzionale alla quantità di Cu⁺ e quindi di proteina presente.

Anche se triptofano, cisteina e tirosina possono ridurre lo ione rameico, è soprattutto il legame peptidico il riducente più importante e per questo tale determinazione è possibile.

È necessario eseguire una retta di taratura che si fa con soluzioni a concentrazione nota di Trastuzumab da 0,1 a 0,6 mg/ml in acqua milli-Q (Tabella 5).

Si prepara il reattivo costituito dal reagente A e dal reagente B in rapporto 50:1, ove il reagente A è una soluzione di BCA in Na₂CO₃, NaHCO₃ e tartrato di sodio in 0,1 M di NaOH, mentre il reagente B è CuSO₄ 4%.

Tabella 5: definizioni di campioni per la retta di taratura del saggio di Smith con BCA.

	H ₂ O milli-Q	Trastuzumab	Reattivo
BIANCO	40 µl	-----	450 µl
Campione 1	20 µl	20 µl di TRS 0,1 mg/ml	450 µl
Campione 2	20 µl	20 µl di TRS 0,2 mg/ml	450 µl
Campione 3	20 µl	20 µl di TRS 0,3 mg/ml	450 µl
Campione 4	20 µl	20 µl di TRS 0,4 mg/ml	450 µl
Campione 5	20 µl	20 µl di TRS 0,5 mg/ml	450 µl
Campione 6	20 µl	20 µl di TRS 0,6 mg/ml	450 µl

Si fa decorrere la reazione a 37°C per 30 minuti e 300rpm e si determina l'assorbanza. Per determinare la concentrazione di proteina si fa l'analisi in

triplicato del campione e per regressione lineare si determina la concentrazione nota l'assorbanza. I campioni a concentrazione incognita di proteina vengono preparati secondo la tabella 6.

Tabella 6: allestimento campioni per determinazione di Trastuzumab nelle sospensioni liposomiali.

	H ₂ O milli-Q	Campione con TRS	Reattivo
Campione 1	20 µl	20 µl	450 µl
Campione 2	20 µl	20 µl	450 µl
Campione 3	20 µl	20 µl	450 µl

11.TECNICHE STRUMENTALI

11.1 DYNAMIC LIGHT SCATTERING

Per determinare la dimensione di nanoparticelle in sospensione, la tecnica utilizzata è stata il *Dynamic Light Scattering* (DLS) o *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS).

Con tale tecnica viene misurata l'intensità della luce diffusa nel tempo dalle particelle in sospensione in movimento per i moti Browniani e tale grandezza viene correlata al diametro idrodinamico (d_H) di una particella sferica con lo stesso coefficiente di diffusione (D). Si colpisce la sospensione con un raggio laser monocromatico e la luce viene diffusa in ogni direzione, se la particella ha un diametro inferiore di un decimo alla λ della luce incidente, la luce diffusa avrà la stessa intensità in ogni direzione e sarà proporzionale al diametro elevato alla sesta potenza (teoria di Rayleigh).

La teoria di Mie invece descrive la diffusione della luce dovuta ad una particella con dimensioni pari o superiori alla λ incidente correlando l'intensità della luce diffusa e l'angolo di diffusione con il volume della particella incisa dal laser.

La legge di Stokes-Einstein

$$d_H = K_B T / 6\pi\eta D$$

Ove:

d_H =diametro idrodinamico

k_B = costante di Boltzman

D =coefficiente traslazionale di diffusione

T =temperatura assoluta

η =viscosità del mezzo

permette di correlare il coefficiente di traslazione col diametro idrodinamico di particelle sufficientemente piccole che si muovono in un mezzo per moti browniani. Di conseguenza, la misura che si ottiene con il DLS sarà il diametro idrodinamico di una particella sferica con lo stesso coefficiente di diffusione della nanoparticella colpita dal laser. Tale misura però dipende anche dalla forza ionica del solvente e dalle caratteristiche della particella stessa, per cui nel caso di nanoparticelle che hanno sulla superficie molecole di PEG o sospensioni a bassa forza ionica si avrà una sovrastima del diametro idrodinamico. Lo strumento Zetasizer Malvern permette di ricavare informazioni relative allo *Z-Average* e al *Polydispersity Index* (PDI) delle nanoparticelle attraverso una serie di analisi cumulative o di distribuzione. Lo *Z-Average Diameter* è il diametro idrodinamico derivante da analisi cumulative mentre il PDI è l'indice di polidispersività del campione e cioè indica quanto le particelle abbiano una dimensione differente tra di loro.

Il campione viene preparato con diluizione nel tampone di conservazione e le misure vengono effettuate a 25°C dopo un periodo di equilibratura di 30 secondi.

Con lo stesso strumento è possibile determinare anche lo ξ -potential cioè il potenziale elettrostatico della particella in sospensione.

È una misura molto importante perché molte caratteristiche della sospensione dipendono da questo valore, come l'aggregazione delle particelle.

Una particella ha una caratteristica carica superficiale, ma se è in soluzione si forma uno strato di solvatazione attorno alla particella, composto da un primo strato, detto di Stern, in cui sono presenti soprattutto ioni di segno opposto alla particella e tra cui c'è una forte interazione elettrostatica, ed un secondo strato in cui le interazioni sono più deboli e rappresenta il confine con le molecole del solvente che non interagiscono con la particella carica (Figura 11).

Lo ξ -potential misura il potenziale elettrostatico a livello di questo secondo strato di solvatazione.

Una particella carica in un campo elettrico è soggetta a due forze opposte: la forza di attrito e la forza elettrostatica. Quando queste due forze si

equivalgono, la particella avrà un moto rettilineo uniforme e la velocità sarà data da:

$$v = \mu \cdot E$$

E: intensità del campo elettrico

μ : mobilità elettroforetica

L'equazione di Henry lega, inoltre, la mobilità elettroforetica allo ζ -potential e alla viscosità del mezzo, secondo la ben nota equazione:

$$\mu = 2\varepsilon\xi f(\kappa a) \eta^{-1} 3^{-1}$$

ove:

μ : mobilità elettroforetica

ε : costante dielettrica

ξ : potenziale elettrico dello *slipping plane*

κ : lunghezza di *Debye* ossia il reciproco del diametro del doppio strato elettrico

a: raggio della nanoparticella

$f(\kappa a)$: funzione di Henry

Classicamente esistono due modelli per calcolare lo ζ -potential e sono il modello di Smoluchowski e quello di Hückel.

Nel nostro caso è più probabile che ci si avvicini al modello di Smoluchowski e cioè

$$\mu = \varepsilon \xi / \eta$$

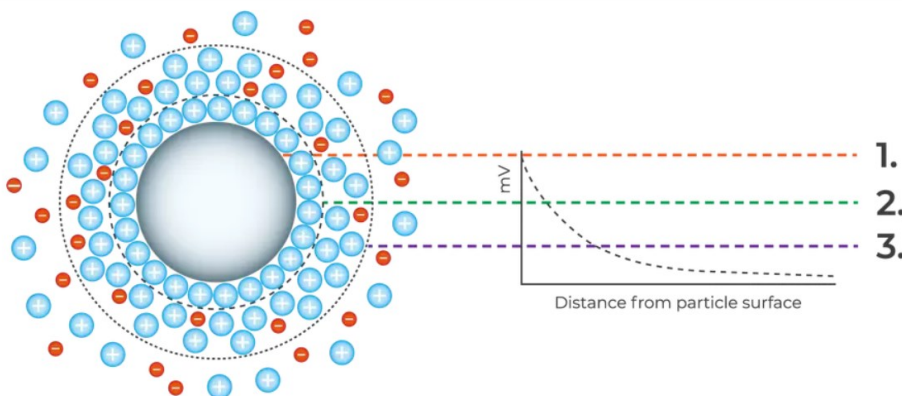


Figura 35: esempio di particella carica negativamente in soluzione. 1. Potenziale di superficie che si misura a livello della carica superficiale; 2. Potenziale di Stern che si misura a livello dello strato di Stern; 3. ζ -potential che si misura a livello dello *slipping plane*.

Per misurare lo ζ -potential la sospensione liposomiale viene introdotta in una cuvetta (DTS 10770 della Malvern, Figura 36), dotata di due elettrodi di carica opposta, tra cui si genera una differenza di potenziale.

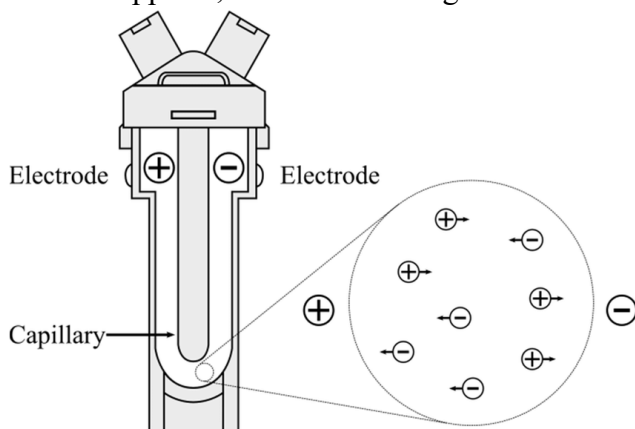


Foto 36: schema della cuvette DTS1070 della Malvern Zetasizer

Il raggio laser invece viene diviso in modo tale da ottenere un raggio che incida sul campione e un raggio di riferimento. Quando viene applicata una differenza di potenziale tra i due elettrodi si ha il movimento delle nanoparticelle che causerà delle fluttuazioni nell'intensità del raggio laser rilevata che saranno proporzionali alla velocità delle particelle stesse in soluzione ed in base a quanto appena descritto si ricaverà dalla velocità elettroforetica lo ζ -potential (Malvern Instruments, "An Introduction to Zeta Potential," vol. 2, pp. 1–6, 2015).

11.2 MICROSCOPIO A TRASMISSIONE ELETTRONICA (TEM)

Si sono volute acquisire alcune immagini al TEM dei nano sistemi ottenuti per migliorarne la caratterizzazione.

Le misure sono state eseguite presso il servizio di microscopia del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova edificio Vallisneri.

Lo strumento utilizzato è il microscopio elettronico a trasmissione Tecnal G2 (FEI) con telecamera OSIS Veleta 4Kpixel.

La tecnica utilizzata per la visualizzazione dei nostri campioni è la colorazione al negativo (*negative staining*) utilizzando il sale acetato di

uranile all'1% che viene fatto reagire sul campione posto su una griglia di carbone con supporto in rame per 10 minuti a temperatura ambiente e che poi fornirà immagini in cui lo scuro dell'acetato di uranile contrasta con il bianco del campione⁶³.

Sono necessari 10µl di campione alla concentrazione in fosfolipidi pari a 0,5 mg/ml.

