

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA
FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA

***STUDIO DI IMMUNOLIPOSOMI DIREZIONATI AL RECETTORE
HER2, PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI ANTITUMORALI
AL CANCRO OVARICO***

RELATORE: Prof. Gianfranco Pasut

CORELATORE: Dot.ssa Antonella Grigoletto

LAUREANDO: Giacomo Dal Santo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

ABBREVIAZIONI	7
ABSTRACT (SOMMARIO)	11
INTRODUZIONE	15
1. CANCRO	15
1.1 Tipologie di cancro	16
1.2 Cancro ovarico	17
1.3 Classificazione dei tumori ovarici	18
1.4 Recettore HER-2.....	20
1.5 Pathway Intracellulare mediato da HER-2	22
1.6 Tumore Ovarico HER2+	23
1.7 Screening e Diagnosi del Cancro Ovarico	23
2. TRATTAMENTO DEL CANCRO OVARICO	24
2.1 Chirurgia	24
2.2 Chemioterapia	24
2.3 Trattamento di Seconda Linea	25
3. NANOMEDICINA	26
3.1 Sistemi di drug delivery	26
3.2 Effetto EPR e Targeting Attivo	27
4. LIPOSOMI	28
4.1 Classificazione	29
4.2 Vantaggi e Svantaggi.....	30
4.3 Formulazione dei Liposomi	31
4.4 Caricamento del farmaco	32
4.5 Liposomi ordinari.....	33
4.6 Liposomi Stealth	34
4.7 Polietilenglicole (PEG)	35
4.8 Liposomi Super Stealth.....	37
4.9 Doxorubicina.....	37
5. TRASTUZUMAB	39
MATERIALI	43

METODI..... 47

1. PREPARAZIONE DI LIPOSOMI STEALTH E SUPER STEALTH.....	47
1.1 Thin layer Evaporation	47
1.2 Incorporazione di Doxorubicina (DXR)	48
2. PREPARAZIONE DI F(ab)'-PEG_n-DSPE_n.....	50
2.1 Digestione enzimatica	50
2.2 Riduzione di F(ab) ₂ a F(ab)' con cisteamina	51
2.3 PEGilazione F(ab)'	52
3. PREPARAZIONE DI IMMUNOLIPOSOMI STEALTH E SUPER STEALTH	54
3.1 Post Insertion	54
4. CARATTERIZZAZIONE DELLE FORMULAZIONI.....	56
4.1 Tecniche Strumentali.....	56
4.1.1 SDS-PAGE	56
4.1.1.1 Colorazione al Coomassie Blue Brilliant	58
4.1.1.2 Colorazione allo iodio (I ₂)	58
4.1.1.3 Colorazione all'Argento	59
4.1.2 Dynamic Light Scattering (DLS).....	60
4.1.3 Spettrofluorimetria	61
4.1.4 Microscopio a Trasmissione Elettronica (TEM).....	63
4.2 Saggi	64
4.2.1 Saggio di Stewart	64
4.2.2 Efficienza di Incorporazione, EE%	66
4.2.3 Saggio dell'Acido Biciconinico, BCA.....	66
4.2.4 Micro-BCA	68
5. STUDIO DELLE FORMULAZIONI LIPOSOMIALI.....	70
5.1 Studio di stabilità a lungo termine	70
5.2 Studio di rilascio del farmaco	71
5.3 Studi di Opsonizzazione	72
5.4 Studio di citotossicità in vitro	73
5.5 Microscopia confocale in vitro	74

RISULTATI..... 77

1. CARATTERIZZAZIONE DELLE FORMULAZIONI.....	77
1.1 Analisi DLS di SL, SIL, SSL ₂ e SSIL ₂	77
1.2 Analisi TEM di SL, SIL	80
2. PREPARAZIONE F(ab)'- PEG5kDa -DSPE.....	83
2.1 Digestione Enzimatica	83

2.2	Riduzione F(ab) ₂	85
2.3	PEGilazione F(ab)'	87
2.4	Valutazione della Post-Insertion	88
2.5	Quantificazione di F(ab)' su SIL	89
3.	STUDI IN VITRO DELLE FORMULAZIONI	90
3.1	Studi di stabilità a lungo termine	90
3.2	Studi di rilascio del farmaco	94
3.3	Studi di opsonizzazione	97
	<i>DISCUSSIONE</i>.....	<i>103</i>
	<i>RIFERIMENTI</i>.....	<i>111</i>

ABBREVIAZIONI

<i>AA</i>	<i>amino acido</i>
<i>Abs</i>	<i>assorbanza</i>
<i>BaCl₂</i>	<i>cloruro di bario</i>
<i>BCA</i>	<i>acido biciconinico</i>
<i>βGlu</i>	<i>acido β-glutammico</i>
<i>BSA</i>	<i>albumina di siero umano</i>
<i>CHCl₃</i>	<i>cloroformio</i>
<i>CHOL</i>	<i>colesterolo</i>
<i>Cys</i>	<i>cisteina</i>
<i>δ</i>	<i>densità</i>
<i>Da</i>	<i>dalton</i>
<i>DLS</i>	<i>dynamic light scattering</i>
<i>DSPE</i>	<i>distearil fosfatidil etanolamina</i>
<i>DXR</i>	<i>doxorubicina</i>
<i>ε</i>	<i>coefficiente di estinzione molare</i>
<i>EDTA</i>	<i>acido etanol diammino tetracetico</i>
<i>Eq</i>	<i>equivalenti</i>
<i>F(ab)'</i>	<i>frammento di legame all'antigene</i>
<i>F(ab)₂</i>	<i>frammento di legame all'antigene</i>

<i>Fc</i>	<i>frammento cristallino dell'anticorpo</i>
<i>HCl</i>	<i>acido cloridrico</i>
<i>HSPC</i>	<i>fosfatidil colina idrogenata di soia</i>
<i>KI</i>	<i>ioduro di potassio</i>
<i>mA</i>	<i>milliampere</i>
<i>Mal</i>	<i>maleimide</i>
<i>MeOH</i>	<i>metanolo</i>
<i>mg/mL</i>	<i>milligrammo/millilitro</i>
<i>mL</i>	<i>millilitro</i>
<i>MLVs</i>	<i>vescicole multi-lamellari</i>
<i>mPEG</i>	<i>metossi-politilen glicole</i>
<i>mV</i>	<i>millivolt</i>
<i>NaOH</i>	<i>idrossido di sodio</i>
<i>NH₄Fe(SCN)₃</i>	<i>ammonio ferro (III) tiocianato</i>
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	<i>ammonio solfato</i>
<i>nm</i>	<i>nanometri</i>
<i>o/n</i>	<i>overnight</i>
<i>pI</i>	<i>punto isoelettrico</i>
<i>PBS</i>	<i>buffer fosfato salino</i>
<i>PEG</i>	<i>polietilen glicole</i>
<i>rpm</i>	<i>rivoluzioni per minuto</i>
<i>SDS</i>	<i>sodio dodecil fosfato</i>

<i>Ser</i>	<i>serina</i>
<i>SL</i>	<i>liposomi stealth</i>
<i>SIL</i>	<i>immunoliposomi stealth</i>
<i>SSL_n</i>	<i>liposomi super stealth (n= molecole di DSPE)</i>
<i>SSIL_n</i>	<i>immunoliposomi super stealth (n= molecole di DSPE)</i>
<i>SUVs</i>	<i>vescicole unilamellari</i>
<i>TEA</i>	<i>triethylamina</i>
<i>TEM</i>	<i>microscopia a trasmissione elettronica</i>
<i>Thr</i>	<i>treonina</i>
<i>T_m</i>	<i>temperatura di melting (fusione)</i>
<i>Trp</i>	<i>triptofano</i>
<i>TRS</i>	<i>trastuzumab</i>
<i>Tyr</i>	<i>tirosina</i>
<i>UV-vis</i>	<i>ultravioletto-visibile</i>
<i>v/v</i>	<i>volume/volume</i>

ABSTRACT (SOMMARIO)

Il carcinoma epiteliale dell'ovaio, più comunemente cancro ovarico, è una neoplasia che deriva dalle cellule epiteliali della gonade femminile e corrisponde a circa il 90% di tutti i tumori ovarici. Rappresenta il 30% dei tumori dell'apparato genitale femminile ed è la quarta causa di morte per neoplasia maligna nelle donne nei paesi industrializzati¹.

Biologicamente può essere classificato secondo le diverse vie di sviluppo, stadio e sottotipo istologico: in questo specifico progetto le cellule tumorali bersaglio sono caratterizzate dalla sovra espressione del recettore *HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)* sulla loro superficie. Si tratta di un recettore di natura tirosin chinasi, il quale appartiene alla famiglia dei recettori *HER/ErbB* adibiti alla regolazione della crescita e dello sviluppo cellulare.

A chirurgia e chemioterapia, che fino a una decina di anni fa erano l'unica opzione di trattamento per le donne affette da tumore ovarico, si sono oggi affiancate le terapie a bersaglio molecolare, utilizzate sia nella prima linea di trattamento sia in caso di recidiva. Sistemi di drug delivery con efficace targeting cellulare sono quindi in continuo studio ed evoluzione come possibili nuovi trattamenti.

I liposomi sono stati uno dei primi sistemi di delivery nanotecnologico introdotti in terapia grazie alla loro vantaggiosa biocompatibilità, biodegradabilità e ad un'elevata versatilità dal punto di vista tecnologico farmaceutico. Le loro dimensioni, e la correlata capacità di sfruttare l'effetto *EPR (Enhanced Permeability and Retention effect)* aumentando la specificità terapeutica e riducendone gli effetti collaterali, rendono queste formulazioni rilevanti in ambito tumorale. Lo svantaggio di queste nanotecnologie è riconducibile alla loro instabilità all'interno del torrente circolatorio. I liposomi infatti tendono ad aggregare, rilasciare anticipatamente il farmaco, oppure essere riconosciuti da parte del *RES (Reticular Endothelial System)*. Per questo motivo l'inserimento nella superficie di un polimero idrofilico come il PEG, o di un suo dendrone, il quale porta alla creazione rispettivamente di liposomi *Stealth* o *Super Stealth*, dona alle formulazioni

capacità di aggirare i problemi di instabilità, aumentando il tempo di emivita e l'efficacia terapeutica.

Gli obiettivi di questo progetto di tesi sono stati, la progettazione, studio, caratterizzazione e confronto di differenti sistemi liposomiali, contenenti doxorubicina quale farmaco antitumorale. In particolare, sono stati sviluppati dei liposomi direzionati in grado di riconoscere selettivamente il recettore cellulare HER2, sovra espresso nelle cellule tumorali, grazie all'utilizzo della porzione F(ab)' di un anticorpo monoclonale già utilizzato in terapia, il Trastuzumab. La porzione Fab' è stata legata alla superficie esterna dei liposomi. In particolare, sono state preparate e confrontate formulazioni di liposomi stealth (SL), immunoliposomi stealth (SIL), liposomi superstealth (SSL_n) e immunoliposomi superstealth (SSIL_n). Per quanto riguarda le formulazioni stealth, si è introdotta una variazione rispetto a studi precedentemente condotti. Si è infatti diversificata la dimensione tra PEG superficiale, agente da cover per il film liposomiale, e la molecola di Mal-PEG-DSPE_n agente da linker alla porzione dell'anticorpo. Queste formulazioni con due differenti dimensioni di polimero prendono la denominazione di "misti", così identificati per distinguerli dalle normali formulazioni stealth con la medesima lunghezza di PEG.

Tutte le formulazioni sono state preparate con la tecnica del "thin layer evaporation" e il farmaco, doxorubicina, incapsulato tramite "remote loading". Una porzione del film lipidico, comune a tutte le formulazioni, consiste di *fosfatidil colina idrogenata di soia (HSPC)* e *colesterolo*. La sostanziale differenza risiede nelle diverse tipologie di PEG impiegate: nelle formulazioni *stealth* sono state adoperate versioni commerciali di *mPEG-DSPE* da 2 kDa per i *SL/SIL_{misti}* e da 5 kDa, per *SL/SIL_{5kDa}*, mentre molecole di *mPEG-DSPE₂* sono state adoperate per formulazioni *super stealth*, *SSL₂* e *SSIL₂*.

La *doxorubicina* è un potente farmaco antitumorale, agendo da inibitore delle topoisomerasi II e intercalatore del DNA, induce apoptosi cellulare. Il farmaco viene incapsulato con un rapporto corrispondente al 20% della totalità di HSPC. La funzionalizzazione esterna dei liposomi con la *porzione F(ab)'* di *Trastuzumab* determina il binding specifico con HER2. L'anticorpo subisce un'iniziale digestione enzimatica ad opera della pepsina, ottenendo *F(ab)₂*, il quale viene poi ridotto, per ottenere il singolo frammento.

Il frammento F(ab)' viene coniugato, nel suo gruppo tiolico libero, al polimero *Mal-PEG-DSPE/Mal-PEG-DSPE_n* e successivamente inserito nella superficie dei liposomi grazie alla tecnica della *post-insertion*. Una volta raggiunte le cellule tumorali, i liposomi dotati di F(ab)' riconoscono HER2, e in seguito al binding vengono internalizzati, e rilasciano doxorubicina.

Ogni formulazione è stata caratterizzata con *Dynamic Light Scattering (DLS)* e *microscopio a trasmissione elettronica (TEM)*: tutte le formulazioni presentano una buona polidispersività e una dimensione compresa tra i 90-110 nm e una morfologia comune al microscopio, assumendo la caratteristica forma a “*chicco di caffè*” in seguito a incapsulazione del farmaco.

La presenza dell'anticorpo in superficie viene verificata grazie alla tecnica *dell'SDS-PAGE Silver Staining*, e quantificata con *micro-BCA*.

La stabilità delle formulazioni SL/SIL è stata valutata per una durata di 60 giorni, nel buffer di conservazione, sia a 4°C che a 25°C, con il fine di valutarne l'eventuale aggregazione. Contemporaneamente, si è valutato il quantitativo di ipotetico farmaco rilasciato, sia in condizioni fisiologiche che tumorali, rappresentate da buffer PBS 1x pH=7,4 e pH=5,5, rispettivamente, grazie ad una analisi spettrofluorimetrica basata sulla fluorescenza della Doxorubicina. Tutte le formulazioni si sono dimostrate stabili sia in termini di resistenza all'aggregazione, sia in termini di rilascio precoce del farmaco.