11.3. ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO.

L'elettroforesi è una tecnica analitica che ci consente di separare particelle cariche in base alle relative dimensioni: particelle più piccole avranno una velocità di migrazione maggiore rispetto a particelle più grandi. Il DNA ha carica negativa, per cui le particelle si muoveranno verso il polo positivo con una mobilità elettroforetica costante. È il gel di agarosio o meglio la dimensione delle sue maglie che fungendo da setaccio riescono a separare molecole a dimensione diversa (Figura 37).

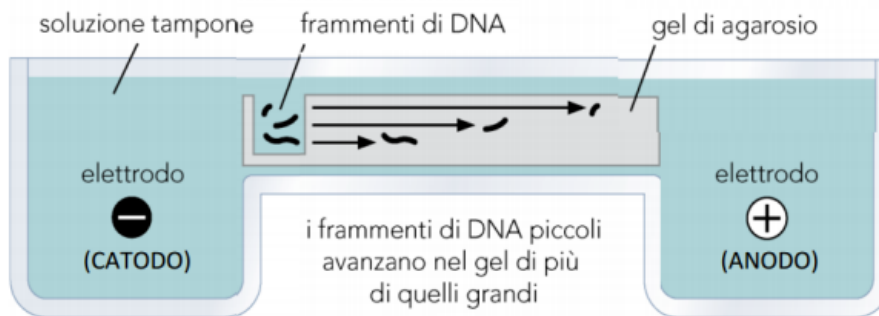


Figura 37: schema di un' elettroforesi per acidi nucleici.

Per allestire il gel di agarosio si fa una sospensione all'1% di agarosio in TAE (Tris 40mM, EDTA 1mM e acido acetico 20mM). Si scalda fino a 80°C (temperatura di solubilizzazione dell'agarosio), quindi si versa nel *casting* e si preformano i pozzetti con il pettine. Dopo che la soluzione si è raffreddata si è ottenuto il gel. Si riempiono le vaschette con la soluzione TEA e si applica ai poli una tensione di 40 mV e una corrente di 150mA per circa 60 minuti.

Terminata la corsa il gel di agarosio viene messo in una soluzione di Gel Red® allo 0,033% in volume per almeno 1h e visualizzato al transilluminatore a 312nm.

Il GelRed® è un intercalante fluorescente che reagisce con gli acidi nucleici e ne permette la loro identificazione.

11.4 SDS-PAGE

L' SDS-PAGE è un altro tipo di elettroforesi che si applica alle proteine e presenta alcune differenze rispetto all'elettroforesi descritta al paragrafo precedente. Si utilizza l' SDS (sodiododecilsolfato), molecola carica negativamente che si lega alle proteine e si lega una molecola ogni due amminoacidi. La sua interazione causa un cambio conformazionale nella proteina facendole assumere una forma elicoidale. La sua presenza è fondamentale per far sì che la separazione avvenga esclusivamente in base alle dimensioni e non alla carica, problema questo che non è presente per gli acidi nucleici che presentano carica costante per coppia di basi presente. Le proteine cariche negativamente si sposteranno verso il polo positivo. Il *casting* è generalmente verticale, perché la poliacrilamide è più stabile in quanto i legami tra le varie molecole sono di tipo covalente e non legami ad idrogeno come nel gel di agarosio. Si utilizzano due gel, definiti *running gel*, quello posto inferiormente e *stacking gel* quello posto superiormente e dove verranno caricati i campioni. Nel gel superiore, la percentuale di poliacrilamide è del circa 4%, mentre nel running gel è del 15% circa.

Tra i due gel anche il pH è differente: nel *stacking gel* il pH=6,8, nel *running gel* è pari a 8,8 Questa differenza permette di impaccare tutte le molecole che verranno schiacciate tra gli ioni cloruro e la glicina. Nel *running gel* il pH è pari a 8,8 e la glicina sarà carica negativamente (il punto isoelettrico della glicina è 6,8) e si muoverà concordemente a tutte le altre molecole presenti.

Per caricare i campioni si aggiunge alla soluzione blu di bromofenolo, come colorante di piccole dimensioni per vedere come avanza il fronte del solvente, glicerolo per aumentare la viscosità della soluzione da caricare e TRIS. Si applica la differenza di potenziale e si interrompe la corsa quando il blu di bromofenolo ha percorso tutto il gel. Si caricano anche degli standard a peso molecolare noto per poter assegnare alle diverse bande proteiche un peso molecolare.

RISULTATI

1. CARATTERIZZAZIONE DI Mal-PEG_{5k}-DSPE₂

La caratterizzazione del prodotto Mal-PEG_{5k}-DSPE₂ ottenuto (Figura 38) è stata eseguita tramite analisi ¹H-NMR e ¹H-NMR DOSY del prodotto solubilizzato in CDCl₃.

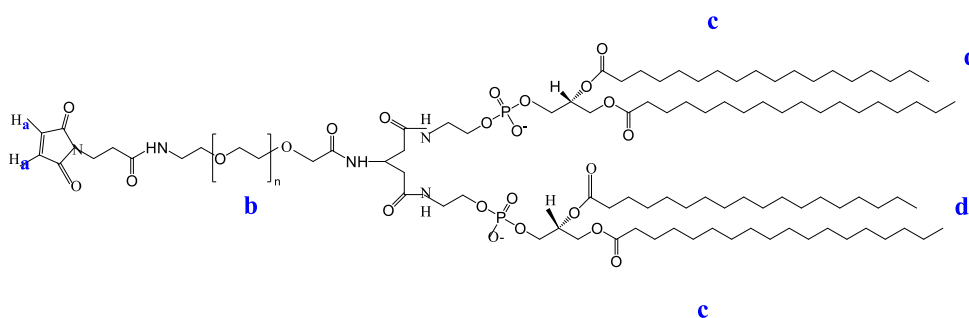


Figura 38: Mal-PEG_{5k}-DSPE₂

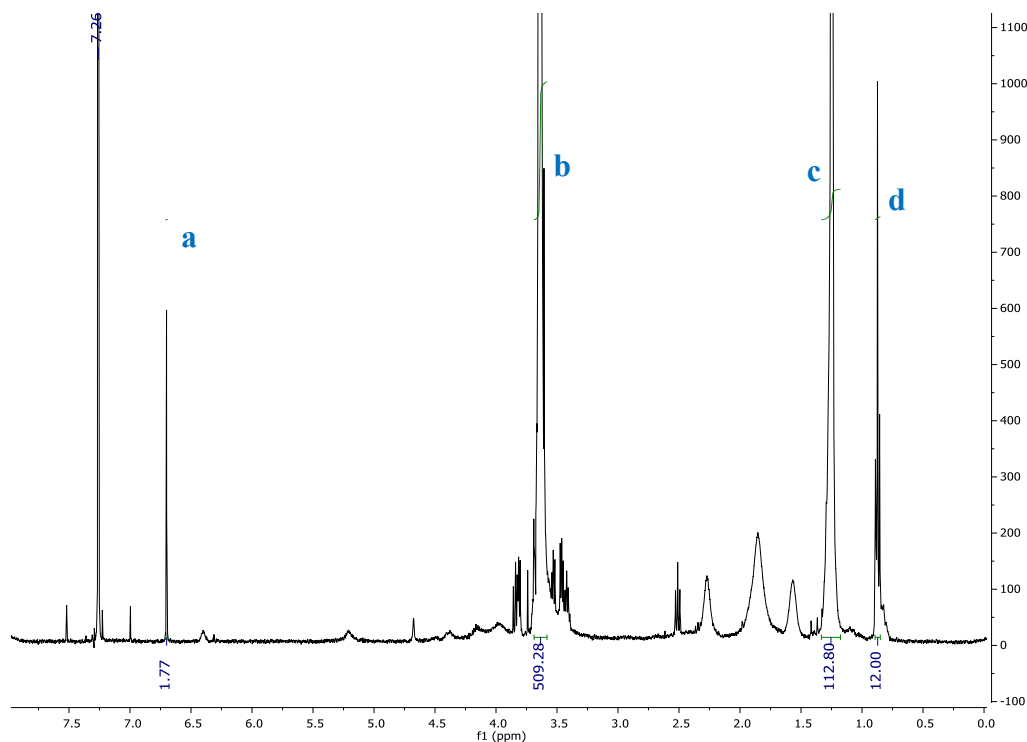


Figura 39. Spettro ¹H-NMR del prodotto solubilizzato in CDCl₃

Tabella 7: descrizione di alcuni segnali dello spettro ¹H-NMR di Mal-PEG_{5k}-DSPE₂.

RISULTATI

	Chemical shift (ppm)	Integrazione teorica degli ^1H	Integrazione effettiva degli ^1H	Molteplicità
CH_3 della DSPE	0,87	12	12	M
$(\text{CH}_2)_n$ della DSPE	1,25	112	112,80	S
$\text{CH}=\text{CH}$ della maleimmide	6,73	2	1,52	S

Il segnale a 2,51 ppm con molteplicità di tripletto dovrebbe identificare i protoni della ammido maleica che sono indicativi di quanto il gruppo non è più attivo per dare corso alla successiva addizione di Michael. La molteplicità di tali protoni aumenta rispetto al composto ciclico per la perdita della simmetria della molecola e quindi la perdita dell'equivalenza magnetica dei protoni.

I protoni metilenici del DSPE uguali magneticamente sono 14 per catena e quindi 112 H, poiché i CH_2 in alfa e in beta al carbossile sono differenti dagli altri avendo un intorno magneticamente diverso. Questi ultimi idrogeni metilenici risuonano a 1,7 ppm.

Il grado di attivazione di Mal-PEG_{5k}-DSPE₂ è pari al 76%, valore ricavato utilizzando i protoni della maleimmide come riferimento.