La citotossicità in vitro è stata valutata mediante *ATPlite assay*, su cellule di carcinoma ovarico HER+ (*SKOV3*) e HER- (*MDA-MB-231*) con il fine di verificare se il PEG superficiale di dimensione ridotta di SL/SIL_{misti} riduca l'ingombro sterico e garantisca un miglior riconoscimento di HER2 da parte di F(ab)'. Il riconoscimento e l'internalizzazione è stata valutata tramite microscopia confocale in live, previa inserzione del colorante Vybrant® DiD. (Thermo Fiaher) sulla superficie dei liposomi.

Infine, è stato condotto uno studio di opsonizzazione sulle formulazioni per valutare la capacità stealth del polimero superficiale in grado di difendere il bilayer fosfolipidico dall'adsorbimento delle proteine corona plasmatiche. Esse sono infatti responsabili dell'immunità innata dell'ospite e richiamando il sistema immunitario attivano la funzione di fagocitosi nei confronti dei sistemi liposomiali.

INTRODUZIONE

1. CANCRO

Con il termine “cancro” e “tumore”, si intende una condizione patologica contraddistinta dalla proliferazione non regolata di cellule che hanno la capacità di insinuarsi nei normali organi e tessuti dell'organismo modificandone la struttura e il funzionamento. Si definisce *cancerogenesi* l'insieme dei processi biologici che portano all'evoluzione della cellula cancerosa, come conseguenza di mutazioni genetiche che alterano l'equilibrio tra riproduzione e morte cellulare. Sono detti *protooncogeni* i geni che hanno il compito di stimolare la crescita cellulare, *oncosoppressori* i geni che inducono apoptosi, in presenza di un danno cellulare consistente. Un'alterazione del ruolo di questi geni porta ad una perdita di regolazione proliferativa e favorisce la crescita tumorale.

La cancerogenesi indotta da agenti chimici e fisici, si contraddistingue come un processo multifasico articolato in tre fasi ben distinte, di durata variabile (Figura 1.1):

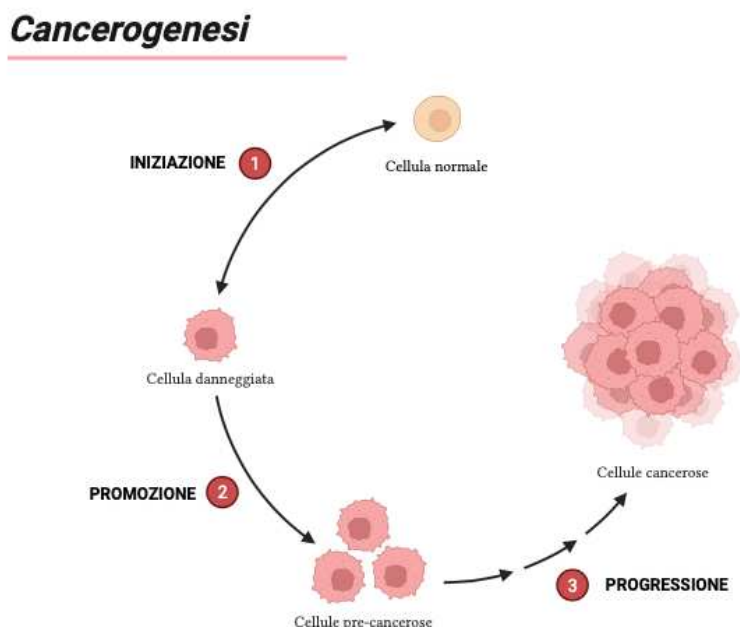


Figura 1.1 rappresentazione delle fasi della cancerogenesi

La prima fase è chiamata *iniziazione*, nella quale il cancerogeno provoca mutazioni nella struttura di uno o più geni che regolano il ciclo cellulare, a favore della maggiorata crescita cellulare (*mutazione protooncogeni*) e inibizione della repressione proliferativa (*mutazioni oncosopressori*) (Figura 1.2)

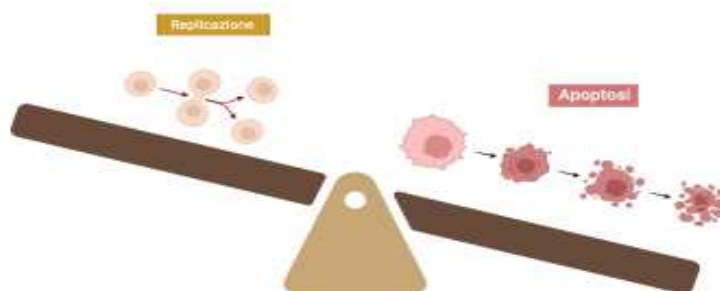


Figura 1.2 Squilibrio tra geni regolatori della crescita cellulare

Successivamente, un'agente promotore, co-cancerogeno, favorisce la proliferazione delle cellule, definendo la fase di *promozione*, reversibile se l'agente stesso viene eliminato. In questa fase le mutazioni vengono stabilizzate e trasmesse alle cellule figlie. Le cellule che sopravvivono presentano fondamentali caratteristiche come elevata capacità replicativa, perdita dell'inibizione da contatto e maggior apporto di sangue e nutrienti. L'ultima fase è la *progressione*, nella quale avviene la totale acquisizione del fenotipo tumorale, grazie alla comparsa di ulteriori mutazioni, che rendono la proliferazione cellulare autonoma e incontrollata.

1.1 Tipologie di cancro

In generale, i tumori vengono classificati, sulla base dei possibili esiti, in due tipologie:

-*Tumori benigni*: la lesione non è pericolosa per la vita, cresce in maniera relativamente lenta e non dissemina attraverso l'organismo. Le cellule delle neoplasie benigne mantengono parzialmente gli attributi morfologico funzionali del tessuto di origine;

-*Tumori maligni*: generalmente costituiti da cellule diverse da quelle originali sia nella forma che nella funzione, sono dotate di gradi di differenziamento progressivi. Le cellule

delle neoplasie maligne hanno elevata invasività e capacità di sviluppare metastasi. Una massa tumorale secondaria si può sviluppare separatamente dal tumore primario da cellule separate e trasportate in altri reparti. Queste cellule possono essere trasportate attraverso i vasi sanguigni o linfatici.

1.2 Cancro ovarico

Il tumore dell'ovaio è una patologia piuttosto aggressiva che colpisce le ovaie. Queste, insieme a utero, tube di Falloppio e vagina rappresentano l'apparato genitale femminile. Il cancro dell'ovaio è dovuto alla proliferazione incontrollata delle cellule dell'organo, il più delle volte le cellule epiteliali (ovvero non quelle che producono gli ovuli). Anche le cellule germinali e quelle stromali, gli altri due tipi cellulari presenti nell'ovaio, possono però essere all'origine di un tumore².

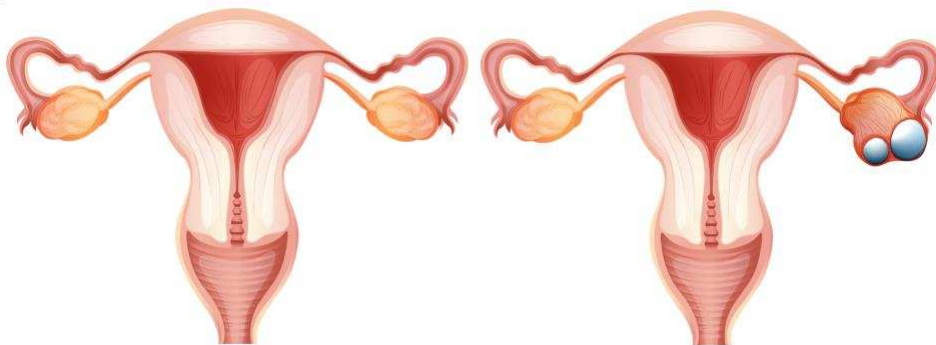


Figura 1.2.1 Differenza tra ovaie sane (sinistra) e affette da tumore (destra)

Il tumore ovarico è ancora oggi uno dei “maggiori killers” tra le neoplasie ginecologiche ed occupa il decimo posto tra tutti i tumori femminili (Figura 1.2.1). L’elevata mortalità associata a questo tumore è attribuibile a molti fattori tra cui: una sintomatologia aspecifica e tardiva e l’assenza di strategie di screening validate che consentano di effettuare una diagnosi precoce. Tra le condizioni di rischio maggiormente correlate allo sviluppo del cancro ovarico si annoverano fattori endocrini legati alla stimolazione ovarica, fattori familiari e genetici legati alla presenza di un’alterazione di uno tra i due geni BRCA 1 e BRCA2 che predispongono ad un rischio incrementato di sviluppo di tumori ovarici, mammari ed altre neoplasie.

I tumori germinali dell'ovaio costituiscono il 15-20% delle neoplasie ovariche, sono maligni solo nel 5% dei casi, e solitamente diagnosticati nel 40-60% dei casi in età inferiore a 20 anni. Le forme epiteliali, al contrario, sono più frequenti (60% dei casi) e colpiscono donne sia in età riproduttiva che post-menopausale³ (Figura 1.2.2).

OVAIO	
Incidenza	Nel 2020, sono state stimate circa 5.200 nuove diagnosi. Le stime per il 2021 non sono disponibili. Le stime per il 2022 non sono disponibili
Mortalità	Nel 2021, sono stimati 3.200 decessi. Le stime per il 2022 non sono disponibili
Sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi	43%
Probabilità di vivere ulteriori 4 anni condizionata ad aver superato il primo anno dopo la diagnosi	55%
Prevalenza	Sono 49.800 le donne viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore dell'ovaio

Figura 1.2.2 Tabella riassuntiva dei dati relativi al tumore ovarico in Italia, nel 2020.

Fonte: I numeri del cancro in Italia 2022; Fondazione AIOM³

1.3 Classificazione dei tumori ovarici

I tumori ovarici vengono classificati in termini di *vie di sviluppo*^{4 9}:

- I tumori di *tipo I ad alta differenziazione* (basso grado) derivano da precursori comuni, inclusi tumori borderline e cistoadenomi. Questi tumori mostrano una prognosi più favorevole rispetto alla categoria di *Tipo II*, ma rispondono a malapena alla chemioterapia.
- I tumori di *tipo II* (alto grado) comprendono tumori sierosi, endometrioidi, mucinosi e a cellule chiare altamente differenziati che originano da tumori benigni e sono spesso rilevati come tumori in stadio iniziale. Questi tipi di cancro si sviluppano rapidamente senza lesioni note o morfologicamente visibili.

Ogni sottotipo è caratterizzato da uno specifico modello molecolare. Le variazioni genetiche tra i tumori sierosi di *tipo I* e di *tipo II* riflettono le loro variazioni morfologiche: ad esempio, i tumori di tipo I sono geneticamente stabili.

I tumori ovarici sono classificati anche in base al loro stadio^{5 9}:

-*Stadio I*: il tumore risulta limitato alle sole ovaie (*classificazione FIGO IA-IB-IC*);

-*Stadio II*: il tumore è esteso ad una o entrambe le ovaie, con diffusione pelvica, comprende l'estensione e/o metastasi all'utero e/o alla tube ed altri tessuti pelvici; (*classificazione FIGO IIA-IIB-IIC*)

-*Stadio III*: tumore di una o entrambe le ovaie con diffusione peritoneale esterna alla pelvi e/o linfonodi retroperitoneali. Metastasi alla superficie epatica. Il tumore è limitato alla pelvi, ma con diffusione neoplastica istologicamente documentate al piccolo intestino o all'omento; (*classificazione FIGO IIIA-IIIB-IIIC*)

- *Stadio IV*: tumore di una o entrambe le ovaie con metastasi a distanza; versamento pleurico. Presenza di metastasi epatiche intraparenchimali. (*classificazione FIGO IV*)

Infine, il cancro ovarico viene classificato in base al sottotipo istologico in:^{6 7 8 9}

- *Tumore epiteliale*: questi tipi di cancro rappresentano la quota maggiore delle neoplasie maligne ovariche. Sono classificati in base alla differenziazione delle cellule tumorali.
- *Tumori sierosi*: il cistoadenoma sieroso appare macroscopicamente come un'unica cisti con una superficie liscia piena di liquido sieroso. In questo tipo di tumori sono abbastanza comuni regioni solide o focolai di sanguinamento e necrosi.
- *Tumori mucinosi*: questi tumori sono tipicamente i tumori ovarici più grandi a livello macroscopico. Di solito sono tumori cistici uniloculari con una parete sottile e liscia e piena di fluido mucinoso acquoso. Questi tumori sono spesso associati all'endometriosi.
- *Tumori endometrioidi*: questi tumori si identificano per la presenza di parti stromali ed epiteliali. Piccole macchie e chiazze rosse, blu e marroni, insieme a cicatrici e spesse aderenze fibrose, sono i segni distintivi dell'endometriosi ovarica. Questi tumori sono masse solide con consistenza morbida, compatta o fibrosa.

- *Carcinosarcoma*: è una neoplasia che presenta una componente epiteliale e mesenchimatica.
- *Tumori a cellule chiare*: le cellule chiare hanno un alto contenuto di glicogeno citoplasmatico. Questo è il secondo tipo più comune di cancro ovarico. L'aspetto esterno dei tumori a cellule chiare è simile a un adenofibroma con una significativa componente stromale. Sono tipicamente tumori solidi.
- *Tumori a cellule transizionali (tumori di Brenner)*: i tumori di Brennero si distinguono per nidi e colonne di cellule epiteliali di tipo transitorio che assomigliano alle cellule uroteliali. Questi nidi tumorali sono dispersi su uno stroma fibromatoso predominante. I tumori benigni di Brenner sono di piccole dimensioni e sono formati da tessuto compatto e fibromatoso di colore giallo pallido, grigio-bianco o bianco e hanno un aspetto ben definito.
- *Tumori epiteliali misti*: sono frequenti le miscele dei diversi sottotipi epiteliali.
- *Carcinoma indifferenziato*: non mostra differenziazione o contiene solo rare aree minori di differenziazione. In questo tipo di tumori prevalgono cellule di grandi dimensioni, mitosi e atipie cellulari marcatrici. Questo è associato alla prognosi peggiore di tutti i carcinomi epiteliali a causa della sua rapida crescita e della frequente manifestazione di disseminazione extraovarica.