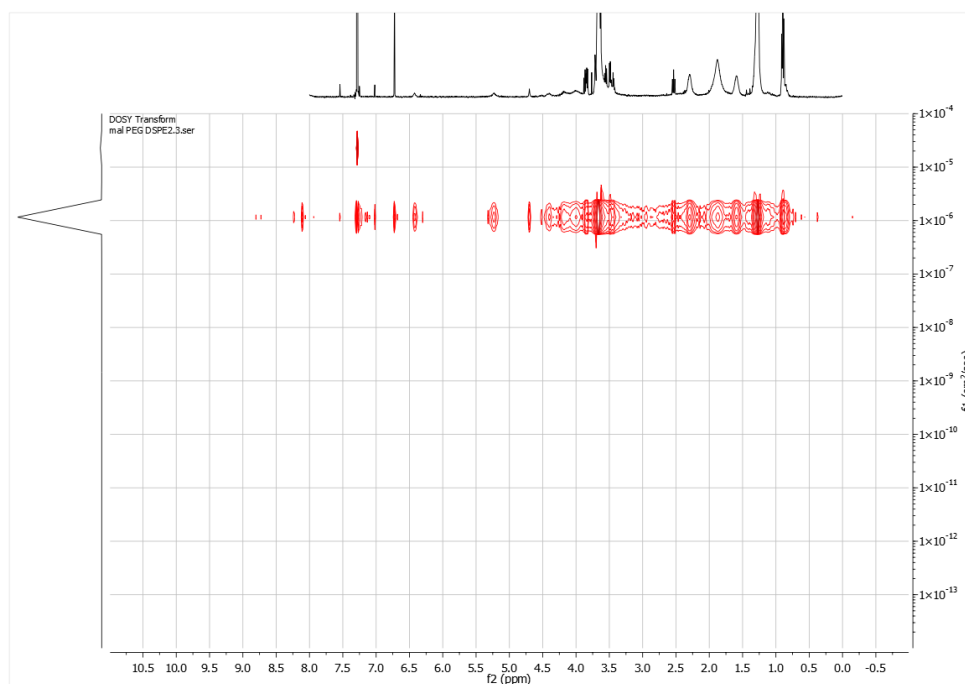


Figura 40: Spettro ^1H -NMR DOSY del prodotto solubilizzato in CDCl_3 .

Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ DOSY del prodotto solubilizzato in CDCl_3 si evince che il prodotto ottenuto è monomericò dovuto al fatto che il segnale nello spettro monodimensionale non è allargato e nell'asse f1 si ha un solo picco. Il picco isolato a 7,3ppm è il solvente.

2.CARATTERIZZAZIONE DEL FRAMMENTO F(ab')_2

Il frammento F(ab')_2 ottenuto per digestione proteolitica del Trastuzumab è stato purificato e caratterizzato utilizzando la metodologia SEC con la colonna Superose 12 10/300 GL ed eluito con PBS 1X pH=7,2 con flusso di 0.5 ml/min, in condizioni isocratiche (detector impostato a $\lambda=280$ nm) Figura 42 curva blu. In figura 41 è riportata l'immagine del SDS-PAGE del prodotto di reazione. Nella prima colonna sono stati caricati i marker, nella seconda un campione di Trastuzumab e nella terza il prodotto della digestione peptica. Dalla corsa su gel di poliacrilammide si evince che la pepsina ha digerito tutto l'anticorpo ed è presente solo il frammento F(ab')_2 .

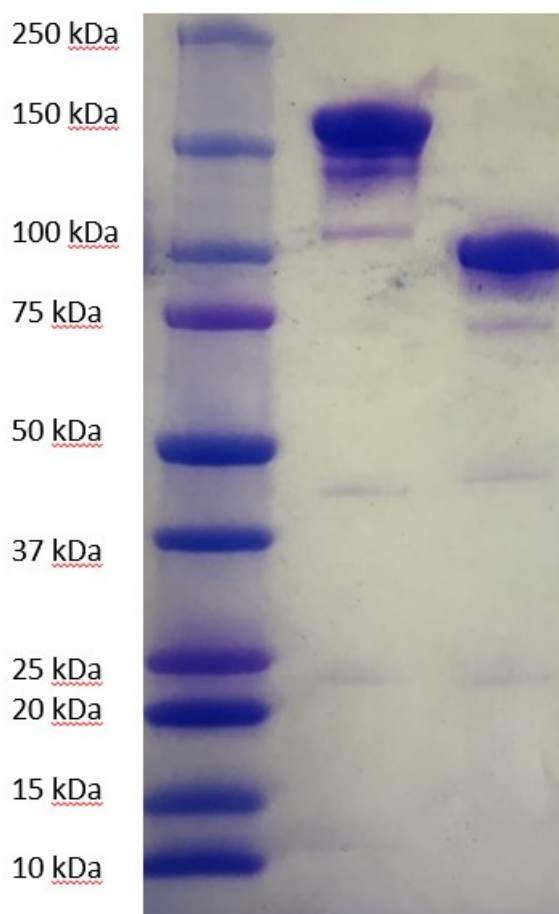


Figura 41: SDS-PAGE del digerito del trastuzumab. Nella prima lane i marker, nella seconda il trastuzumab e nella terza il digerito F(ab')₂ di 100 kDa circa.

3. CARATTERIZZAZIONE DEL FRAMMENTO Fab'

Il frammento Fab' ottenuto per riduzione del frammento F(ab')₂ con cisteammina è stato purificato in colonna Superose 12 10/300 GL ed eluito con PBS 1X pH=7,2 contenente EDTA 10 mM, con flusso di 0,5 ml/min, in condizioni isocratiche (detector impostato a $\lambda=280$ nm). In figura 42 è stato riportato il cromatogramma risultante.

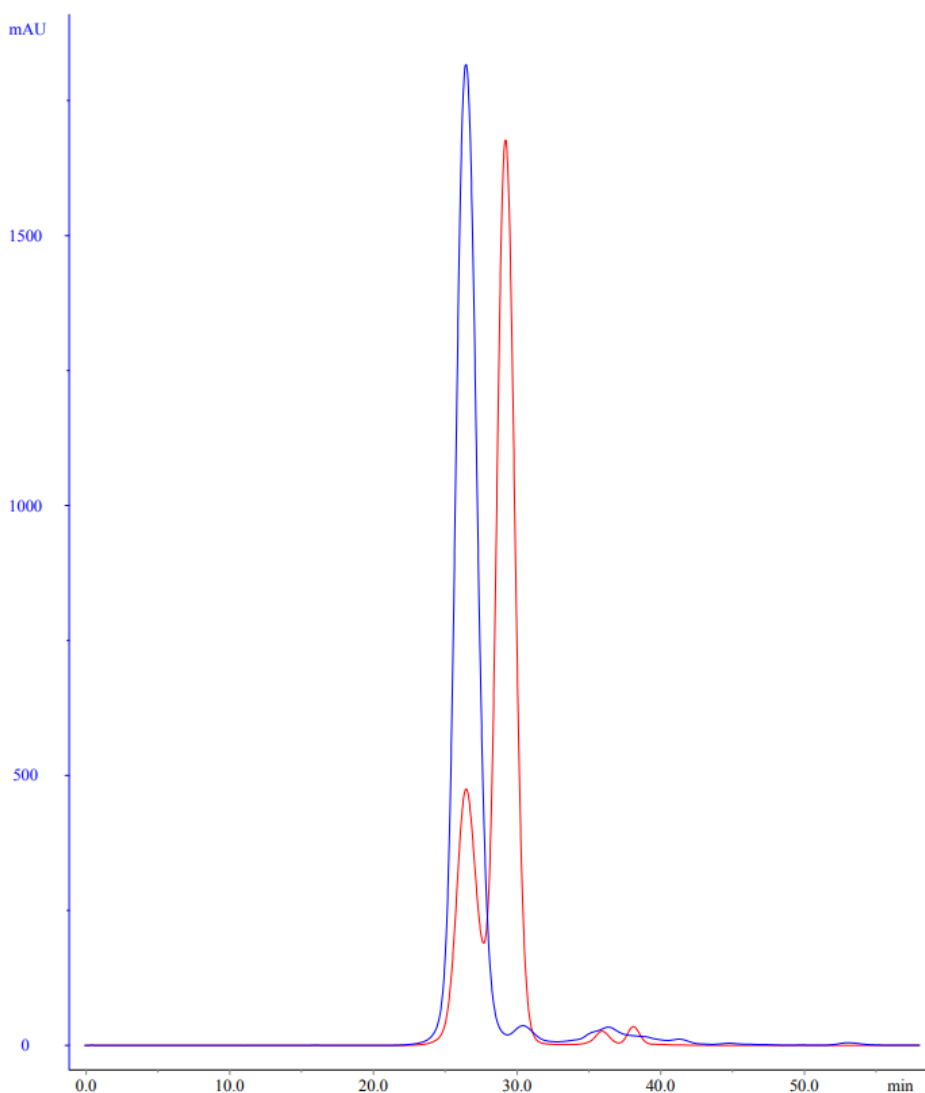


Figura 42: Il cromatogramma della purificazione del Fab' dopo riduzione del frammento F(ab')₂ con cisteammina è riportato in rosso, mentre in blu è riportato il cromatogramma della purificazione del F(ab')₂ dopo digestione proteolitica con pepsina

In figura 42 è stata riportata la sovrapposizione dei cromatogrammi di eluizione del solo frammento F(ab')₂, che eluisce a circa 26 minuti e dei suoi

RISULTATI

prodotti di reazione dopo riduzione con cisteamina, che eluiscono a circa 30 minuti e dei sottoprodotti a circa 40 minuti. La reazione con cisteamina non è stata quantitativa, né questa metodologia di separazione ci ha permesso di separare completamente i due frammenti, Fab'2 e Fab', ma si è ottenuto soprattutto il frammento Fab' voluto.

4. CARATTERIZZAZIONE DEGLI IMMUNOLIPOSOMI

4.1 STEALTH LIPOSOMES-SL

Gli *stealth liposomes* sono stati caratterizzati valutandone la dimensione tramite DLS (11.1), la quantità di doxorubicina incapsulata tramite il saggio dell'efficienza di incapsulazione (5.1) ed il contenuto di HSPC tramite il saggio di Stewart (10.1.1). I liposomi ottenuti sono risultati avere dimensioni pari a $134 \pm 1,97$ nm, PDI pari a $0,068 \pm 0,017$, ed efficienza di incapsulazione pari all'88%, come riassunto in tabella 8. In figura 43 è stato riportato il grafico della distribuzione della popolazione in base al volume della sospensione di liposomi SL. La presenza di un solo picco indica la presenza di una sospensione omogenea, senza aggregati e monodispersa.