1.4 Recettore HER-2

L'abbreviazione HER-2 si riferisce al recettore per il fattore di crescita umano (*Human epidermal growth factor receptor*), conosciuto anche con altri acronimi come *ErbB2*, *c-erbB2* o *HER2/neu*. Esso appartiene alla famiglia *HER/Erb*, costituita da proteine recettoriali di membrana a natura tirosin-chinasica, di cui fanno parte altri recettori come *EGFR (ErbB1)*, *HER3 (ErbB3)* e *HER4 (ErbB4)*¹⁴. I recettori appartenenti alla famiglia HER giocano un ruolo chiave nelle vie di trasduzione del segnale che portano alla crescita e al differenziamento cellulare. Si trovano espressi a livello del sistema nervoso, nei muscoli, nelle ossa, nel cuore, nei polmoni e nell'intestino. HER-2 è una glicoproteina di

membrana, dal peso di 185 kDa, codificata dal protooncogene HER-2 situato nel braccio lungo del cromosoma 17, alle coordinate 17q21-q22. Il recettore è costituito da una porzione extracellulare, deputata al *binding*, contenente la porzione N-terminale, una porzione lipofila transmembrana, e un dominio tirosin-chinasico. Quest'ultimo costituisce la porzione C-terminale responsabile dell'auto-fosforilazione dei domini chinasi intracellulari, fondamentali per la trasduzione del segnale. Tali recettori si trovano in forma monomeriche e solamente in seguito al *binding* con il ligando si attivano per la dimerizzazione, aumentando la loro stabilità. Possono formare omodimeri o eterodimeri a seconda che l'interazione avvenga con un recettore appartenente alla stessa famiglia o meno. (Figura 1.5)

Ciascun recettore è costituito a livello extracellulare da quattro domini (I II III e IV). I sottodomini I e II formano un sito di legame per i potenziali ligandi, mentre i sottodomini III e IV sono coinvolti nel processo di dimerizzazione. La formazione di legami idrogeno tra una porzione del dominio I e III, nasconde, in assenza di ligando, "il braccio di dimerizzazione" localizzato nel dominio II. Esso è caratterizzato da una struttura *beta-Herpin*, sporgente dal dominio per connettersi con il braccio di dimerizzazione di un altro recettore. Solamente in seguito al *binding* con i ligandi, avviene la rottura dei legami idrogeno e la liberazione del braccio di dimerizzazione.

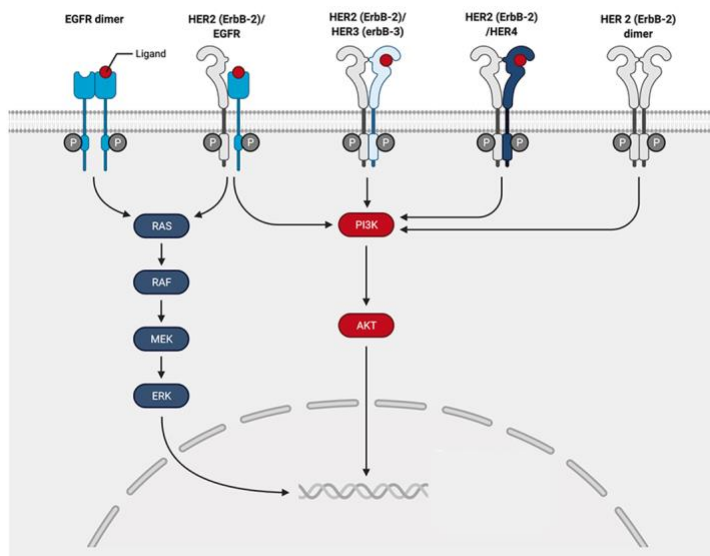


Figura 1.5 Dimerizzazione del recettore HER-2 e conseguente pathway di trasduzione

In seguito alla dimerizzazione, si induce una modifica conformazionale al dominio intracellulare, il quale diventa competente all'esecuzione dell'auto-fosforilazione a livello della tirosina, originando la trasduzione del segnale.

1.5 Pathway Intracellulare mediato da HER-2

La sovraespressione di HER-2 sulla membrana cellulare, favorisce e amplifica la dimerizzazione con altri monomeri della famiglia, causando la deregolazione delle vie di segnalazione. I *pathways* intracellulari si distinguono in via della segnalazione mediata da *PI3K/AKT* (*Fosfoinositide 3-chinasi/ protein chinasi*) e la cascata di segnale di *RAS/RAF/MEK/ERK*. Il risultato, in entrambi i casi, è un'aumentata sopravvivenza cellulare, progressione del ciclo cellulare e conseguente attività proliferativa. (*Figura 1.5; Paragrafo 1.5*).

La combinazione HER-2 con HER-3 è la più pericolosa. Si ottiene, infatti, un potente segnale di mitosi. In seguito alla formazione dell'eterodimero, il dominio intracellulare di HER-3 interagisce con la subunità p85 della proteina PI3K, attivando la funzione chinastica e la seguente fosforilazione di AKT. Quest'ultima, fosforilata, attiva a sua volta differenti *pathways*¹⁵:

- attivazione di *mTORC1* (*Mammalia Target of Rapamicina Complex*), un grande complesso proteico serin tirosin-chinastico, il quale promuove la proliferazione cellulare e inibisce l'apoptosi;
- disattivazione di *FOXOs* (*Fork-head box O transcription factor*), i quali fattori, tramite lo stress ossidativo, favoriscono l'apoptosi e la differenziazione cellulare;
- inibizione di *Bcl-2* (*B-cell lymphomas*), con conseguente disattivazione del processo apoptotico;
- Attivazione di *GSK3* (*Glycogen Synthase Kinase-3*), coinvolta nel metabolismo del glicogeno, regolazione del ciclo cellulare e proliferazione.

Lo sviluppo di un processo tumorale con un fenotipo più aggressivo, caratterizzato da incontrollata proliferazione, crescita cellulare e forte invasività, è conseguente alla deregolazione di questi *pathways* intracellulari.

1.6 Tumore Ovarico HER2+

I tumori HER2+ si definiscono per la sovra espressione del recettore HER2, localizzato sulla superficie esterna delle cellule. Nel cancro ovarico l'espressione sovrabbondante di questo recettore porta alla deregolazione della trasduzione del segnale di HER-2 con conseguente rapida crescita cellulare, danno al DNA e aumento della progressività tumorale. La positività HER-2 è molto più elevata nel carcinoma sieroso (29%) e mucinoso (38%) rispetto al carcinoma endometriode (20%) e a cellule chiare (23,1%).¹² La sovra espressione della chinasi HER-2 ha dimostrato di essere associata a una prognosi migliore, poiché sembra essere correlata con un pattern invasivo meno aggressivo. Inoltre, la sovra espressione o amplificazione di HER-2 è collegata a un rischio ridotto di morte e recidiva della malattia.¹³

1.7 Screening e Diagnosi del Cancro Ovarico

Uno dei motivi del fallimento della terapia del carcinoma ovarico è la diagnosi in fase avanzata di malattia. Ancor oggi, infatti, non disponiamo di procedure diagnostiche con adeguata sensibilità e specificità tali da permettere una diagnosi in stadio precoce. In assenza di una efficace strategia di screening, le procedure diagnostiche generalmente adottate per la diagnosi dei tumori epiteliali ovarici prevedono *l'esame clinico*, *l'esecuzione di ecografia pelvica per via transvaginale* e *la determinazione del CA-125* (marcatore tumorale). È noto però quanto sia limitato il valore predittivo di queste indagini: Il *CA-125* risulta positivo solo nel 50-60% delle forme precoci del tumore ovarico e può risultare elevato in altre condizioni patologiche non tumorali specialmente nelle donne in premenopausa.

È per questo che nessuna società scientifica raccomanda, ancor oggi, lo screening del carcinoma ovarico nella popolazione generale.⁹

2. TRATTAMENTO DEL CANCRO OVARICO

2.1 Chirurgia

L'obiettivo della chirurgia dipende dall'apparente diffusione del tumore. Se questo appare limitato all'ovaio o alle ovaie, l'intervento mira ad asportare la massa tumorale e ad eseguire varie biopsie per stabilire la reale diffusione della malattia. È necessario, pertanto, effettuare l'asportazione dell'omento (*omentectomia*), biopsie del peritoneo e dei linfonodi nella pelvi e nell'addome. Alle donne giovani affette da malattia in stadio iniziale e desiderose di avere figli, il chirurgo può proporre un intervento conservativo, preservando almeno un ovaio con la sua tuba e l'utero. Per le pazienti con malattia in stadio iniziale, l'intervento chirurgico è curativo nel 70% dei casi, ma il rischio di recidiva arriva fino al 25-30% nella maggior parte dei casi.⁹

- *Chirurgia per la malattia precoce*: la malattia precoce è classificata come neoplasia confinata all'ovaio (classificazione FIGO stadio I). La *salpingo-ovariectomia bilaterale*, che è il trattamento chirurgico per rimuovere sia le tube di Falloppio che le ovaie, è generalmente curativa, ma è necessario un attento monitoraggio postoperatorio negli anni successivi per identificare la recidiva;¹⁰

- *Chirurgia per malattia avanzata*: la gestione del cancro ovarico avanzato. (classificazione FIGO stadio II/III/IV) è difficile e i tassi di guarigione chirurgica sono rari. In questi casi, la chemioterapia viene somministrata dopo l'intervento citoreducente per eliminare quanto più possibile la malattia.¹⁰

2.2 Chemioterapia

Per ridurre il rischio di ricomparsa del tumore, normalmente dopo l'intervento chirurgico, si consiglia la chemioterapia che è tanto più importante quanto più è avanzato il tumore asportato. Esistono molti schemi chemioterapici, il più frequentemente usato è il trattamento neoadiuvante che prevede la combinazione di farmaci come il *paclitaxel* e il *carboplatino* di cui esistono maggiori casistiche rispetto alle dosi e alla durata dei trattamenti. Il tipico regime chemioterapico consiste di sei cicli, con imaging o

monitoraggio regolare dei livelli di CA-125 utilizzati per valutare la risposta del paziente al piano di trattamento.¹⁰ Esiste inoltre una chemioterapia intraperitoneale a base di *cisplatino*: rispetto alla distribuzione endovenosa, la somministrazione intraperitoneale come trattamento iniziale per il carcinoma ovarico determina un miglioramento del 20-30% sia nei periodi liberi da progressione che in quelli di sopravvivenza globale. In ogni caso, ci sono ragioni per le quali la chemioterapia intraperitoneale non è generalmente accettata: tossicità, e altre complicazioni come aderenze intraperitoneali, infezioni, ecc.¹⁰

2.3 *Trattamento di Seconda Linea*

I maggiori candidati per un trattamento di seconda linea sono quelle donne che, in seguito ai trattamenti precedentemente citati, manifestano recidiva o pazienti i quali non rispondono alla terapia iniziale di base. Per i pazienti platino-sensibili viene somministrata un'associazione platino-taxani. Quest'ultimi sono farmaci antitumorali appartenenti alla classe degli antimitotici. Per gli altri pazienti, invece, si utilizza una mono-chemioterapia a base di diversi antitumorali come: *liposomi pegilati contenenti doxorubicina (LPD)*, *topotecan*, *gemcitabina*, *paclitaxel settimanale*, *etoposide*, *vinorelbina*, *ciclofosfamide orale*.¹¹

Per i pazienti che non possono essere trattati con la chemioterapia, un'ulteriore opzione disponibile è l'uso di agenti ormonali quali: tamoxifene, megestrolo acetato, inibitori dell'aromatasi.

3. NANOMEDICINA

Con il termine *nanotecnologie* si fa riferimento ad una branca della scienza che si occupa dello studio di particelle con diametro compreso tra 1 e 100 nm. L'applicazione di queste tecnologie all'ambito della ricerca clinica e farmaceutica prende il nome di *nanomedicina*. Vengono sfruttate, principalmente, a livello di diagnosi o in ambito terapeutico, come *drug delivery systems*. Le caratteristiche chimico-fisiche e strutturali delle nanotecnologie, essenzialmente in termini di dimensione, rappresentano il reale vantaggio volto alla creazione di carriers molecolari in grado di veicolare un farmaco ad uno specifico sito d'azione, alla concentrazione terapeutica specifica, riducendo i rischi associati. Le nanomedicine sono composte dall'insieme di liposomi, bioconiugati polimerici, micelle, dendrimeri, nanoparticelle metalliche, nanotubi di carbonio e nanocapsule polimeriche.¹⁶ (Figura 3.1)

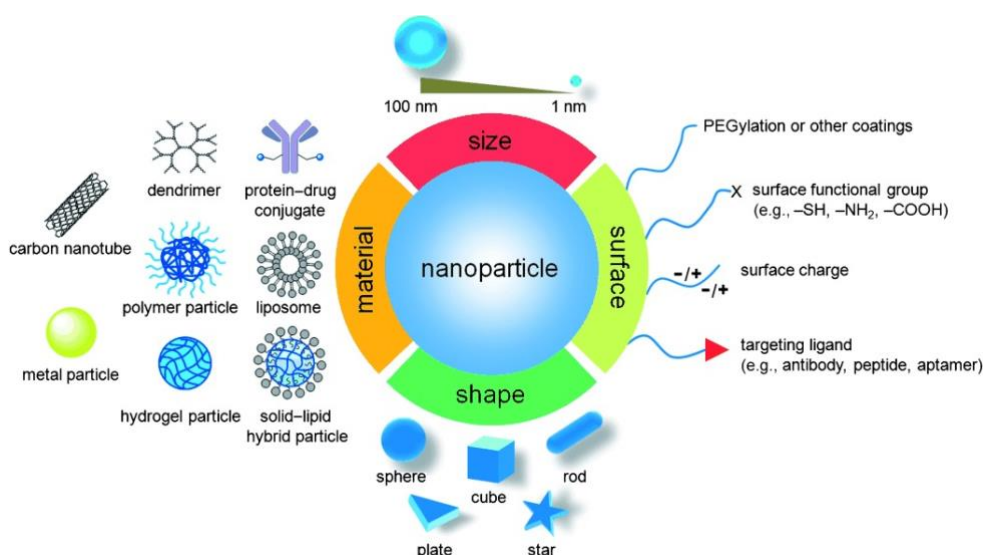


Figura 3.1 Nanoparticelle classificate in base a materiale, dimensione, superficie e forma.

3.1 Sistemi di drug delivery

I sistemi di drug delivery sono piattaforme che fungono da carrier e consentono l'introduzione nell'organismo di una sostanza ad uso terapeutico o diagnostico, migliorando l'efficacia, la stabilità e la sicurezza, regolando la velocità, la modalità, il tempo e il sito di rilascio dell'elemento veicolato. La loro applicazione nella terapia del

cancro ha portato molti vantaggi rispetto alla chemioterapia classica: questi sistemi offrono infatti l'opportunità di migliorare la biodisponibilità, fornire un rilascio prolungato del farmaco, una somministrazione mirata e incrementare la solubilità dei farmaci per la somministrazione sistemica. Riducono inoltre la tossicità delle piccole molecole.

Le loro principali caratteristiche sono riconducibili alla dimensione, che governa la distribuzione *in vivo* del farmaco, garantendo uno specifico rilascio a livello tumorale e una ridotta clearance renale, aumentandone di conseguenza il tempo di *emivita*. La variazione delle proprietà superficiali, altra caratteristica fondamentale, consente di conferire proprietà diverse al sistema. Il rivestimento superficiale con polimeri o tensioattivi modifica l'idrofobicità, aumentando la solubilità nei fluidi biologici, protegge dall'opsonizzazione da parte del sistema immunitario dell'ospite ritardandone, quindi, l'eliminazione. La superficie può essere arricchita con l'utilizzo di molecole, come per esempio gli anticorpi, che garantiscono la specificità di targeting cellulare al fine di ottenere una somministrazione mirata al bersaglio molecolare. Infine, la diversa possibilità di caricamento e rilascio del farmaco, consente una corretta somministrazione, con l'obiettivo di ridurre gli effetti collaterali e aumentare la specificità d'azione.

3.2 Effetto EPR e Targeting Attivo

Grazie alle proprietà specifiche dei tessuti neoplastici, i sistemi di drug delivery esplicano il loro effetto citotossico basandosi su due differenti meccanismi di targeting, passivo o attivo. Il primo si basa sull'*effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention)*, secondo il quale molecole con peso molecolare superiore ai 40kDa si accumulano in elevate e durature concentrazioni all'interno dei tumori solidi. Ciò avviene grazie all'elevata angiogenesi, che aumenta la permeabilità endoteliale, e al ridotto drenaggio linfatico che caratterizza i tumori (Figura 3.2). La perdita della corretta struttura e funzione dell'endotelio favorisce da una parte l'accumulo delle sostanze nutritive che sorreggono la crescita tumorale, dall'altra la permanenza del farmaco nel sito tumorale.

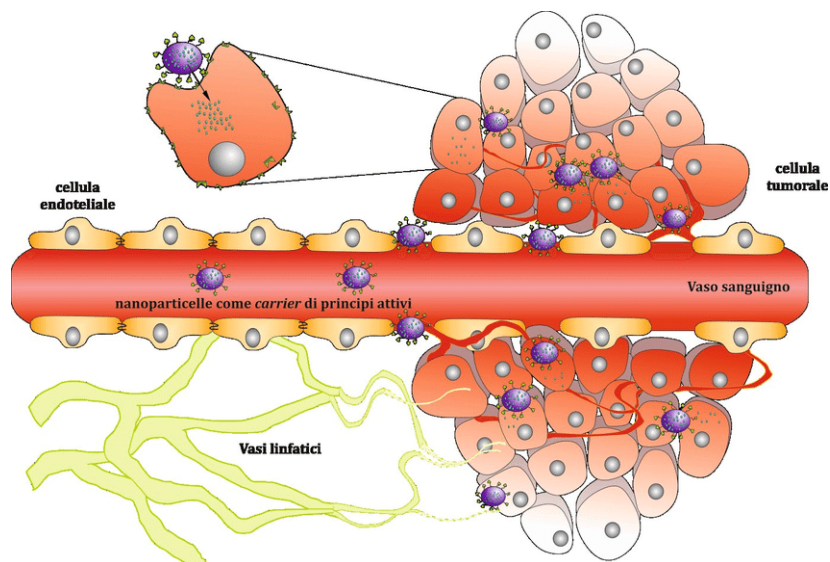


Figura 3.2 Rappresentazione della differenza a livello endoteliale tra tessuto sano e tumorale.

Farmaci citotossici, essendo di piccole dimensioni, si accumulano e permeano indistintamente sia nei tessuti infiammati sia in quelli sani, causando elevati effetti collaterali. Ecco che l'elevata dimensione dei sistemi farmaco-carrier permette quindi il targeting passivo, data la maggior facilità di diffusione nei tessuti infiammati rispetto a quelli sani. I sistemi di drug delivery che invece sfruttano il targeting attivo riconoscono in modo specifico le cellule tumorali, aumentandone l'efficienza terapeutica. Tale targeting può essere ottenuto mediante modifica superficiale del carrier, rendendolo più reattivo al microambiente tumorale o grazie alla funzionalizzazione con ligandi, come peptidi, aptameri, anticorpi, acidi nucleici, carboidrati e altre piccole molecole in grado di riconoscere specificamente i recettori o le proteine sovra espressi nelle cellule tumorali.

17,18

4. **LIPOSOMI**

I liposomi sono strutture vescicolari di forma sferica (Figura 4.1), costituite da fosfolipidi in grado di formare in soluzione acquose un doppio strato (*bilayer*) il quale separa il compartimento interno da quello esterno. I fosfolipidi sono molecole anfifiliche, costituite cioè sia da una porzione idrofila che da una idrofobica. Il *glicerolo*, generalmente legato ad un gruppo fosfato, rappresenta la porzione idrofila. Il *gruppo fosfato* può essere diversamente funzionalizzato con molecole in grado di conferire

proprietà specifiche, come la carica, ai liposomi finali. La porzione idrofobica è formata da due molecole di *acido grasso* legate al glicerolo stesso. Possono essere modificate in termini di lunghezza e saturazione. Un'ulteriore costituente del doppio strato liposomiale è il *colesterolo*, il quale ha la capacità di modulare le proprietà chimico-fisiche e le caratteristiche morfologico-funzionali delle membrane, regolando specificamente la fluidità del bilayer lipidico.

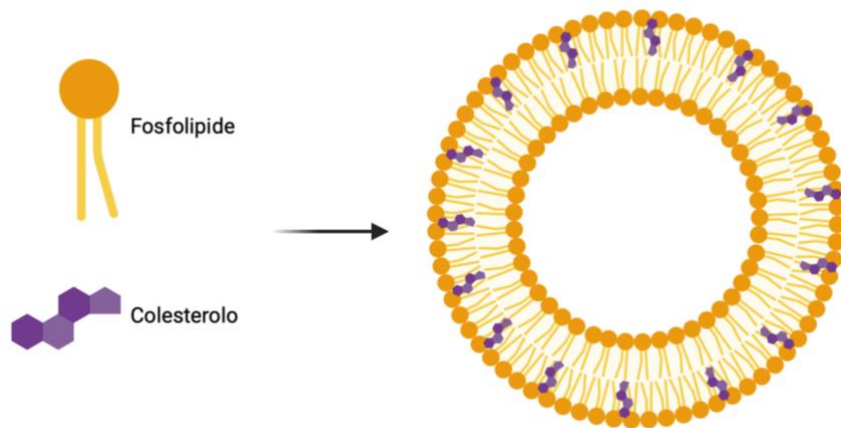


Figura 4.1 Fosfolipidi e colesterolo in ambiente acquoso si arrangiano in sistemi vescicolari chiamati liposomi

4.1 Classificazione

In base alle lamelle costituenti e alle loro dimensioni, i liposomi si classificano in (Figura 4.1.1):

-*Multilamellari (MLVs)*: formati da diversi bilayer, hanno una spiccata porzione idrofobica che li rendono adatti a incapsulare sostanze lipofile. (*Diametro > 500 nm*);

-*Oligolamellari (OLVs)*: ridotto numero di bilayer, dimensione inferiore ai precedenti (*Diametro: 0.1-1 μm*);

-*Unilamellari (ULVs)*: costituiti da una sola lamella che ne conferisce omogeneità, possono essere di diverse dimensioni:

- *Giganti (GUVs)*: elevata capacità di caricamento del farmaco. Parzialmente utilizzati data la loro eterogeneità e le dimensioni troppo elevate per garantire la somministrazione parenterale (*Diametro > 1 μm*)

- *Large (LUVs)*: dotati di elevata capacità di caricare il farmaco; (*Diametro 100 nm-1 μm*)
- *Medium (MUVs)*: con dimensioni ed eterogeneità intermedie (*Diametro 50-200 nm*)
- *Small (SUVs)*: elevata omogeneità. Utilizzati per il delivery di farmaci idrofobici. (*Diametro 20-100 nm*).





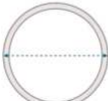
Vesicle Typology		Size	Number of Layers
Small Unilamellar Vesicle (SUV)		20–100 nm	Single
Large Unilamellar Vesicle (LUV)		100 nm–1 μm	Single
Large Multilamellar Vesicle (MLV)		>500 nm	Multiple, concentric
Oligolamellar (Multivesicular) Vesicle (OLV)		100 nm–1 μm	Multiple, not concentric
Giant Unilamellar Vesicle (GUV)		>1 μm	Single

Figura 4.1.1 Classificazione dei liposomi in termini di dimensione e numero di lamelle¹⁹

4.2 Vantaggi e Svantaggi

La natura chimico fisica dei liposomi ne rappresenta il principale vantaggio nell'utilizzo in ambito farmaceutico. La loro composizione rende queste formulazioni altamente biocompatibili e versatili. In termini di *biocompatibilità* i liposomi riducono le reazioni avverse a carico del sistema immunitario, non sono immunogeni, e grazie alla loro *biodegradabilità*, non si accumulano nell'organismo e non determinano tossicità. La composizione fosfolipidica permette loro di essere ottimi carrier sia per sostanze lipofile, che si inseriscono tra le catene idrocarburiche del bilayer, sia di sostanze idrofiliche internalizzate nell'ambiente interno acquoso. Le sostanze anfifiliche, invece, si dispongono tra la cavità interna e il bilayer stesso. La possibilità di modulare la composizione chimica della formulazione, che consente di modificare i liposomi in

funzione della sostanza da veicolare, ne rende molto *versatile* il loro l'impiego come carrier molecolari. Infatti, si può variare la quantità di colesterolo incorporato nel bilayer, la natura dei fosfolipidi, i quali possono modificare le caratteristiche superficiali in termini di carica, oppure variare le dimensioni e il numero di bilayers. Infine, la funzionalizzazione esterna con opportune entità chimiche permette di ottenere un targeting specifico.

Le caratteristiche sopra elencate rendono i liposomi ottimi sistemi di drug delivery. Essi, infatti, trasportano differenti tipologie di substrati, dalle proteine e acidi nucleici a molecole di sintesi. Il vantaggio risiede nella possibilità di aumentare la solubilità di farmaci lipofili, la durata d'azione, la specificità di targeting e la successiva internalizzazione. Le dimensioni governano l'emivita all'interno dell'organismo, si facilita l'extravasazione e il raggiungimento del sito target grazie all'effetto EPR, evitando il metabolismo epatico e la clearance renale prolungando la durata d'azione del farmaco. Proteggono, inoltre, il farmaco dalla degradazione chimica e enzimatica. Tutti questi vantaggi comportano un miglioramento del profilo farmacocinetico del farmaco incapsulato.

4.3 Formulazione dei Liposomi

In base alle caratteristiche chimico fisiche dei liposomi, alle dimensioni richieste, alla natura dell'entità molecolare incapsulata e alle vie di somministrazione, esistono differenti metodologie di preparazione del film lipidico:

-Thin layer evaporation: è il metodo maggiormente utilizzato nella preparazione dei liposomi. Questa tecnica prevede la dissoluzione delle componenti fosfolipidiche e quanto previsto dalla formulazione, in un solvente organico, successivamente rimosso per evaporazione. Il film così formato viene idratato in ambiente acquoso permettendo il rigonfiamento (*swelling*) e l'autoassemblaggio dei fosfolipidi con formazione delle vescicole. Si ottengono così formulazioni caratterizzate da una spiccata lamellarità, la quale viene ridotta tramite il processo di estrusione, al fine di ottenere una formulazione omogenea;

-*Emulsione*: utilizzata a livello industriale con lo scopo di ottenere elevate quantità di prodotto. La fase organica con dissolti i fosfolipidi viene aggiunta alla fase acquosa permettendo la formazione di un'emulsione. Successivamente, viene evaporata la fase organica e quella acquosa rimasta viene filtrata e estrusa.

-*Microfluidica*: due pompe contenenti rispettivamente, la fase organica, con in essa disciolte le componenti lipofiliiche, e la fase acquosa, vengono flussate all'interno di un canale di mescolazione creando i liposomi. La fase organica viene rimossa al termine per evaporazione.

4.4 Caricamento del farmaco

Le modalità con le quali il farmaco viene caricato all'interno del liposoma differiscono in base alla natura chimica e alla solubilità e al coefficiente di ripartizione dell'entità chimica stessa.

Per farmaci idrofilici, altamente solubili in acqua si utilizza la tecnica dell'*incapsulazione*, la quale prevede la dissoluzione del farmaco nel solvente di idratazione con passivo intrappolamento nella fase di autoassemblaggio fosfolipidico. La tecnica del *partizionamento*, invece, si utilizza per farmaci lipofili che si dissolvono nel solvente organico di formazione del film, determinandone la localizzazione nello spazio intra-lamellare.

In questo progetto di tesi viene utilizzata la tecnica di *remote loading* (Figura 4.4) la quale sfrutta la possibilità di acquisizione, da parte del farmaco, di una carica, sia essa positiva che negativa. Durante la fase di idratazione, si ha la formazione di un ambiente interno liposomiale che induce la formazione di una carica nel farmaco. L'ambiente acido, per esempio, può portare alla formazione di un equilibrio tra forma protonata e non, di farmaci contenenti gruppi amminici. Il farmaco in questione, dissolto in un ambiente esterno acquoso, si trova in uno stato di neutralità di carica che ne permette la permeazione all'interno del bilayer fosfolipidico. Una volta a contatto con l'ambiente interno acquisisce una carica che ne riduce drasticamente la lipofilia, impedendone la fuoriuscita attraverso lo strato fosfolipidico.