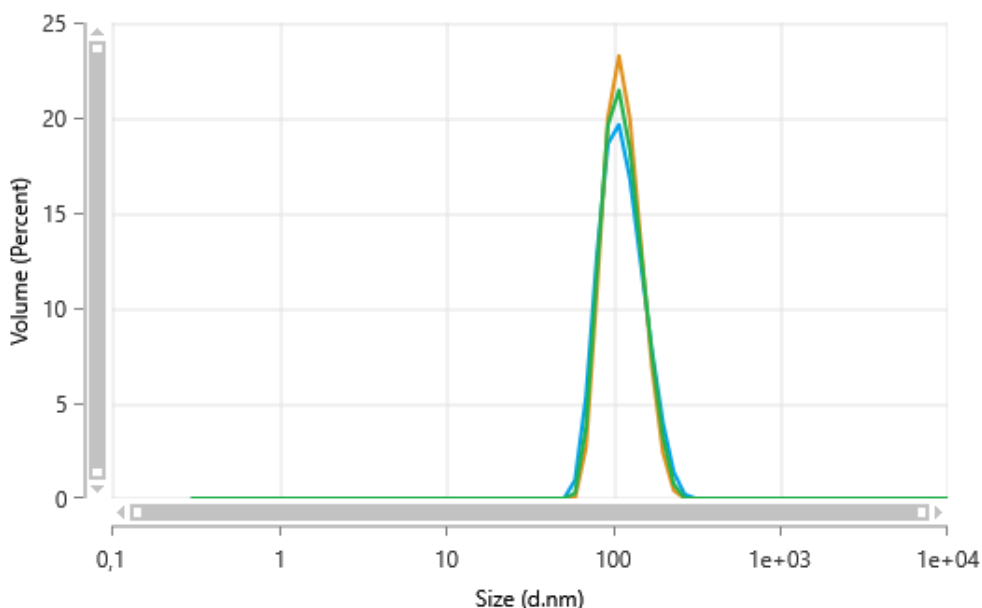


Figura 43: Grafico della distribuzione dimensionale dei liposomi SL in PBS 1X pH=7,4. Il risultante diametro idrodinamico è il risultato della media di tre misure che sono indicate nei tre colori

Tabella 8: riassunto delle caratteristiche degli SL; si riporta nelle rispettive colonne la concentrazione di HSPC, la concentrazione di doxorubicina, l'efficienza di incapsulazione e il diametro idrodinamico.

[HSPC]	[DXR] mg/ml	EE %	d _H	PDI
--------	----------------	------	----------------	-----

RISULTATI

2,74mg/ml;3,49mM	0,77mg/ml	88%	134±1,97nm	0,068± 0,017
------------------	-----------	-----	------------	--------------

4.2 STEALTH IMMUNO-LIPOSOMES-SIL

Gli *stealth immuno-liposomes* sono stati caratterizzati valutandone la dimensione tramite DLS (11.1), la quantità di doxorubicina incapsulata tramite l'efficienza di incapsulazione (5.1) ed il contenuto di HSPC tramite il saggio di Stewart (10.1.1). Gli immunoliposomi ottenuti sono risultati avere dimensioni pari a $143 \pm 1,65$ nm, PDI pari a $0,04 \pm 0,012$ ed efficienza di incapsulazione pari all'19%, come riassunto in tabella 9. In figura 44 è stato riportato il grafico della distribuzione della popolazione in base al volume della sospensione di liposomi SIL. Anche in questo caso la sospensione è monodispersa. L'inserimento del frammento Fab' ha causato un leggero aumento delle dimensioni medie dei liposomi.

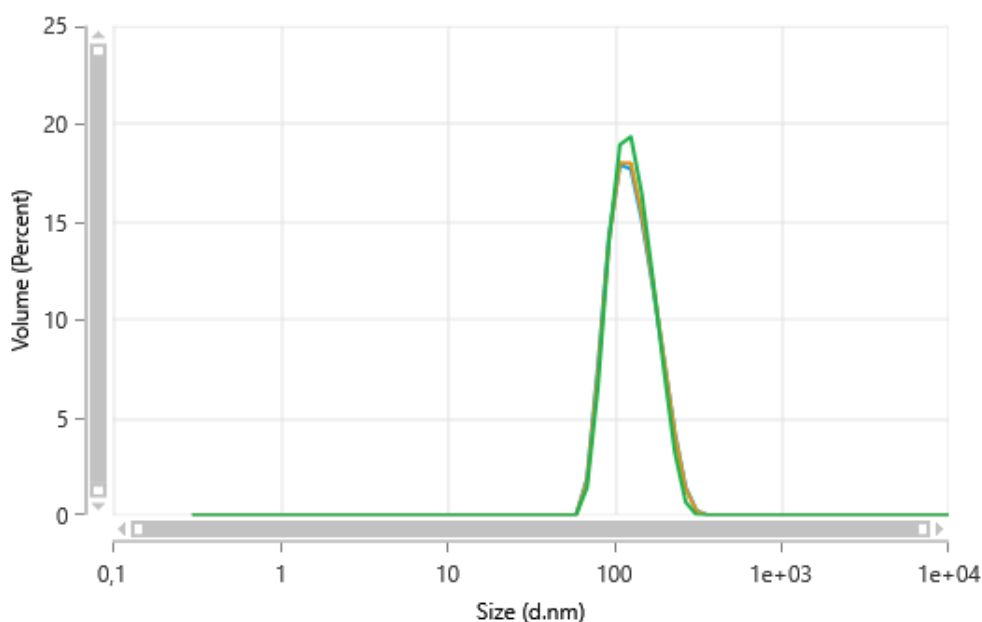


Figura 44: Grafico della distribuzione dimensionale dei liposomi SIL in PBS 1X pH=7,4. Il risultante diametro idrodinamico è il risultato della media di tre misure che sono indicate nei tre colori

Tabella 9: riassunto delle caratteristiche degli SIL; si riporta nelle rispettive colonne la concentrazione di HSPC, la concentrazione di doxorubicina, l'efficienza di incapsulazione e il diametro idrodinamico.

[HSPC]	[DXR] mg/ml	EE %	d_H	PDI
1,06 mg/ml;1,35 mM	0,15 mg/ml	19%	143±1,65 nm	0,04±0,012

4.3 SUPER STEALTH IMMUNO-LIPOSOMES 2-SSIL₂

I *super stealth immuno-liposomes 2*, SSIL₂ sono stati caratterizzati valutandone la dimensione tramite DLS (11.1), la quantità di doxorubicina incapsulata tramite l'efficienza di incapsulazione (5.1) ed il contenuto di HSPC tramite il saggio di Stewart (10.1.1). La sospensione di SSIL₂ come si evince dalla figura 45 è monodispersa, con un basso indice di polidispersività (PDI=0,04±0,02). Le caratteristiche della sospensione sono riportate in tabella 10. Si nota che aver ancorato il PEG con una ramificazione anziché con la singola molecola di DSPE non incide molto sulle caratteristiche fisiche del liposoma.

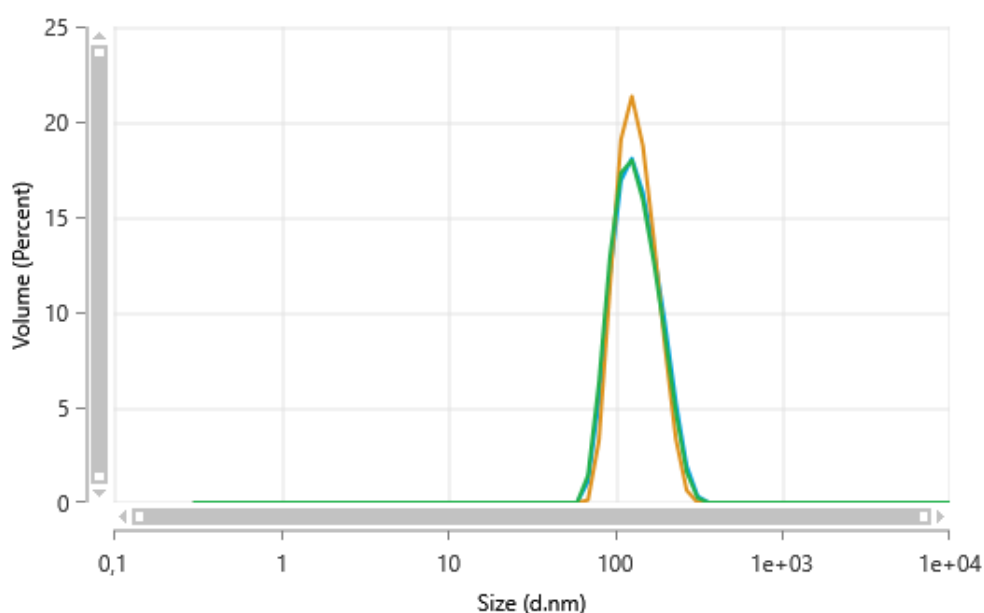


Figura 45: Grafico della distribuzione dimensionale dei liposomi SSIL₂ in PBS 1X pH=7,4. Il risultante diametro idrodinamico è il risultato della media di tre misure che sono indicate nei tre colori

Tabella 10: riassunto delle caratteristiche degli SSIL₂; si riporta nelle rispettive colonne la concentrazione di HSPC, la concentrazione di doxorubicina, l'efficienza di incapsulazione e il diametro idrodinamico.

[HSPC]	[DXR] mg/ml	EE %	d _H	PDI
1,34 mg/ml; 1,71 mM	0,15 mg/ml	85,9%	146,5±2,6 nm	0,04±0,02

4.4 CARATTERIZZAZIONE DEI LIPOSOMI MARCATI CON VYBRANT® DiD

I liposomi SL, SIL e SSIL₂ sono stati caratterizzati dopo marcatura col DiD effettuando l'efficienza di incapsulazione (5.1) per la doxorubicina e per il DiD incorporato.

Per valutare quanto DiD è stato incorporato è stata eseguita una misura di assorbimento a 647 nm ($\epsilon_{647}=245000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ottenendo i seguenti risultati:

Tabella 11: riassunto della quantità di DiD incorporato

	DiD (μg)	EE del DiD	DXR
SL	2,24	78,9%	0,071 mg/ml
SIL	1,38	48,6%	0,041 mg/ml
SSIL ₂	1,32	46,5%	0,038 mg/ml

Le tre soluzioni sono state poi concentrate per ottenere una concentrazione finale di doxorubicina pari a 0,32 mg/ml.

Queste tre formulazioni sono state usate per effettuare i test *in vivo* su Zebrafish (*Danio rerio*).

5. TEST *IN VIVO* SU MODELLO ZEBRAFISH

Gli studi sono stati svolti nel laboratorio del prof. Argenton e della prof.ssa Tiso, Università di Padova. Per valutare l'effetto direzionante del Fab' degli immunoliposomi, le diverse formulazioni allestite di SL, SIL e SSIL₂ sono state testate su un modello Zebrafish inoculato con cellule di adenocarcinoma ovarico SKOV-3, transfettate stabilmente con GFP in modo da renderle fluorescenti. Si è deciso di studiare *in vivo* le tre formulazioni ottenute.

Questo esperimento ha permesso di fare una preliminare valutazione dell'interazione/direzionamento del Fab' presente sugli immunoliposomi verso le cellule tumorali SKOV-3 che sovraesprimono il recettore HER2 cui si lega il Trastuzumab.

Le cellule erano state marcate con la GFP (Green Fluorescent Protein), apparendo verdi (Figura 46 a-b), e le tre formulazioni di liposomi con il Vybrant® DiD apparendo rosse (Figura 46 c-d).