Il rilascio del farmaco, quindi, avviene solo successivamente alla degradazione cellulare del liposoma, prevenendo la perdita e il rilascio anticipato in circolo, riducendo la possibilità di manifestazione di eventi avversi.

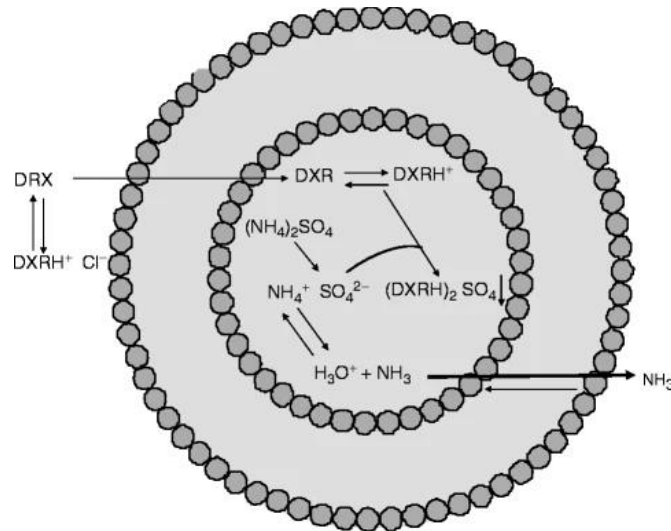


Figura 4.4. Tecnica di remote loading applicata alla Doxorubicina in questo progetto di tesi

4.5 Liposomi ordinari

I liposomi “classici” sono solitamente composti da fosfolipidi ed eventualmente molecole come colesterolo e/o antiossidanti, e sono dotati di tutti i vantaggi sopra descritti (Figura 4.5). Presentano però diverse limitazioni, essi infatti tendono all’aggregazione favorendo di conseguenza reazioni immunologiche. La loro superficie può, inoltre, essere facilmente riconosciuta dalle *opsonine*, nel processo di opsonizzazione, le quali favoriscono il riconoscimento da parte del *RES* (*Reticular Endothelial System*). Quest’ultimo fa parte del sistema immunitario, ma è privo di una propria sede anatomica contraddistinta all’interno dell’organismo. Le cellule che lo compongono svolgono un’azione fagocitaria nei confronti di substrati riconosciuti come non-self. Il RES riconosce quindi il liposoma e può dar luogo ad una reazione immunitaria indesiderata. Inoltre, data la natura costituente dei liposomi, può verificarsi un’interazione con alcune glicoproteine circolanti, come HDL e/o LDL, o altre membrane biologiche, in grado di destabilizzare il doppio strato fosfolipidico e determinare un rilascio prematuro del farmaco, con annessa tossicità.

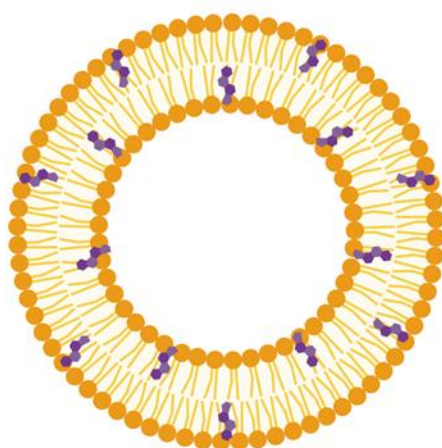


Figura 4.5 Liposoma ordinario costituito da un bilayer fosfolipidico e da colesterolo (in viola)

Diverse soluzioni sono state adoperate per risolvere questi aspetti, con l'obiettivo di migliorarne la stabilità e la specificità d'azione, riducendone le avversità a carico dell'organismo. In particolare, sono state sviluppate formulazioni più specifiche: *liposomi stealth* e *superstealth*, *immunoliposomi stealth* e *superstealth*, e *liposomi cationici*. I primi due, trattati in questo progetto di tesi, hanno la peculiarità comune di essere dotati di *polietilenglicole (PEG)* sulla superficie, in grado di fornire diversi vantaggi d'uso, successivamente citati. I liposomi carichi, invece, dotati di carica superficiale, favoriscono la stabilità del bilayer, riducendo l'uptake da parte del RES e diminuendo i fenomeni di aggregazione.

4.6 *Liposomi Stealth*

Una delle strategie formulative maggiormente utilizzate in ambito farmaceutico per superare le problematiche precedentemente descritte, consiste nella preparazione di liposomi che presentano sulla loro superficie un polimero idrofilico in grado di "nascondere" il carrier dal riconoscimento ed eliminazione da parte del RES. Lo stesso polimero diminuisce, grazie all'ingombro sterico, l'interazione con le proteine plasmatiche e l'aggregazione. Il volume idrodinamico aumenta in seguito al rivestimento polimerico, aumentando l'efficacia terapeutica e garantendo un tempo di emivita

maggiore. I liposomi caratterizzati dalla presenza di polietilenglicole (PEG), vengono comunemente chiamati “liposomi stealth” (Figura 4.6), grazie alla loro abilità di nascondersi al sistema immunitario.²⁰

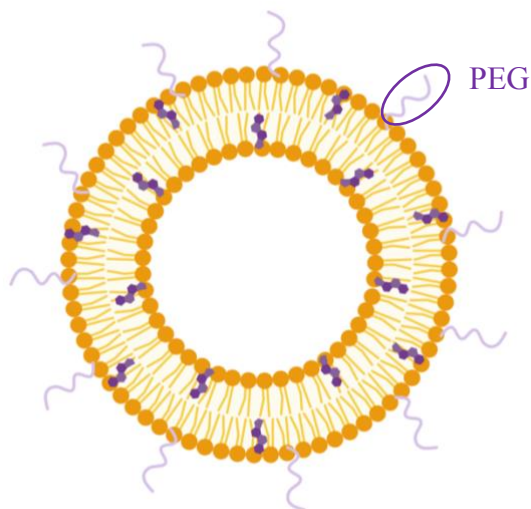


Figura 4.6 Liposomi stealth caratterizzati dalla presenza in superficie di PEG

4.7 Polietilenglicole (PEG)

Il polietilenglicole (PEG), date le sue caratteristiche chimico-fisiche, e soprattutto grazie alla sua elevata biocompatibilità, è il polimero maggiormente utilizzato per formulazioni farmaceutiche in vivo. L'approvazione da parte della FDA (Food and Drug Administration) ne certifica la sua vasta applicabilità, la non tossicità e la bassa immunogenicità. Il PEG è costituito da unità monomeriche (Figura 4.7.1)

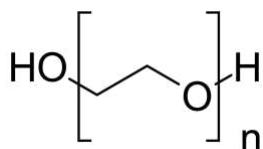


Figura 4.7.1 Unità monomerica costitutiva del PEG. “n” = unità ripetitive

ripetitive, di numero variabile, che ne conferiscono la natura anfifilica e la solubilità sia in ambiente organico che acquoso. Grazie alla natura del monomero costituente, il PEG

è dotato di inerzia chimica. Sono minime, quindi, le interazioni con le proteine plasmatiche e le componenti cellulari, l'adsorbimento e l'adesione. L'unità monomerica è in grado di legare a sé tre molecole di acqua, garantendo così un elevato volume idrodinamico al polimero. Data la sua non-biodegradabilità risulta quindi importante regolarne la polimerizzazione e le dimensioni. Catene con elevato peso molecolare, infatti, possono essere eliminate per via epatica, causandone l'accumulo e insorgere di tossicità.²¹

Esistono diverse metodologie di coniugazione delle catene polimeriche al liposoma: tramite la formazione di un legame covalente tra due gruppi funzionali, rispettivamente del PEG e del liposoma, tramite adsorbimento superficiale oppure coniugazione del polimero con una porzione lipidica in grado di intercalarsi nel bilayer liposomiale.

In questo progetto di tesi viene utilizzato un prodotto commerciale, il quale prevede la funzionalizzazione del PEG con una o più molecole di *DSPE* (*distearil fosfatidil etanolamina*), in grado di ancorarsi al bilayer fosfolipidico, grazie alle interazioni idrofobiche. (Figura 4.7.2).

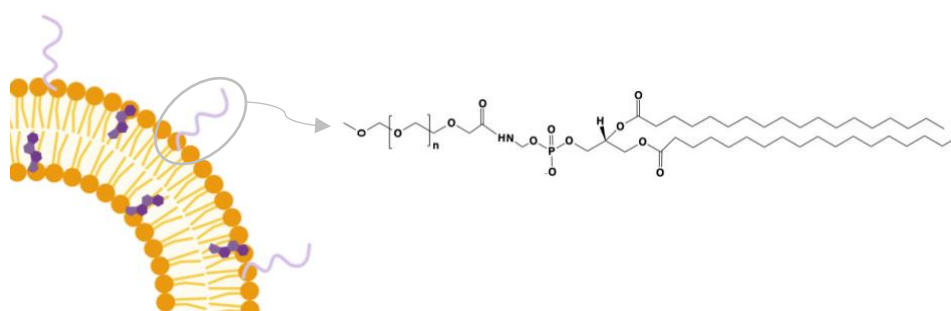


Figura 4.7.2 Liposoma Stealth con MeO-PEG-DSPE che si intercala nel bilayer fosfolipidico

I vantaggi nell'utilizzo di questo polimero sono riconducibili alla formazione di una *barriera superficiale*, la quale offre notevoli benefici. Favorisce la stabilità riducendo la tendenza all'aggregazione e all'adsorbimento. Inoltre, è ridotta l'azione di opsonizzazione delle proteine plasmatiche e il riconoscimento da parte del RES.

4.8 Liposomi Super Stealth

Una soluzione volta a sopperire alle problematiche citate, è la creazione di *liposomi super stealth*. Essi sono caratterizzati dalla presenza di un *dendrone* di PEG, grazie alla funzionalizzazione della singola catena di *mPEG* con diverse molecole di DSPE. Il dendrone è preparato grazie all'utilizzo di *acido β -glutammico (β -Glu)* in grado di formare una ramificazione tra la catena di mPEG e le molecole di DSPE. La presenza del dendrone, e di molteplici molecole di DSPE, aumenta la possibilità di interazioni idrofobiche con il bilayer liposomiale, incrementando notevolmente la stabilità delle formulazioni. Si ottengono quindi diverse formulazioni di liposomi super stealth, le quali si differenziano per il numero di molecole di DSPE formanti il dendrone.²² In questo progetto di tesi sono stati utilizzati dendroni con doppia molecola di DSPE, ossia *MeO-PEG-DSPE₂*, formanti *SSL₂* e *SSIL₂*. (Figura 4.8)

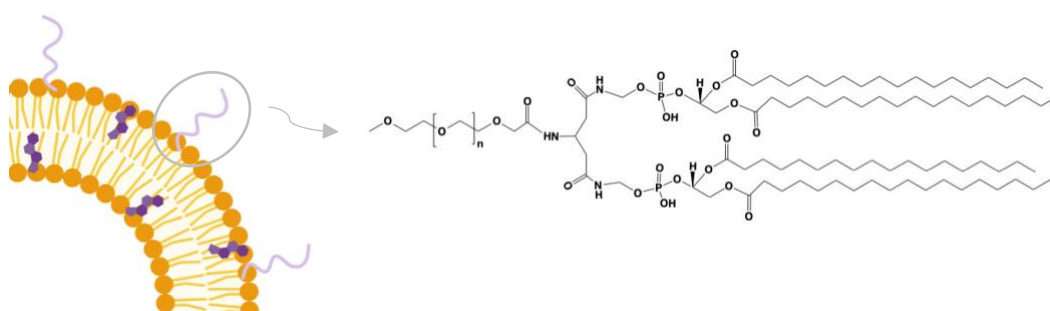


Figura 4.8 Liposoma Super Stealth con MeO-PEG-DSPE₂, che si ancora più tenacemente al bilayer liposomiale

4.9 Doxorubicina

In questo progetto di tesi, il farmaco incapsulato all'interno delle formulazioni liposomiali è la *doxorubicina (DXR)*. (Figura 4.9) Essa è un farmaco antineoplastico, appartenente alla famiglia delle antracicline. La sua citotossicità si concretizza tramite due differenti meccanismi. Nel primo caso la *doxorubicina* agisce come *inibitore delle Topoisomerasi II*, stabilizzando il complesso enzimatico con il DNA, in seguito al taglio di entrambi i filamenti di DNA. In questo modo si impedisce la loro riparazione e si compromette la struttura e la funzione del DNA neosintetizzato. In secondo luogo, la

doxorubicina è in grado di *intercalarsi* tra le coppie di basi nel solco minore dell'elica del DNA, grazie alle sue strutture aromatiche, costituendo un complesso altamente stabile, che inibisce la duplicazione cellulare.

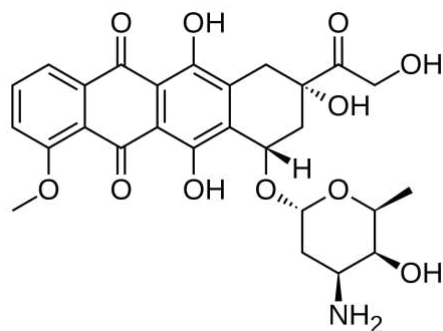


Figura 4.9 Struttura chimica della doxorubicina

La somministrazione di doxorubicina causa diversi effetti avversi a carico del sistema gastrointestinale e renale, inoltre, ha gravi conseguenze cardiотossiche che si concretano in aritmie e scompenso cardiaco. La veicolazione in sistemi di drug delivery, come quelli utilizzati in questo progetto di tesi, ne riduce gli effetti tossici, e migliora il profilo farmacocinetico, prevenendo la precoce perdita del farmaco in circolo e garantendo l'efficacia terapeutica. Il farmaco viene incapsulato sfruttando la tecnica di *remote loading*, precedentemente introdotta (Figura 4.4 Paragrafo 4.4 "Introduzione"). Grazie all'ambiente acido interno, il gruppo amminico primario della doxorubicina acquisisce una carica, determinando precipitazione e impossibilità di fuoriuscire dal bilayer fosfolipidico del liposoma. Ne deriva, quindi, che il rilascio del farmaco avviene solamente successivamente all'internalizzazione e degradazione del complesso liposomiale.