Come si vede in figura 45 gli immunoliposomi, SIL e SSIL₂, sono selettivi verso le cellule cancerose SKOV-3, andando a localizzarsi in prossimità delle cellule esprimenti HER2 (Figura 46 g-h e i-l), mentre i liposomi SL non dimostrano selettività (figura 46 e-f), mancando dell'agente direzionante, il Fab' del Trastuzumab.

I liposomi SIL risultano essere più veloci nel raggiungere il bersaglio, in quanto già ad un giorno dalla trasfezione dimostrano capacità di ridurre la quantità di cellule SKOV-3 (figura 46 g-h), ma anche più tossici; infatti, dopo

RISULTATI

due giorni dalla trasfezione, si nota necrosi cellulare (figura 46 g-h).

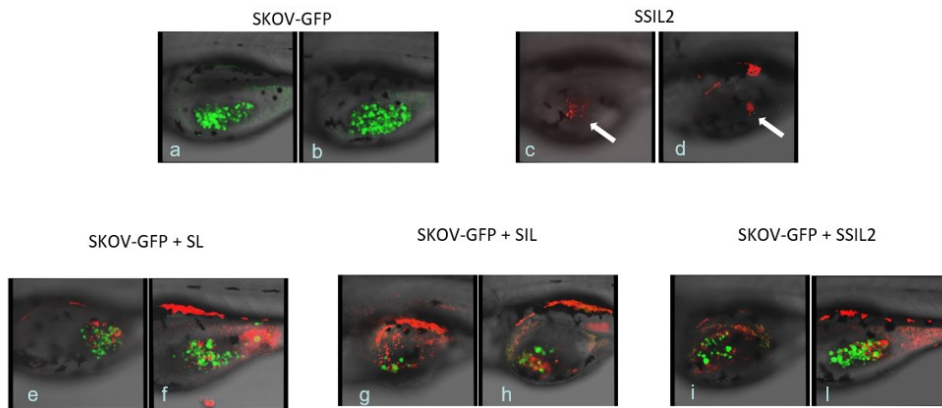


Figura 46: analisi ad 1 giorno dopo la trasfezione e tre giorni dopo la fertilizzazione: a-b: SKOV-3-GFP; c-d: SSIL₂; e-f: SKOV-3-GFP + SL; g-h: SKOV-3-GFP + SIL; i-l: SKOV-3-GFP +SSIL₂.

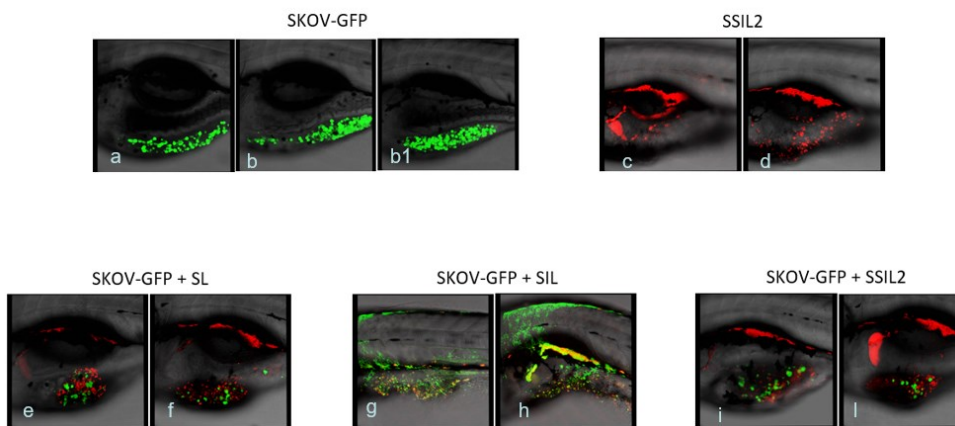


Figura 47 analisi a due giorni dopo la trasfezione e quattro giorni dopo la fertilizzazione: a-b-b1: SKOV-3-GFP; c-d: SSIL₂; e-f: SKOV-3-GFP + SL; g-h: SKOV-3-GFP + SIL; i-l: SKOV-3-GFP +SSIL₂.

Per gli animali trattati con i liposomi, è possibile notare un calo di cellule SKOV-3 a due giorni dopo la trasfezione (figura 47) rispetto alla situazione dopo 1 giorno dalla trasfezione (figura 46), aspetto particolarmente visibile per i liposomi SSIL₂. In genere, è possibile affermare che i liposomi sono in grado di indurre morte cellulare delle cellule SKOV-3.

6. TEST *IN VIVO* SU MODELLO MURINO XENOGRAFT DI TUMORE OVARICO HER2-POSITIVO

Gli studi sono stati svolti nei laboratori della prof.ssa De Martin, Università di Padova. Per valutare l'efficacia antitumorale in vivo è stato allestito un modello murino xenogenico di tumore ovarico sovraesprimente HER2. Le tre formulazioni sono state testate su topi (*mus musculus*) del ceppo SCID (*Severe combined immunodeficient*) in cui sono state inoculate le cellule SKOV-3. I dati sugli SSIL₂ non erano a disposizione al momento della redazione di questo lavoro. In figura 48 viene riportata la crescita tumorale a partire dall'inizio del trattamento con le formulazioni SL e SIL. Al raggiungimento di un volume tumorale di 85 mm² è stato iniziato il trattamento per via endovenosa con SL o SIL alla dose di 10mg/kg ogni 5 giorni per 4 volte, per un totale di 20 giorni dal primo trattamento. Come controlli sono stati utilizzati topo inoculati con le cellule SKOV-3, ma non trattati con le formulazioni. La crescita tumorale è stata valutata ogni 2 giorni tramite la misura delle dimensioni del tumorale alla palpazione con calibro. Negli animali trattati con SL è stata osservata una grande tossicità del trattamento come si attesta dalla sopravvivenza media degli animali che risulta di 9 giorni, paragonabile a quella osservata per gli animali di controllo (11 giorni).

Il trattamento con SIL è stato in grado di ridurre significativamente la crescita tumorale rispetto agli animali di controllo e aumentare la sopravvivenza degli animali, che sono arrivati a fine trattamento (sopravvivenza media di 20 giorni).

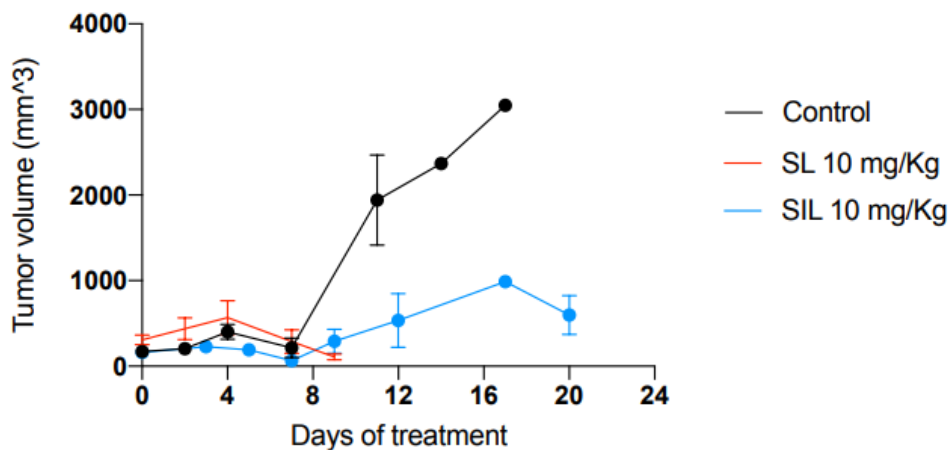


Figura 48: andamento della massa tumorale nel tempo. Linea nera: controllo, nessun trattamento applicato; linea rossa: cavia trattata con SL con DXR; linea blu: cavia trattata con SIL con DXR

RISULTATI

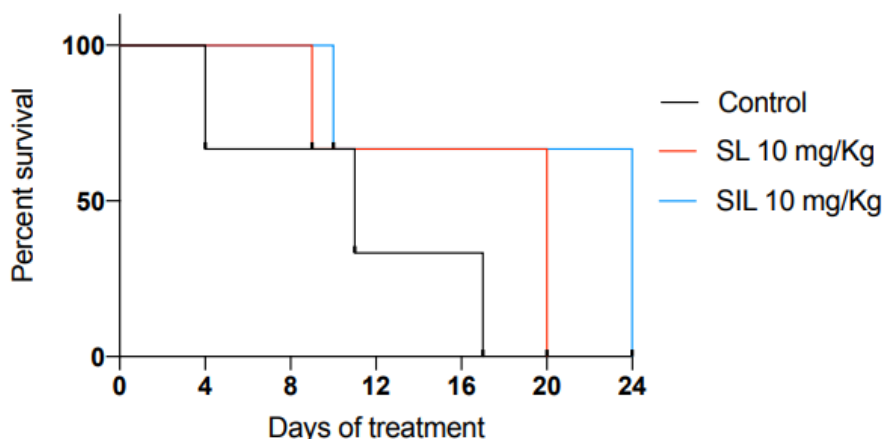


Figura 49: grafico della percentuale di sopravvivenza nei giorni di trattamento. Con i SIL dopo 24 giorni il 75% dei campioni era ancora vivo, mentre per il controllo il test è terminato dopo 17 giorni.

7. CARATTERIZZAZIONE DEI LIPOSOMI *STEALTH* CON LIPOFECTAMINA®

I liposomi *stealth* con lipofectamina®, la cui composizione in frazione molare percentuale è riportata in tabella 12, sono stati caratterizzati con misure del diametro idrodinamico al DLS e sono stati ottenuti i risultati riportati in tabella 13. Le dimensioni dei liposomi sono state controllate appena si sono ottenuti i liposomi (figura 50), dopo 48 e 120 ore conservando la formulazione a +4°C (Figura 51 e 52). Dalle gaussiane ottenute si evince che le sospensioni ottenute sono monodisperse, stabili nel tempo, con carica negativa che si mantiene costante nel tempo

Tabella 12: composizione dei liposomi *stealth* con lipofectamina®. Quantità dei lipidi indicate come rapporto molare percentuale. La quantità del plasmide è riportata come massa.