5. TRASTUZUMAB

Gli anticorpi, o immunoglobuline (Ig), sono glicoproteine tetrameriche, le quali vengono prodotte successivamente al riconoscimento di un antigene esterno da parte delle cellule linfocitarie di tipo B. Sono costituite da due catene polipeptidiche pesanti (*Heavy Chain, HC*) da 50kDa ciascuna, e due catene leggere (*Light Chain, LC*) da 25kDa, legate tra loro da un *ponte disolfuro*. La porzione N-terminale, in zona apicale, sia delle catene leggere che pesanti rappresenta la *porzione variabile (V)* dell'anticorpo, adibita al riconoscimento dell'antigene specifico. L'estrema specificità di legame è dovuta alla presenza di porzioni iper-variabili, che contengono la *regione determinante la complementarità (CDR)*. Dal punto di vista funzionale gli anticorpi si suddividono in tre frammenti, due dei quali, identici tra loro, costituiscono la *porzione legante l'antigene (Fab)*. Il restante frammento, denominato *porzione cristallina (Fc)*, è invece responsabile del riconoscimento da parte dei macrofagi e della clearance dell'anticorpo. Queste due distinte porzioni sono congiunte da una regione cerniera che prende il nome di *hing region*, costituita da due *ponti disolfuro*. (Figura 5.1)

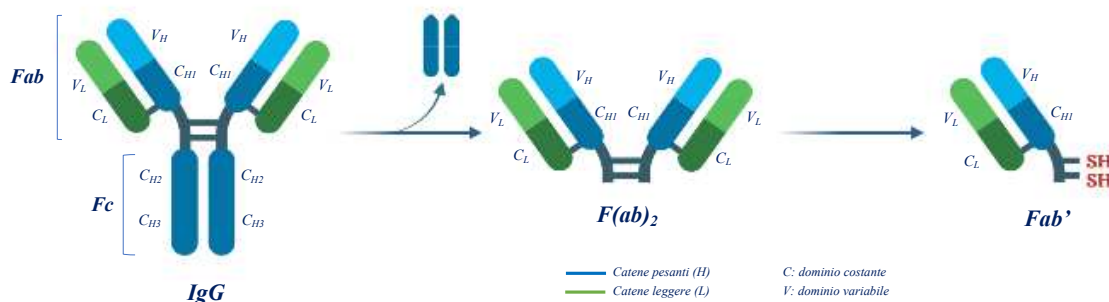


Figura 5.1 Rappresentazione morfologica funzionale di Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin) è un anticorpo monoclonale (IgG) in grado di riconoscere selettivamente il recettore *HER-2 (Human epidermal growth Factor Receptor 2)* in una porzione del suo dominio extracellulare, impedendo il legame con il substrato endogeno e il taglio proteolitico del dominio stesso, bloccando la trasduzione del segnale proliferativo (Figura 1.5, Paragrafo 1.5, "Introduzione")²³

In questo progetto *Trastuzumab (TRS)*, viene preliminarmente digerito dalla pepsina, la quale determina la scissione dell'anticorpo nella porzione C-terminale della regione cerniera, con l'obiettivo di rimuovere la porzione cristallina (Fc) per ridurre il richiamo del sistema immunitario dell'ospite. Si ottiene così il frammento Fab₂, il quale viene in seguito selettivamente ridotto a livello dei ponti di solfuro per formare Fab', grazie all'utilizzo di *cisteamina*. Il frammento Fab' contiene le porzioni riconoscenti l'antigene e due punto gruppi tiolici liberi, i quali possono essere sfruttati per la coniugazione di Mal-PEG-DSPE_n. (Figura 5.2)²⁴. Infine, tramite la tecnica della *post insertion* (Figura 5.3), il coniugato, grazie alla formazione preventiva di micelle, viene inserito nella superficie dei liposomi, sfruttando le interazioni idrofobiche tra le molecole di DSPE e il bilayer fosfolipidico. Si ottiene così un sistema di delivery in grado di riconoscere in maniera specifica il recettore HER-2, che prende il nome di *immunoliposoma stealth*.

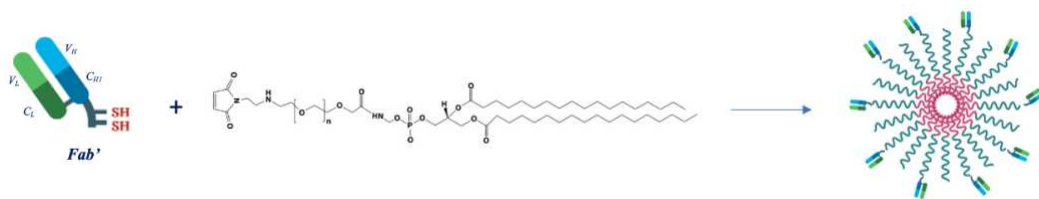


Figura 5.2 Reazione tra Mal-PEG-DSPE e Fab' per formare micelle utilizzate nella formazione di liposomi SIL.

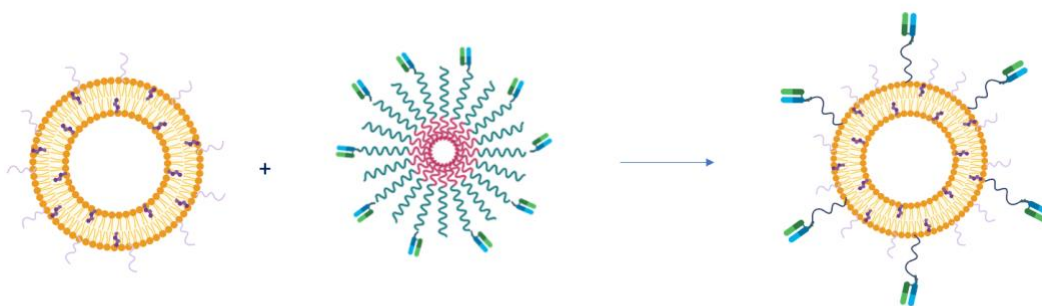


Figura 5.3 Rappresentazione schematica della post-insertion

MATERIALI

HSPC e DSPE per la formulazione dei liposomi sono stati forniti da NOF Corporation (Tokyo, Giappone), colesterolo da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia) e doxorubicina da 21CEC PX Pharma Ltd. (Eastbourne, East Sussex, Regno Unito). Le sospensioni di liposomi sono state concentrate mediante centrifugazione su dispositivi centrifughi Amicon Ultra-15 o Pierce Protein Concentrators PES acquistati da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia) e ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) rispettivamente.

Trastuzumab è stato acquistato dalla Farmacia Vaticana, mentre cisteamina e pepsina da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia). Per la purificazione sono state utilizzate colonne SEC PD-10 Sephadex G-25 e Superdex 200 10/300 GL di GE Healthcare Life Science (Malborough, Massachusetts, USA). Le soluzioni proteiche sono state concentrate mediante centrifugazione su dispositivi centrifughi Amicon Ultra-15 o Pierce Protein Concentrators PES acquistati da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia) e ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). I kit Micro-BCA e BCA Protein Assay per la quantificazione delle proteine sono stati acquistati da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia). I gel prefabbricati per SDS-PAGE sono stati ottenuti da Bio-Rad (Milano, Italia). ProteoSilver™ Silver Stain Kit per la colorazione dell'argento è stato acquistato da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia).

I solventi utilizzati, *cloroformio*, *metanolo*, *etanolo*, *acido acetico*, *Triton X-100*, sono stati forniti da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia). I sali utilizzati per i tamponi: cloruro di sodio, cloruro di potassio, sodio fosfato bibasico, ammonio solfato, EDTA, sodio acetato triidrato, NaOH e sodio carbonato anidro sono forniti anche da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia). Il cloruro ferrico (III) esaidrato e nitrato d'argento da Carlo Erba (Milano, Italia).

Le soluzioni per i buffer sono state filtrate con filtro in acetato di cellulosa Millipore da 0,22 µm (Billerica, MA USA). Per le misurazioni del pH sono stati utilizzati Metrhom (Herisau, Svizzera) 794 Basic Titrino, SevenEasy Mettler Toledo (Columbus, Ohio, Stati

Uniti) o le strisce pH di Tritest Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Neumann-Neander, Germania). I solventi organici sono stati rimossi sottovuoto utilizzando un Rotavapor Buchi R II (Flawil, Svizzera). I kit Micro-BCA e BCA Protein Assay per la quantificazione delle proteine sono stati acquistati da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia). Le misurazioni UV-Vis sono state eseguite con UV-Vis Evolution 201 di Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Lo spettrofluorimetro utilizzato è JASCO FP-600, cuvetta per fluorimetro High Precision Cell made of Quarz SUPRASIL Hellma Analytics. Le pesate sono state eseguite con la bilancia Gibertini mod.E505/2 Semi-Micro Balance da 0,01 mg (Milano, Italia) e Sartorius mod. Entris 2201-15 (Göttingen, Germania).

I liposomi sono stati estrusi utilizzando un estrusore LiposoFast Basic acquistato da Avestin Europe GmbH (Manheim, Germania) attraverso le membrane Whatman® Nuclepore Track-Etched in policarbonato (dimensione dei pori 400-200-100-50 nm) acquisite da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia). Il volume idrodinamico dei liposomi è stato valutato dall'apparato Malvern Instrument Ltd. Zetasizer Nano ZS (Worcestershire, Regno Unito). Le formulazioni liposomiali sono state cromatografate su colonne di desalting PD-10 contenenti resina Sephadex G-25, ottenuta da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), o su colonne contenenti resina reticolata Sepharose CL-4B acquistata da Merck Life Science s.r.l. (Milano, Italia). I liposomi sono stati osservati su un microscopio elettronico a trasmissione Tecnai G2 (FEI) operante a 100 kV e le immagini sono state catturate con una fotocamera digitale Veleta (Olympus Soft Imaging System). I campioni sono stati centrifugati utilizzando una micro-centrifuga ad alta velocità D3024 (Scilogex LLC, Rocky Hill, CT, USA) o una centrifuga Sorvall™ ST 16 (Thermo Scientific).

mPEG-DSPE e mal-PEG-DSPE di NOF Corporation (Tokyo, Giappone). mPEG-DSPE₂, mal-PEG-DSPE₂ sono stati sintetizzati internamente a partire da dendroni precedentemente realizzati.

METODI

1. PREPARAZIONE DI LIPOSOMI STEALTH E SUPER STEALTH

1.1 Thin layer Evaporation

Tutte le formulazioni introdotte sono costituite da *HSPC* (PM=785,1 g/mol) e *Colesterolo* (PM=387 g/mol). Si presenta diversificazione in termini di PEG utilizzato: per la formulazione dei liposomi stealth SL_{misti}/SIL_{misti} è stato usato *mPEG_{2kDa}-DSPE* (PM=2993 g/mol), per i liposomi stealth SL_{5kDa}/SIL_{5kDa} è stato usato *mPEG_{5kDa}-DSPE* (PM=6116 g/mol) e infine per i liposomi super stealth $SSL_2/SSIL_2$ è stato usato *mPEG_{5kDa}-DSPE₂* (PM=7059 g/mol). Tutti i film liposomiali sono stati formulati con un rapporto molare costante tale che:

$$HSPC : Colesterolo : mPEG_n-DSPE_n = 16 : 8 : 1$$

Successivamente alla pesata, i rispettivi componenti (*Tabella 1.1.1-2-3*) vengono solubilizzati in una miscela 3:1 v/v $CHCl_3$: MeOH, direttamente in pallone da 50 mL. La miscela organica viene fatta evaporare in Rotavapor a 40°C e il contenuto essicato o/n al fine di ottenere il film lipidico. Successivamente il film viene ripreso con un volume di idratazione di 1,2 mL di buffer *ammonio solfato* $(NH_4)_2SO_4$ 250mM a pH=5,5. L'idratazione avviene a 60°C per 1 ora, favorendo lo *swelling* dei fosfolipidi. Una volta terminata l'idratazione i liposomi vengono opportunamente diluiti nel buffer di idratazione e successivamente estrusi. Questo step è cruciale per permettere la formazione di liposomi unilamellari (*SUVs*) e creare una sospensione omogenea e poco polidispersa. L'estrusione viene eseguita a 60°C utilizzando filtri di policarbonato di dimensione decrescente (400-200-100-50 nm). I liposomi finali vengono analizzati in termini di dimensioni con il DLS. Successivamente si esegue il cambio buffer per ottenere i liposomi in PBS 1x pH=7,4 grazie all'utilizzo della colonna di desalting PD-10 (*colonna Sephadex G-25*). Infine, si calcola la concentrazione dei liposomi con il saggio di Stewart,

previa opportuna concentrazione con Amicon 100kDa. Si raggiunge una concentrazione finale di 10 mg/ml, ottimale per una buona resa di incorporazione del farmaco.

	PM (g/mol)	Rapporto	Massa (mg)
<i>HSPC</i>	785,1	16	30
<i>Colesterolo</i>	387	8	7,38
<i>mPEG_{2kDa}-DSPE</i>	2993	1	7,14

Tabella 1.1.1 quantitativo di reagenti per SL/SIL_{misti}

	PM (g/mol)	Rapporto	Massa (mg)
<i>HSPC</i>	785,1	16	30
<i>Colesterolo</i>	387	8	7,38
<i>mPEG_{5kDa}-DSPE</i>	6116	1	14,61

Tabella 1.1.2 quantitativo di reagenti per SL/SIL_{5kDa}

	PM (g/mol)	Rapporto	Massa (mg)
<i>HSPC</i>	785,1	16	30
<i>Colesterolo</i>	387	8	7,38
<i>mPEG-DSPE₂</i>	7059	1	16,85

Tabella 1.1.3 Quantitativo di reagenti per SSL₂/SSIL₂

1.2 Incorporazione di Doxorubicina (DXR)

La doxorubicina è il farmaco che viene incorporato all'interno di ogni formulazione; essa agisce come inibitore della proliferazione cellulare secondo i meccanismi

precedentemente descritti (*Paragrafo 3.9 “Introduzione”*). La tecnica utilizzata per permettere l’internalizzazione è quella di *remote loading*, la quale sfrutta la creazione di un gradiente transmembrana di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, per favorire inizialmente la diffusione di DXR all’interno del liposoma e la successiva precipitazione in situ, sotto forma di sale solfato. L’equilibrio è compensato dalla fuoriuscita dal liposoma di ammoniaca (NH_3) e di un protone, derivati dalla dissociazione dell’ammonio solfato. (*Paragrafo 3.4 “Introduzione”, Figura 3.4.1*). Quando la doxorubicina si trova in un ambiente esterno neutro, garantito dal buffer PBS 1x pH=7.4, il gruppo amminico primario non è protonato, ed è quindi abile ad attraversare il bilayer fosfolipidico, data la sua lipofilia. All’interno del liposoma, invece, la presenza del buffer ammonio solfato a pH= 5.5 determina protonazione del gruppo amminico. Il farmaco cristallizza come sale solfato poco solubile, e rimane intrappolato nella cavità interna, determinando il rilascio solo successivamente a distruzione del bilayer a livello intracellulare.