DOSPA	DOPE	HSPC	m-PEG-DSPE	CHOL	PLASMIDE
39,5%	15,6%	3%	25,6%	16,5%	20,24µg

RISULTATI

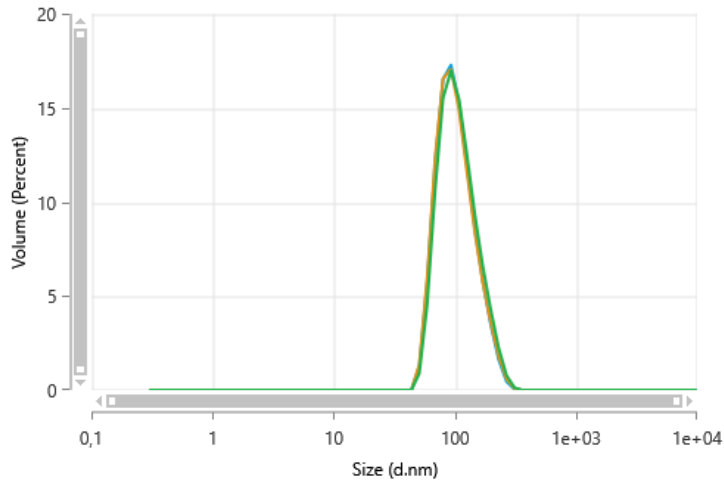


Figura 50: Misura al DLS della sospensione di liposomi *stealth* con lipofectamina® e plasmide

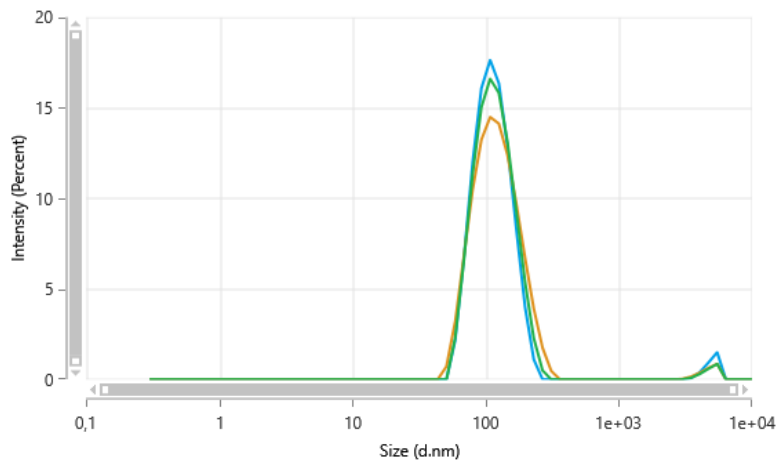
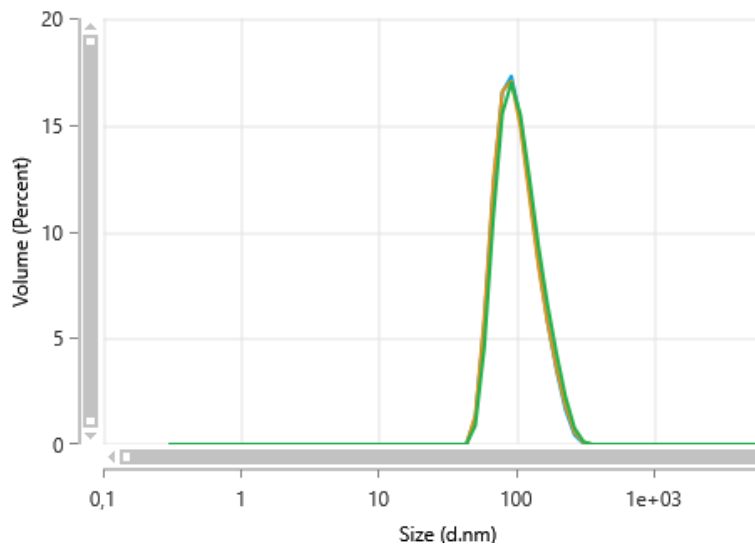


Figura 51: Misura al DLS della sospensione di liposomi *stealth* con lipofectamina® e plasmide dopo 48h dalla formulazione e conservati a +4°C



RISULTATI

Figura 52: Misura al DLS della sospensione di liposomi *stealth* con lipofectamina® e plasmide dopo 120h dalla formulazione conservati a +4°C.

Tabella 13: valori del diametro idrodinamico e di ζ -potential delle sospensioni di liposomi *stealth* con lipofectamina®.

	d_H (nm)	PDI	ζ -potential
Misura istantanea	116,8±1,148	0,05	-22,5±3,9
Misura dopo 48h	114,4 ±0,866	0,19	-26,46±4,9
Misura dopo 120h	115,1±2,27	0,08	-22,25±2,7

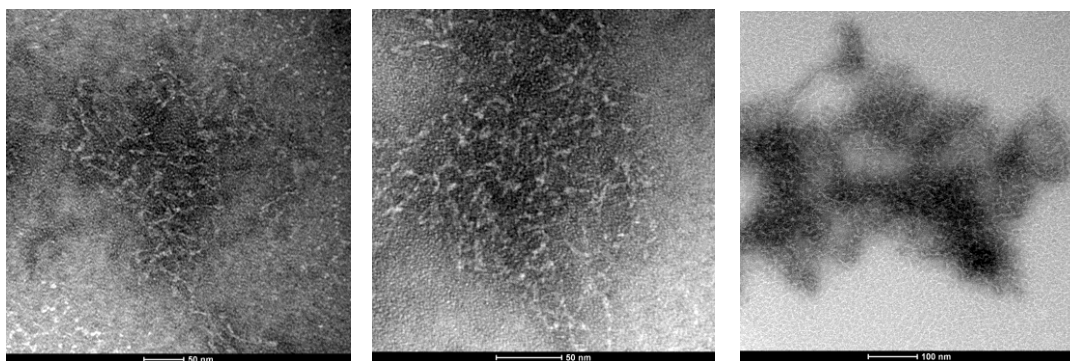
7.1 CARATTERIZZAZIONE AL TEM DEI LIPOSOMI *STEALTH* CON LIPOFECTAMINA®

Si sono acquisite le immagini della sospensione realizzata al microscopio TEM confrontandole con la sola lipofectamina® complessata con il plasmide e con il plasmide.

In figura 53 sono riportate le immagini acquisite a 50 nm e 100 nm del plasmide 2,024 mg/ml 10 μ l in acqua autoclavata.

In figura 54 sono riportate le immagini acquisite a 500 nm, 200 nm e 50 nm di una sospensione di lipofectamina® complessata al pCito shNfix in rapporto 10:1 m/m a concentrazione finale di plasmide pari a 0,038 mg/ml.

In figura 55 sono riportate le immagini acquisite a 500 nm, 100 nm e 50 nm della sospensione di liposomi cationici *stealth* con lipofectamina® e pCito shNfix con concentrazione finale di plasmide 0,03 mg/ml.



RISULTATI

Figura 53: immagini al TEM del plasmide pCito shNfix 2,024 mg/ml, 10 μ

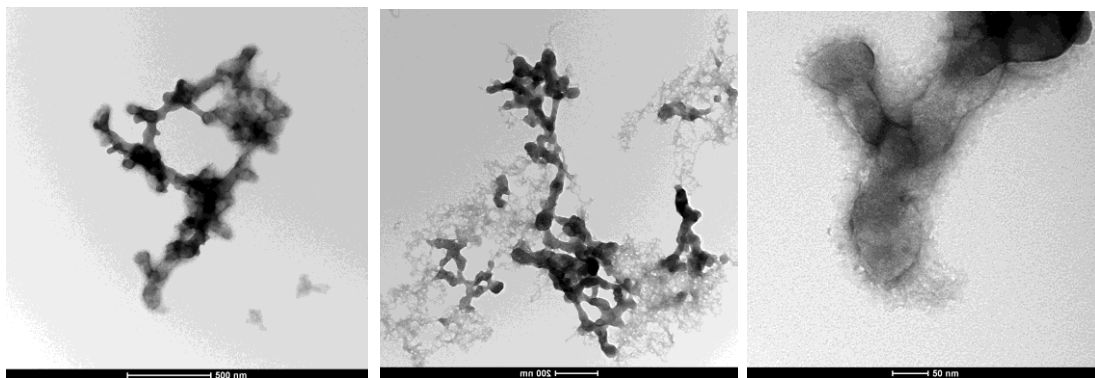


Figura 54: immagini al TEM della lipofectamina® e del plasmide pCito shNfix

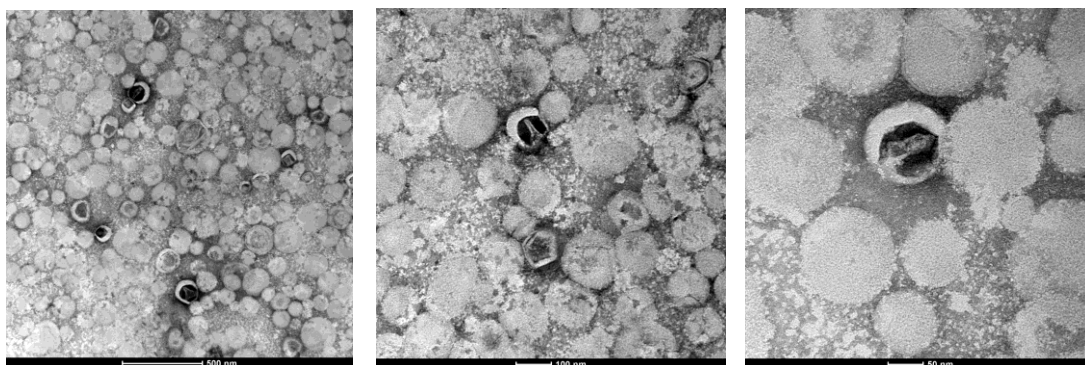


Figura 55: immagini al TEM della sospensione di liposomi *stealth* con lipofectamina® e plasmide

Confrontando le immagini delle figure 53 e 54 ci si accorge con l'introduzione dei lipidi HSPC, colesterolo e m-PEG-DSPE vada a costituire una sospensione omogenea di *nano carriers* che probabilmente non sono liposomi, con all'interno delle invaginazioni di membrana e contenenti il plasmide. La sospensione diventa estremamente omogenea.

8. TEST *IN VITRO* DI LIPOSOMI *STEALTH* CON LIPOFECTAMINA®

Si sono eseguiti dei test *in vitro* con i liposomi *stealth* con lipofectamina® e sono stati eseguiti dal dott. Giuseppe Angelini presso il laboratorio della prof.ssa Graziella Messina, Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano. In figura 56 e 57 sono riportati gli esiti dei test effettuati sulle cellule C2C12, mioblasti murini, per valutare l'espressione della proteina tdTomato esemplificante l'avvenuta trasfezione. Le immagini sono state raccolte al microscopio a fluorescenza valutando la colorazione rossa della proteina. In

RISULTATI

figura 56 sono poste a confronto le inoculazioni effettuate con il complesso di lipofectamina® e plasmide e i liposomi *Stealth* con lipofectamina®. In Figura 57 invece vengono confrontate le cellule dopo inoculazione dei liposomi dopo trattamento con Reagent Plus® e altro plasmide.