Le condizioni di ottimale incorporazione sono rappresentate dai seguenti rapporti molari tra HSPC e doxorubicina: (*Tabella 1.2*)

	Rapporto	Concentrazione
HSPC	1	10 mg/ml
Doxorubicina (DXR)	0,2	5 mg/ml

Tabella 2.1 Condizioni di incorporazione

Una volta calcolata e pesata la quantità di DXR necessaria, in base al quantitativo di HSPC, si solubilizza il farmaco in una soluzione fisiologica di *NaCl 0,9% p/V* per 15’ in Thermomixer a 40°C, ottenendo una soluzione 5 mg/mL. La seguente incorporazione avviene a 60°C per 1 ora, a 300 rpm. Successivamente si lascia raffreddare a T_{amb} e si purifica in colonna *desalting PD-10* eluendo con PBS 1x pH=7,4 in modo da separare i liposomi dal farmaco libero, il quale, avendo dimensioni inferiori, eluisce con tempi maggiori. La dimensione dei liposomi ottenuti viene verificata tramite DLS (*Paragrafo 4.1.2 “Metodi”*) e la concentrazione di fosfolipidi si determina con il saggio di Stewart.

Per stimare l'efficienza del processo di incorporazione e la quantità di Doxorubicina, si esegue un'analisi spettrofotometrica a 477 nm con $\varepsilon_{DXR} = 13050\text{ l/mol cm}^{-1}$ in metanolo. Si crea una sospensione liposomiale che viene trattata con Triton-X-100 1 M e scaldata a 60°C con 500 rpm di agitazione, per destabilizzare il più possibile il bilayer fosfolipidico e favorire la liberazione di DXR. (Paragrafo 4.2.2 "Metodi")

2. PREPARAZIONE DI $F(ab)'$ -PEG_n-DSPE_n

Il frammento $F(ab)'$ è ottenuto per digestione enzimatica dell'intero anticorpo monoclonale *Trastuzumab* e successiva riduzione dei ponti disolfuro della regione cerniera. Infine, il frammento viene PEGilato per favorirne l'inserimento nel bilayer fosfolipidico.³⁰

2.1 Digestione enzimatica

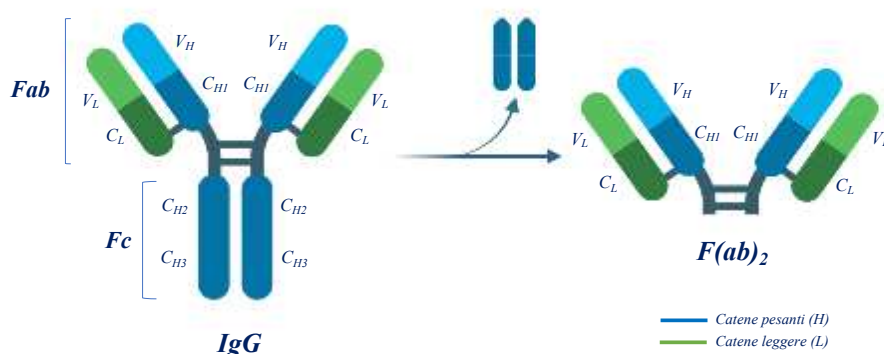


Figura 2.1 Ottenimento, per via enzimatica, della porzione $F(ab)_2$ di TRS.

Inizialmente TRS viene equilibrato in sodio acetato 0,1M, pH=3,8 con l'utilizzo di Vivaspin ® Ultra-15 con membrana da 30kDa. Il pH acido favorisce l'azione della pepsina, enzima responsabile del taglio proteolitico della porzione cristallina dell'anticorpo. In accordo con la Tabella 2.1, alla soluzione di TRS viene aggiunto l'enzima pepsina e la reazione procede a 37°C per 3h in Thermomixer. Il prodotto $F(ab)_2$ ottenuto viene purificato in colonna *Superose 12 10/300 GL*, con eluente PBS 1x pH=7,4, in condizioni isocratiche a flusso di 0,5 mL/min. Il purificato eluito è concentrato e

scambiato con buffer PBS 1x pH=7,4 10 mM EDTA, tramite centrifugazione con Vivaspin ® Ultra-15 30kDa, quantificato tramite il *saggio BCA* (Paragrafo 4.2.3 “Metodi”) e analizzato in SDS-PAGE. (Paragrafo 4.1.1 “Metodi”)

$[TRS]_{finale}$	15 mg/mL
Rapporto TRS : pepsina	1:50
$[Pepsina]$	1,36 mg/ml
V_{finale}	< 500 ul

Tabella 2.1 Condizioni di digestione enzimatica

2.2 Riduzione di $F(ab)_2$ a $F(ab)'$ con cisteamina

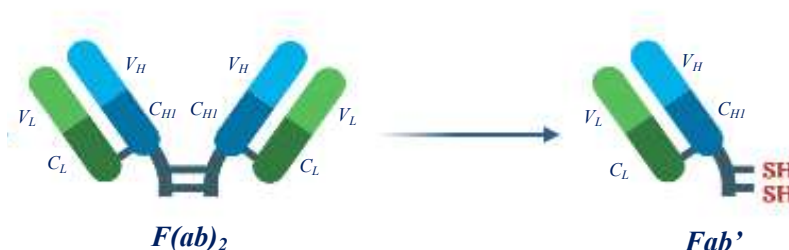


Figura 2.2 Riduzione di $F(ab)_2$

$F(ab)_2$ viene trattato con cisteamina 10mM (PM= 113,61 g/mol) ad una concentrazione finale di 10 mg/mL, in una soluzione di PBS 1x pH= 7,4 10 mM EDTA. La reazione (Tabella 2.2) avviene a 25°C per 45' in Thermomixer a 300 rpm. Al termine della reazione si purifica in colonna *Superdex 200 10/300 GL* eluendo con PBS 1x pH= 7,4 10 mM EDTA. Il campione viene raccolto, concentrato con Vivaspin ® Ultra-15 10kDa e valutato con spettrofotometria UV-Vis. L'assorbanza viene letta tra 280-350 nm e conoscendo il coefficiente di estinzione molare se ne calcola la concentrazione, in accordo con la legge di Lambert-Beer. Sia per TRS che per $F(ab)'$ il coefficiente corrisponde a $\epsilon = 1,35 \text{ mL cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

$[F(ab)_2]_{finale}$	10 mg/ml
Cisteamina	6 mg/ml
V_{finale}	< 500 ul

Tabella 2.2 Condizioni di riduzione $F(ab)_2$

2.3 PEGilazione $F(ab)'$

La reazione di PEGilazione è un'addizione di Michael ³⁵, nella quale il gruppo tiolico libero di $F(ab)'$ reagisce con il gruppo vinilico, elettro-deficiente, della maleimmide con cui è funzionalizzata la catena di PEG. Si forma così un legame tioetere molto stabile. La reazione è uguale per tutte le tipologie di liposomi, l'unica variante è il tipo di PEG utilizzato, lineare o dendrone. Per i liposomi SIL viene utilizzato il PEG lineare *Mal-PEG_{5kDa}-DSPE*, mentre per i liposomi SSIL₂ viene utilizzato il dendrone *Mal-PEG_{5kDa}-DSPE₂*. (Figure 2.3.1 e 2.3.2)

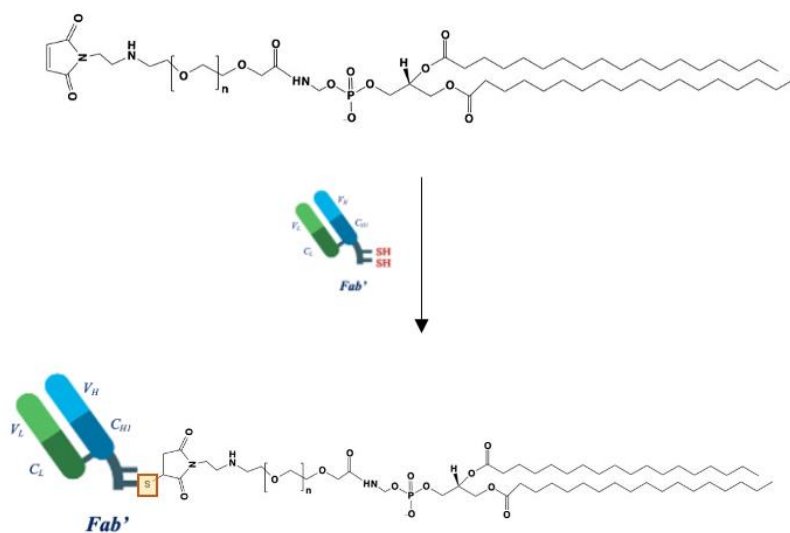


Figura 2.3.1 PEGilazione di $F(ab)'$ con *Mal-PEG_{5kDa}-DSPE* per *SIL_{misti}* e *SIL_{5kDa}*

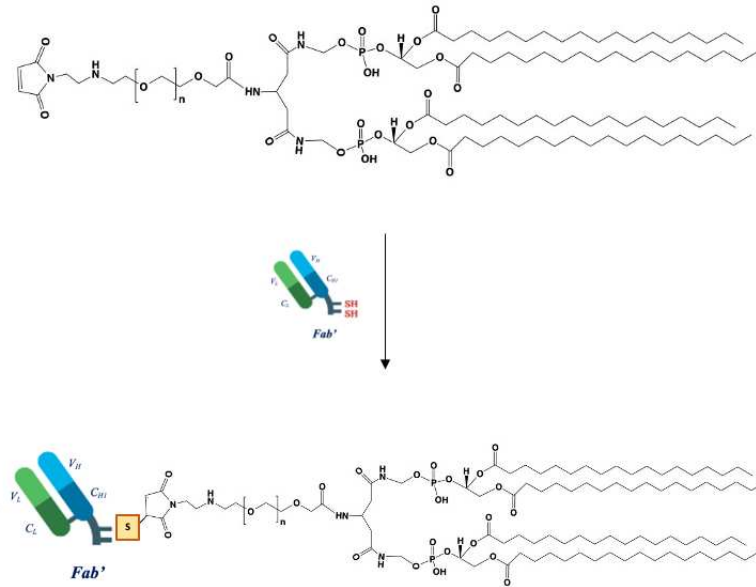


Figura 2.3.2 PEGilazione con Mal-PEG_{5kDa}-DSPE₂ per SSIL₂

I rapporti molari utilizzati sono mostrati nelle rispettive tabelle sottostanti. (Tabelle 2.3.1 e 2.3.2). F(ab)' alla concentrazione di 1 mg/mL viene aggiunto alla soluzione di Mal-PEG_n-DSPE_n in PBS 1x pH=7,4 10 mM EDTA. La reazione procede o/n a 25°C.

I prodotti della reazione vengono caratterizzati tramite SDS-PAGE (Paragrafo 4.1.1) con colorazione allo iodio (*I₂ Staining*) (Paragrafo 4.1.1.3) per verificare che la PEGilazione sia avvenuta correttamente e successivamente con la colorazione al Coomassie Blue per l'identificazione della proteina.

	Concentrazione	Rapporto	Volume
F(ab)'	1 mg/ml	1 eq	500 ul
Mal-PEG_{2kDa}-DSPE	Stock: 2 mM	10 eq	74 ul
Buffer	/	/	181 ul
V_{finale}	/	/	755 ul

Tabella 2.3.1 Reazione di PEGilazione per SIL_{misti} e SIL_{5kDa}

	<i>Concentrazione</i>	<i>Rapporto</i>	<i>Volume</i>
<i>F(ab)'</i>	1 mg/ml	1 eq	500 ul
<i>Mal-PEG_{5Da}-DSPE₂</i>	Stock: 2 mM	10 eq	88 ul
<i>Buffer</i>	/	/	163 ul
<i>V_{finale}</i>	/	/	755 ul

Tabella 2.3.2 Reazione di PEGilazione per SSIL₂

3. PREPARAZIONE DI IMMUNOLIPOSOMI STEALTH E SUPER STEALTH

3.1 Post Insertion

La tecnica della *Post Insertion* consente la formazione di immunoliposomi Stealth e Super Stealth e prevede l'aggiunta dell'agente di targeting per il recettore HER-2 alle superfici dei liposomi preformati, sotto forma di soluzione micellare. Le micelle sono state miscelate con la soluzione di liposomi a una temperatura superiore alla T_m , per facilitarne l'inclusione.³²

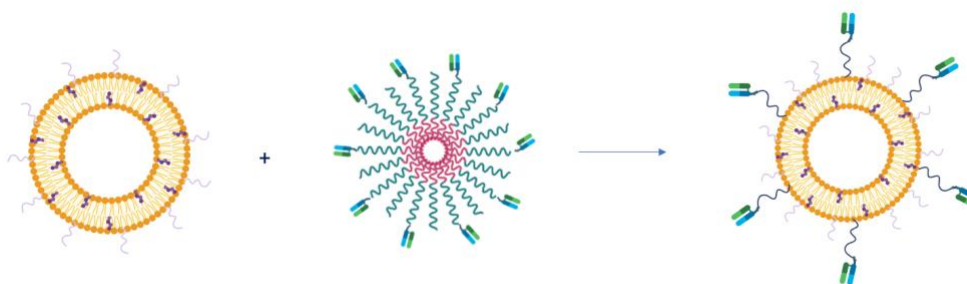


Figura 3.1 Rappresentazione schematica dell'inserzione delle micelle di PEG per i liposomi SIL_{misti}.

La soluzione contenente il derivato PEGilato $F(ab)'$ -PEG_n-DSPE_n, viene fatta reagire, precedentemente alla post insertion, con acido tioglicolico ($\delta=1,325$ g/mL) per bloccare la maleimmide del PEG in eccesso. Quest'ultima infatti, potrebbe reagire in vivo, in

seguito a somministrazione, con i gruppi tiolici delle proteine circolanti. La reazione avviene per 15' a T_{amb} e a 300 rpm. Per la creazione delle micelle, una soluzione di $mPEG_n-DSPE_n$ (secondo *Tabelle 3.1.1 e 3.1.2*) viene preparata alla concentrazione 2mM e aggiunta alla soluzione di F(ab)'-PEG_n-DSPE_n. La miscela di PEG viene poi addizionata ai liposomi. Il processo di inclusione procede per 1 ora alla temperatura di 60°C.