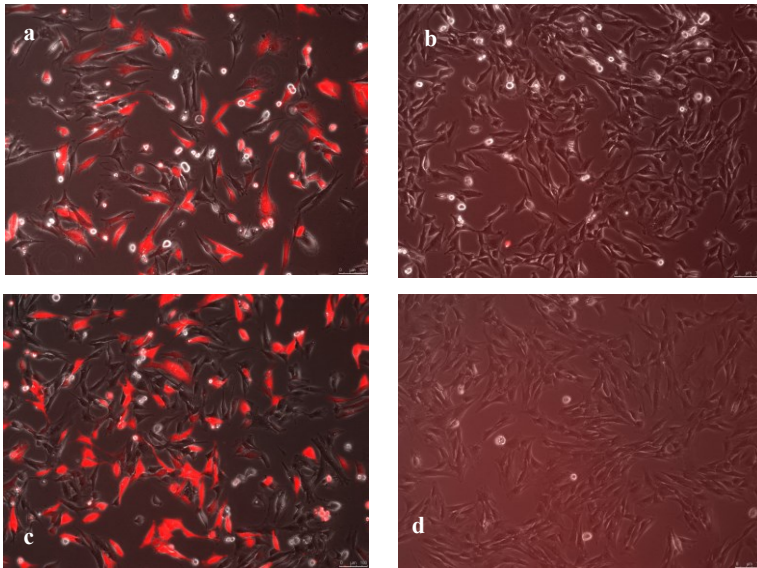


Figura 56:6h dalla trasfezione a. LTX®, b. liposomi *stealth* con lipofectamina®, 16h dalla inoculazione c. LTX®; d. liposomi *stealth* con lipofectamina®

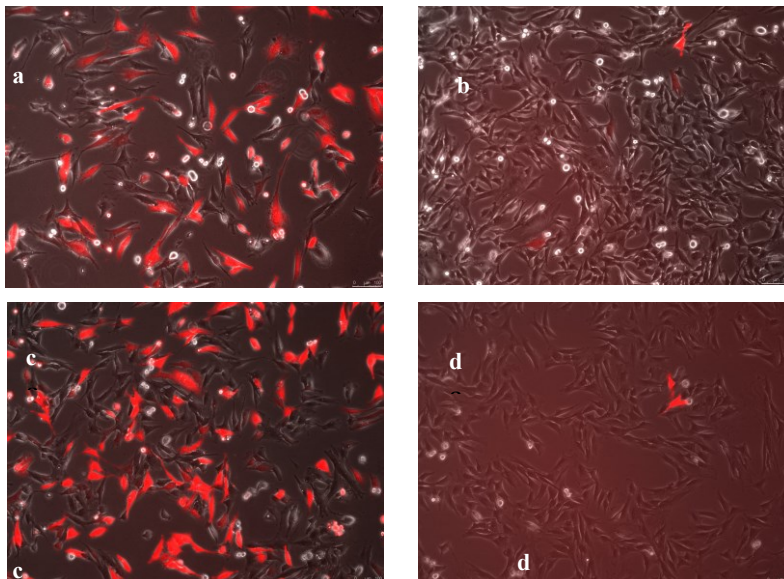


Figura 57: lipoplessi dopo 6h dalla inoculazione a. lipofectamina®, b. liposomi *stealth* con lipofectamina® e Reagent plus® e plasmide. Lipoplessi dopo 16h dalla trasfezione c. lipofectamina®, d. liposomi *stealth* con lipofectamina® e Reagent plus® e plasmide.

DISCUSSIONE

I *nano carriers* in ambito farmacologico stanno acquistando sempre più valore soprattutto per poter modificare *in vivo* il comportamento di un farmaco. I liposomi, *nano carriers* molto flessibili, sono stati approvati per molte patologie come, ad esempio, il trattamento del tumore o l'analgesia.

Molte sono le potenzialità di questi sistemi di trasporto nano dimensionali, perché molte sono le variabili su cui si può agire durante la loro preparazione.

In questo lavoro di tesi si è voluto formulare, tramite la tecnica *Thin Layer Evaporation Method*, dei *nano carriers* lipidici di tipo *Stealth* e applicarli a due esigenze terapeutiche e tecnologiche completamente diverse. Per rendere *Stealth*, ovvero invisibili, i *nano carriers* si è usato il PEG, polimero idrofilico solubile in molti solventi che conferisce stabilità ai sistemi di *Drug Delivery*¹⁶.

Nel primo caso si sono formulati dei liposomi per *delivery* di un farmaco in cellule tumorali. L'utilizzo dei sistemi liposomiali nel trattamento dei carcinomi è ben consolidato perché essi permettono di ridurre la tossicità dei farmaci che trasportano, dovuta alla loro scarsa selettività verso le cellule tumorali, oltre ad implementare la solubilità del farmaco.⁶⁰ I liposomi formulati sono *Stealth* e *Super Stealth* e si sono utilizzati i lipidi HSPC (fosfatidilcolina di soia idrogenata), colesterolo e mPEG-DSPE in rapporto molare 16:8:1. Nel caso dei liposomi *Stealth* si è usato mPEG-DSPE, mentre per i *Super Stealth* mPEG-DSPE₂, il PEG-ramificato. In entrambi i casi è stata introdotto con la tecnica *Remote Loading* il farmaco doxorubicina, antibiotico chemioterapico, ampiamente in uso anche in sistemi liposomiali come nel Caelix®/Doxil®.

Tali sistemi sono inoltre stati implementati con un agente direzionante, il Fab' del Trastuzumab, perché l'obiettivo terapeutico è il carcinoma della mammella positivo all'HER2. Il Trastuzumab è un anticorpo monoclonale appartenente alla famiglia delle IgG1κ già da tempo utilizzato nella terapia del carcinoma della mammella in farmaci quali l'Herceptin®, tale e quale, in associazione col Pertuzumab nel Perjeta®, come ADC nel Kadcyła®.

L'agente di *targeting* è stato ottenuto per digestione peptica, seguita da riduzione con cisteammina, dell'anticorpo Trastuzumab. Ottenuto il frammento Fab', esso è stato coniugato via addizione di Michael tramite la sua cisteina alla maleimmide di Mal-PEG-DSPE e le micelle formatesi per la presenza del fosfolipide disteroilfosfatidiletanolammina sono state fuse con i liposomi *Stealth* e *Super Stealth* con la tecnica *Post insertion*.

Si sono ottenuti i sistemi SIL e SSIL₂ e sono stati fatti gli studi *in vivo* confrontandoli con i sistemi di deliveri SL, ovvero *Stealth liposomes* e cioè liposomi con il PEG ma senza agente direzionante, per poterne valutare l'efficacia voluta dell'agente di targeting.

Dagli studi *in vivo* sui vertebrati Zebrafish (*Danio rerio*), uno dei modelli per gli studi di carcinomi più diffuso dagli anni '80⁶⁴, inoculati con cellule di adenocarcinoma ovarico SKOV-3 si è potuto notare come l'introduzione di un agente direzionante abbia definito la specificità di azione di questi sistemi. Alla stessa conclusione si è arrivati dagli studi *in vivo* su modello murino xenogenico di tumore ovarico sovraesprimente HER2 in cui la selettività dovuta all'agente direzionante porta ad un netto beneficio terapeutico. Purtroppo, sugli organismi più complessi come questi mammiferi non si sono potuti studiare gli SSIL₂ per mancanza di tempo, ma l'obiettivo era notare una maggior stabilità e minori effetti collaterali oltre ad una incrementata efficienza terapeutica. Negli animali trattati si è notato un calo delle cellule SKOV-3 potendo quindi affermare che questi liposomi sono in grado di indurre la morte cellulare delle cellule SKOV-3.

Nel secondo progetto sviluppato in questo lavoro di tesi si sono formulati dei *nano carriers* lipidici per transfettare un plasmide, il pCito shNfix su cellule C1C12, una linea cellulare di miociti murini. Per attuare la trasfezione si adottano varie metodologie⁶⁵ e in questo lavoro si è tentato di inglobare il plasmide nei *carriers* per proteggerlo dalla degradazione e renderlo più stabile⁶⁶. Tale plasmide, sintetizzato presso i laboratori di biologia cellulare della prof.ssa Messina, Università di Milano, contiene il shRNA che ha l'obiettivo di silenziare il fattore di trascrizione Nfix e si è osservato che tale silenziamento porta a ritardare la rigenerazione delle fibre muscolari ad avere fibre muscolari di tipo ossidativo.⁵⁷ In clinica l'eteplirsen (Sarepta Therapeutics, USA)⁴⁴ è già stato approvato dall'FDA per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne e si basa su un oligonucleotide antisense o meglio delle fosforoammiditi di morofolino oligomeri. Tuttavia, questo farmaco presenta molti limiti, quali lo scarso *uptake* cellulare, la scarsa permeabilità e la rapida escrezione⁴⁴. In Europa invece è stato approvato dall'EMA l'ataluren (translarna, PTC Therapeutics International limited, Dublin, Ireland) e approvato dall'AIFA nel 2014 per il trattamento delle DMD da mutazioni non senso. Questo farmaco, che si assume per os, è una molecola in grado di superare gli stop codon dovuti a mutazioni non senso e a permettere la sintesi di distrofina funzionale.

Nelle patologie di origine genetica è necessario veicolare il materiale genetico, plasmidi, DNA, RNA verso le cellule target. Si usano adenovirus associati come vettori virali, ma questi causano molti problemi di tossicità ed immunogenicità. È necessario, perciò, in tale ambito terapeutico continuare a sviluppare dei vettori non virali e i più promettenti sono i liposomi. In clinica

ritroviamo sistemi liposomiali come *carriers* non virali in Epaxal, Inflexal, Elasoermal e Tozinameran⁶⁶.

Per formulare questi sistemi di veicolazione si sono usati i lipidi DOSPA (2,3 dioleilossi-N-2sperminecarbossilammido etil, N, N dimetil-1-propammintrifluoroacetato), DOPE (1,2 dioleoil, sn, glicero 3 fosfatidiletanolamina), provenienti dal prodotto commerciale lipofectamina®, cui si sono aggiunti colesterolo, mPEG-DSPE e HSPC (fosfatidilcolina di soia idrogenata) nei rapporti molarali percentuali: 39,5:15,6:16,5:25,6:3.

Si è usata la tecnica *Thin Layer evaporation* per formare tali sistemi e durante l'idratazione è stato introdotto il plasmide e la lipofectamina®. Anche in questo caso per omogeneizzare le sospensioni si sono estrusi i sistemi con membrane dai 400 nm fino a 50 nm. Dalle immagini ricavate dal microscopio TEM sembra che queste sospensioni molto probabilmente siano dei *lipidic nano carriers* e non liposomi, ma l'obiettivo era ottenere un sistema di *delivery Stealth*. Per evidenziare l'avvenuta trasfezione nel plasmide è stato introdotto anche il gene per la tdTomato una proteina fluorescente. Tali sistemi sono stati utilizzati per gli studi *in vitro*, ma senza grandi risultati poiché non si è quasi avuta la trasfezione. Molto probabilmente perché questi sistemi sono estremamente stabili e difficilmente la cellula riesce ad attuare *l'endosomal escape*¹⁸. La presenza di HSPC è stata voluta per implementare la biocompatibilità di tali formulazioni. mPEG-DSPE è stato introdotto per rendere le strutture schermate dal RES e più stabili. Il colesterolo ha un ruolo di modulatore della membrana lipidica. In alcune formulazioni che abbiamo testato la percentuale in rapporto molare di colesterolo era del 50%, ma i sistemi apparivano meno omogenei per cui si è scelto di ridurla fino al 16,5%. Si sono testate molte formulazioni per riuscire ad inglobare un elevato quantitativo di plasmide in modo stabile e con questa tecnica facilmente si è raggiunto un N/P paria a circa 2. Senza la lipofectamina® tale rapporto era arrivato al massimo ad essere uguale a 20, ma non era stabile nel tempo perché dopo qualche settimana la sospensione conservata a +4°C presentava un precipitato. Altre formulazioni avevano anche il problema di essere citotossiche, probabilmente per l'eccessiva carica positiva introdotta dai lipidi cationici.

BIBLIOGRAFIA

1. Bangham AD, De Gier J, Greville GD. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chem Phys Lipids*. 1967;1(3):225-246. doi:10.1016/0009-3084(67)90030-8
2. Hudis CA. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51. doi:10.1056/NEJMra043186
3. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2007;3(1):20-31. doi:10.1016/j.nano.2006.11.008
4. Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2005;1(3):193-212. doi:10.1016/j.nano.2005.06.004
5. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(3):214-221. doi:10.1038/nrd1033
6. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):57. doi:10.3390/pharmaceutics10020057
7. Halder J, Pradhan D, Kar B, Ghosh G, Rath G. Nanotherapeutics approaches to overcome P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance in cancer. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2022;40:102494. doi:10.1016/j.nano.2021.102494
8. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol*. 2012;1(2):147-168. doi:10.1166/jcsb.2012.1020
9. Danhier F, Feron O, Pr eat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Controlled Release*. 2010;148(2):135-146. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027
10. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Academic; 2008.
11. Nag O, Awasthi V. Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutics*. 2013;5(4):542-569. doi:10.3390/pharmaceutics5040542
12. Complement activation cascade triggered by PEG–PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: The challenges ahead | Elsevier Enhanced Reader. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.003

13. Weber C, Voigt M, Simon J, et al. Functionalization of Liposomes with Hydrophilic Polymers Results in Macrophage Uptake Independent of the Protein Corona. *Biomacromolecules*. 2019;20(8):2989-2999. doi:10.1021/acs.biomac.9b00539
14. Samaridou E, Kalamidas N, Santalices I, Crecente-Campo J, Alonso MJ. Tuning the PEG surface density of the PEG-PGA enveloped Octaarginine-peptide Nanocomplexes. *Drug Deliv Transl Res*. 2020;10(1):241-258. doi:10.1007/s13346-019-00678-3
15. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145-160. doi:10.1038/nrd1632
16. Pasut G, Paolino D, Celia C, et al. Polyethylene glycol (PEG)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy. *J Controlled Release*. 2015;199:106-113. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.008
17. Maeda H, Matsumura Y. EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(3):129-130. doi:10.1016/j.addr.2010.05.001
18. Crielaard BJ, Lammers T, Schiffelers RM, Storm G. Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one. *J Controlled Release*. 2012;161(2):225-234. doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.014
19. Abul K. Abbas, ottava edizione, Immunologia cellulare e molecolare.
20. Ishida T, Iden DL, Allen TM. A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs. *FEBS Lett*. 1999;460(1):129-133. doi:10.1016/S0014-5793(99)01320-4
21. Qiu Y, Yang L, Liu H, Luo X. Cancer Stem Cell-Targeted Therapeutic Approaches for Overcoming Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Stem Cells*. 2021;39(9):1125-1136. doi:10.1002/stem.3381
22. Kennedy SP, Han JZR, Portman N, et al. Targeting promiscuous heterodimerization overcomes innate resistance to ERBB2 dimerization inhibitors in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2019;21:43. doi:10.1186/s13058-019-1127-y
23. Ding K, Wu Z, Li X, Sheng Y, Wang X, Tan S. LMO4 mediates trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer cells. :16.
24. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. ACS Publications. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00046

BIBLIOGRAFIA

25. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications - ScienceDirect. Accessed April 24, 2022.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517321003768?via%3Dihub>
26. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1986;858(1):161-168. doi:10.1016/0005-2736(86)90302-0
27. Pauli et al.2019.
28. Maherani et al.2011.
29. Li T, Cipolla D, Rades T, Boyd BJ. Drug nanocrystallisation within liposomes. *J Controlled Release.* 2018;288:96-110.
doi:10.1016/j.jconrel.2018.09.001
30. Hallmarks of cancer: the next generation Douglas Hanahan 1, Robert A Weinberg DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
31. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.
32. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803. PMID: 15032581.
33. Drake MT. Osteoporosis and cancer. *Curr Osteoporos Rep.* 2013 Sep;11(3):163-70. doi: 10.1007/s11914-013-0154-3. PMID: 23877475; PMCID: PMC3783531.
34. Wilson FR, Coombes ME, Wylie Q, et al. Herceptin® (trastuzumab) in HER2-positive early breast cancer: protocol for a systematic review and cumulative network meta-analysis. *Syst Rev.* 2017;6(1):196.
doi:10.1186/s13643-017-0588-2
35. GLOBOCAN 2020: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Accessed 06 June 2022.
36. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Controlled Release.* 2010;146(3):264-275.
doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.009
37. i numeri del cancro in italia.pdf.

38. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther.* 2014 Oct-Dec;10(4):853-8. doi: 10.4103/0973-1482.139267. PMID: 25579518.
39. Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2020 Mar 27;126(7):926-941. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314681. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32213135; PMCID: PMC7121924.
40. Al-Malky HS, Al Harthi SE, Osman AM. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J Oncol Pharm Pract.* 2020 Mar;26(2):434-444. doi: 10.1177/1078155219877931. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31594518.
41. Younes A, Sehn LH, Johnson P, Zinzani PL, Hong X, Zhu J, Patti C, Belada D, Samoiloova O, Suh C, Leppä S, Rai S, Turgut M, Jurczak W, Cheung MC, Gurion R, Yeh SP, Lopez-Hernandez A, Dührsen U, Thieblemont C, Chiattonne CS, Balasubramanian S, Carey J, Liu G, Shreeve SM, Sun S, Zhuang SH, Vermeulen J, Staudt LM, Wilson W; PHOENIX investigators. Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2019 May 20;37(15):1285-1295. doi: 10.1200/JCO.18.02403. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30901302; PMCID: PMC6553835.
42. Pipicz M, Demján V, Sárközy M, Csont T. Effects of Cardiovascular Risk Factors on Cardiac STAT3. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3572. doi:10.3390/ijms19113572
43. Luu AZ, Chowdhury B, Al-Omran M, Teoh H, Hess DA, Verma S. Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3(6):861-870. doi:10.1016/j.jacbts.2018.06.005
44. Lim KR, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther.* 2017;Volume11:533-545. doi:10.2147/DDDT.S97635
45. Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 May 5;2016(5):CD003725. doi: 10.1002/14651858.CD003725.pub4. PMID: 27149418; PMCID: PMC8580515.
46. Clemens PR, Rao VK, Connolly AM, Harper AD, Mah JK, Smith EC, McDonald CM, Zaidman CM, Morgenroth LP, Osaki H, Satou Y, Yamashita T, Hoffman EP; CINRG DNHS Investigators. Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping: A Phase 2

- Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2020 Aug 1;77(8):982-991. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1264. Erratum in: *JAMA Neurol.* 2020 Aug 1;77(8):1040. PMID: 32453377; PMCID: PMC7251505.
47. Douglas AGL, Wood MJA. Splicing therapy for neuromuscular disease. *Mol Cell Neurosci.* 2013;56:169-185. doi:10.1016/j.mcn.2013.04.005
 48. Pasqualino, Panattoni, Anatomia umana, UTET.
 49. Robbins e Cotran, Le basi patologiche delle malattie, ELSEVIER.
 50. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003 Dec;2(12):731-40. doi: 10.1016/s1474-4422(03)00585-4. PMID: 14636778.
 51. Falzarano M, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules.* 2015;20(10):18168-18184. doi:10.3390/molecules201018168
 52. Sohn RL, Gussoni E. Stem cell therapy for muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Jan;4(1):1-9. doi: 10.1517/14712598.4.1.1. PMID: 14680464.
 53. Sun C, Serra C, Lee G, Wagner KR. Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Neurol.* 2020;323:113086. doi:10.1016/j.expneurol.2019.113086
 54. Emami MR, Young CS, Ji Y, et al. Polyrotaxane Nanocarriers Can Deliver CRISPR/Cas9 Plasmid to Dystrophic Muscle Cells to Successfully Edit the DMD Gene. *Adv Ther.* 2019;2(7):1900061. doi:10.1002/adtp.201900061
 55. Bushby K, Finkel R, Wong B, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve.* 2014;50(4):477-487. doi:10.1002/mus.24332
 56. Politano L. Read-through approach for stop mutations in Duchenne muscular dystrophy. An update. :8.
 57. Rossi G, Bonfanti C, Antonini S, et al. Silencing Nfix rescues muscular dystrophy by delaying muscle regeneration. *Nat Commun.* 2017;8(1):1055. doi:10.1038/s41467-017-01098-y
 58. Sullenger BA, Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature.* 2002;418(6894):252-258. doi:10.1038/418252a
 59. Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane

- phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2006;1758(10):1633-1640. doi:10.1016/j.bbamem.2006.05.028
60. Barenholz Y (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Controlled Release.* 2012;160(2):117-134. doi:10.1016/j.jconrel.2012.03.020
61. Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem.* 1980;104(1):10-14. doi:10.1016/0003-2697(80)90269-9
62. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
63. BAXA, U. Imaging of Liposomes by Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol*, v. 1682, p. 73-88, 2018. ISSN 1940-6029.
64. Al-Thani HF, Shurbaji S, Yalcin HC. Zebrafish as a Model for Anticancer Nanomedicine Studies. *Pharmaceuticals.* 2021;14(7):625. doi:10.3390/ph14070625
65. Sayed N, Allawadhi P, Khurana A, et al. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci.* 2022;294:120375. doi:10.1016/j.lfs.2022.120375
66. Suzuki Y, Ishihara H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2021;41:100424. doi:10.1016/j.dmpk.2021.100424