		Rapporto
PEG_{totale}	$\frac{F(ab)'-PEG_{5kDa}-DSPE}{mPEG_{5kDa}-DSPE}$	2% HSPC F(ab)'-PEG : mPEG = 1:3
Acido Tioglicolico		2 eq x Mal-PEG _{5kDa} -DSPE

Tabella 3.1.1 Condizione di inserzione per SIL_{misti} e SIL_{5kDa}

		Rapporto
PEG_{totale}	$\frac{F(ab)'-PEG_{5kDa}-DSPE_2}{mPEG_{5kDa}-DSPE_2}$	2% HSPC F(ab)'-PEG : mPEG = 1:1
Acido Tioglicolico		2 eq x Mal-PEG _{5kDa} -DSPE ₂

Tabella 3.1.2 Condizione di inserzione per SSIL₂

Dopo aver riportato la soluzione a T_{amb} , i liposomi vengono purificati dalle micelle di PEG non inserite tramite cromatografia di esclusione dimensionale. Si utilizza una colonna *CL-4B Sepharose*, utilizzando PBS 1x pH=7,4 per l'eluizione a flusso 1 mL/min. Il liposomi raccolti vengono analizzati al DLS, la concentrazione di fosfolipidi viene quantificata nuovamente con saggio di Stewart e l'efficienza di incapsulazione viene calcolata tramite UV-Vis come precedentemente descritto (*Paragrafo 1.2 "Metodi"*).

4. CARATTERIZZAZIONE DELLE FORMULAZIONI

Tutte le formulazioni di immunoliposomi, SIL_{misti} , SIL_{5kDa} , $SSIL_2$, sono state caratterizzate con saggio del micro-BCA e SDS-PAGE con colorazione all'argento (Silver Staining), per valutare la concentrazione e la presenza dell'anticorpo sulla superficie liposomiale, rispettivamente. La dimensione e la stabilità nel tempo dei liposomi ottenuti (SL_{misti} , SIL_{misti} , SL_{5kDa} , SIL_{5kDa} , $SSIL_2$) è stata determinata con DLS e la morfologia con TEM. Il rilascio di DXR è stato monitorato tramite fluorescenza con spettrofluorimetria.

4.1 Tecniche Strumentali

4.1.1 SDS-PAGE

L'*SDS-PAGE* (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) è una delle tecniche maggiormente utilizzate per la separazione in miscela di proteine e la determinazione dei rispettivi pesi molecolari apparenti.

La tecnica viene eseguita su gel di poliacrilammide, a cui viene applicato un campo elettrico nel quale le proteine cariche assumono una velocità di elettromigrazione differenziale, in funzione del rapporto tra la carica e la massa della proteina. La presenza dell'*SDS* (*sodio dodecil solfato*) rende costante il rapporto. Esso, essendo un detergente anionico, denatura le proteine legandosi agli amminoacidi con rapporto ponderale costante 1:2. In questo modo, l'*SDS* apporta una carica negativa ogni due unità amminoacidiche della catena polipeptidica, rendendo irrilevante la carica specifica della proteina. Ogni proteina, quindi, avrà un numero di cariche negative pari al numero di molecole di detergente legato, proporzionale alla lunghezza della catena. Se tale rapporto carica su massa rimane costante, la velocità di elettromigrazione è la stessa per tutte le proteine. Ne conviene ora che se il rapporto carica-massa è lo stesso per ogni proteina, l'unico metodo per garantire separazione è l'esclusione dimensionale, la quale dipende dalla porosità del Running Gel.

L' SDS-PAGE avviene solitamente in una cella elettroforetica verticale con il polo positivo all'estremità inferiore, in modo da determinare la migrazione verso il basso delle proteine una volta applicato il campo elettrico. Questa tecnica richiede la presenza di due diverse tipologie di gel con composizione e funzioni differenti. Lo *Stacking Gel*, ha una bassa percentuale di poliacrilammide (4%) e permette la focalizzazione delle proteine in seguito al caricamento, aumentando la risoluzione di corsa. Il *Running Gel*, invece, è adibito alla separazione dimensionale dei campioni durante la corsa e ha una percentuale di poliacrilammide maggiore (15%). Entrambi i gel sono costituiti con buffer contenente *glicina* (pI= 6,8), 10% *SDS* e *TRIS-HCl 1,0 M pH=6,8* per lo *stacking gel*, e 1,5 M *pH= 8,8* per il *running gel*.

I campioni analizzati contenenti le proteine vengono preparati con l'aggiunta di *Gel Loading Buffer*, una soluzione composta da *TRIS-HCl pH=6,8* contenente *SDS*, *glicerolo* che ne aumenta la viscosità e il *blu di bromofenolo*, un piccola molecola usata come indicatore di corsa. Il *Running Buffer*, invece, è costituito da *TRIS-HCl pH = 8,3* contenente *glicina* e *SDS*.

Una volta caricati i campioni e applicato il campo elettrico, i componenti carichi negativamente iniziano a correre: gli ioni cloruro (Cl⁻) tendono a muoversi più velocemente, seguiti dai complessi proteina-SDS. La glicina, invece, non si muove perché è neutra, dato che si trova ad un pH pari al suo pI. Si oppone quindi alla corsa degli altri campioni, creando una zona "priva di ioni" corrispondente alla linea di divisione del gel, in cui le proteine si concentrano in una linea sottile. Una volta raggiunto il *Running Gel* (pH>pI), la glicina si carica negativamente e corre veloce verso l'anodo, lasciando liberi di muoversi il complesso proteina-SDS e gli ioni cloruro. Per assegnare il peso molecolare ai campioni caricati si utilizza una soluzione contenente una miscela di proteine standard a PM noto.

Per quanto riguarda in specifico questo progetto di tesi, la quantità normalmente caricata di Trastuzumab, F(ab)₂ e F(ab)' è di 5 µg, mentre per le miscele di PEGilazione, non essendo pure si caricano 10 µg. Si aggiunge un quantitativo pari in volume di GLB 2x non riducente (*Gel Loading Buffer 2x no-reducing*). Il campione in seguito a miscelazione

con vortex, viene denaturato per riscaldamento a 100°C per 3 minuti. La corsa dei campioni, in seguito al caricamento, avviene a 60 mA e 250 V.

4.1.1.1 Colorazione al Coomassie Blue Brilliant

Per evidenziare le proteine si utilizza il colorante *Coomassie Brilliant Blue R250*, un derivato del trifenilmetano dove le funzioni amminiche sono derivatizzate con gruppi benzilsolfonici. Ha una sensibilità del ordine del µg (microgrammo). La colorazione a livello pratico avviene in tre step successivi:

- 1- COLORAZIONE: il gel viene colorato per 3h in una miscela composta da 0,1% di Coomassie Brilliant Blue R250, 50% di metanolo e 10% di acido acetico glaciale. Il colorante ha una struttura idrofobica ma ha anche cariche positive e negative che consentono l'interazione sia con le proteine che con la rete di poliacrilammide. Per questo motivo il gel in questo passaggio diventa completamente blu.
- 2- DECOLORAZIONE: la soluzione decolorante è composta al 40% da metanolo e al 10% da acido acetico glaciale e il processo dura dalle 3 alle 4 ore. In queste condizioni viene rimosso solo il colorante che si lega alla poliacrilammide poiché tali interazioni sono più deboli di quelle con le proteine, le quali vengono quindi evidenziate.
- 3- LAVAGGIO E CONSERVAZIONE: il gel viene lavato e conservato con H₂O milliQ.

4.1.1.2 Colorazione allo iodio (I₂)

Al termine della corsa elettroforetica la colorazione allo iodio (I₂), permette di evidenziare la presenza in miscela di proteine PEGilate e lo stesso PEG libero che non si è coniugato. Grazie alla reattività delle catene di PEG nei confronti di soluzioni di BaCl₂ (5% HCl) e KI si formano dei complessi color bruno. Si aggiungono al gel di corsa, quindi, 5 mL di BaCl₂ e 2 mL di KI. In seguito alla formazione delle bande colorate il gel viene lavato ripetutamente e conservato in H₂O milliQ. Per rimuovere la colorazione applicata si tratta il gel con una soluzione di *destaining* composta da *sodio L-ascorbato* sotto gentile miscelazione.

4.1.1.3 *Colorazione all'Argento*

La colorazione all'Argento (*Silver Staining*) è la più comune analisi qualitativa che viene effettuata sul gel di poliacrilammide per esaltare con elevata sensibilità la presenza delle proteine. La sensibilità è 100 volte maggiore della colorazione al Coomassie e il limite di rilevabilità si aggira al 1 ng/mm² di proteina. La colorazione si esegue seguendo la procedura sotto riportata del kit *ProteoSilver Plus Silver Staining* acquistato da Merck Life Science.

1. STEP DI FISSAGGIO: (50 ml di etanolo, 40 ml di acqua, 10 ml di acido acetico): il solvente organico consente il restringimento delle maglie del gel (l'espulsione delle molecole d'acqua per aumentare la concentrazione proteica locale). Questo passaggio è fondamentale per migliorare la risoluzione di questa tecnica;
2. LAVAGGIO CON EtOH: (30 mL EtOH, 70 mL H₂O milliQ) per 10 minuti;
3. LAVAGGIO CON H₂O: (200 mL H₂O milli Q) per 10 minuti;
4. FASE DI SENSIBILIZZAZIONE (1 ml di soluzione sensibilizzante, 99 mL di acqua milliQ), 10 minuti: la soluzione sensibilizzante pH=9 contiene glutaraldeide e un agente ossidante, solitamente tiosolfato di sodio. La glutaraldeide permette la formazione di legami incrociati tra le lisine di diverse proteine, mentre il tiosolfato di sodio ossida la catena laterale delle proteine (Ser, Cys, Thr, Tyr, Trp) per sensibilizzarle alla successiva reazione con l'argento;
5. DOPPIO LAVAGGIO CON H₂O: 10 minuti;
6. FASE DI EQUILIBRAZIONE: (1 mL di soluzione d'argento, 99 mL di acqua milliQ), 10 minuti: lo 0,5% di nitrato d'argento forma complessi con i gruppi elettro donatori delle proteine e la reazione è favorita quando le proteine sono leggermente ossidate. Pertanto, la complessazione è favorita per le proteine che sono state ossidate con tiosolfato di sodio durante la fase precedente;
7. LAVAGGIO CON H₂O: (200mL di acqua milliQ), 1 min: in questa fase viene rimosso l'eccesso di argento, situato nella rete di poliacrilammide. Se il processo prosegue per più di 1-1,5 minuti, l'argento viene rimosso anche dalle proteine;
8. FASE DI SVILUPPO: (95 mL di acqua milliQ, 5 ml di soluzione di sviluppo A, 100 µL di soluzione di sviluppo B) 3-7 minuti: in questa fase avviene una reazione redox con i complessi proteina-argento. La soluzione di sviluppo contiene formaldeide che si ossida in forma acida, mentre l'argento si riduce in argento molecolare. Il potenziale di

riduzione dello ione argento legato è maggiore di quello dello ione argento libero; pertanto, in corrispondenza delle bande proteiche appare una colorazione grigio scuro metallica. Tuttavia, questo passaggio presenta un problema: se la reazione dura troppo tempo, la formaldeide riduce gli ioni d'argento anche dove non sono presenti proteine, il che porta a un risultato meno preciso. Quindi, una volta ottenuta la colorazione desiderata, si aggiunge immediatamente la soluzione bloccante.

9. SOLUZIONE STOP: 5 mL di soluzione stop per 5 minuti;

10. LAVAGGIO E CONSERVAZIONE: 200 mL di H₂O milliQ.

4.1.2 *Dynamic Light Scattering (DLS)*

Il *Dynamic Light Scattering (DLS)*, noto anche come *spettroscopia a correlazione di fotoni (PCS)*, è una tecnica utilizzata per valutare il profilo di distribuzione dimensionale delle nanoparticelle in soluzione. Nello specifico, in questo progetto di tesi sono state determinate le dimensioni delle formulazioni liposomiali preparate e il grado di polidispersività (PDI), monitorando i parametri nel tempo per gli studi di stabilità a differenti temperature.

Le particelle in soluzione si muovono secondo moti Browniani, e questo viene sfruttato per determinare il volume idrodinamico di una particella sferica con lo stesso coefficiente di diffusione (D). Secondo l'equazione di Stock-Einstein (*Formula 4.1.2*) la dimensione particellare è inversamente proporzionale al coefficiente di diffusione; inoltre, per determinare con precisione la dimensione è necessario conoscere l'esatta temperatura e viscosità del liquido.

$$D = \frac{k T}{3 \pi \eta d}$$

Formula. 4.1.2 Equazione di Stock Einstein; k = costante di Boltzmann; T =temperatura; η =viscosità;
 d =diametro idrodinamico

Lo strumento, *ZetaSizer Malvern*, determina, quindi, la velocità dei moti browniani in soluzione, misurando come varia l'intensità della luce diffusa nel tempo. Un raggio monocromatico colpisce le particelle in soluzione, le quali in base al loro diametro idrodinamico (d) e alla forma variano l'intensità di luce diffusa, in maniera proporzionale alle loro dimensioni. Lo strumento esegue analisi cumulative fino ad ottenere le informazioni riguardanti lo Z-Average e l'indice di polidispersività (PDI). Il primo parametro rappresenta il diametro idrodinamico presumendo che le particelle in soluzioni abbiano la stessa dimensione. Il PDI, invece, rappresenta la dispersività del campione, ossia quanto all'interno della soluzione risultano diverse le dimensioni del campione. Un valore basso (< 0.2) di polidispersività riflette un campione monodisperso in cui tutte le particelle hanno indicativamente la stessa dimensione. I campioni per l'analisi al DLS sono stati preparati mediante opportuna diluizione della sospensione liposomiale nel tampone di conservazione (PBS 1x pH=7,4). La misura, sia per l'ottenimento di un dato istantaneo, sia per gli studi di stabilità nel tempo, viene effettuata a 25°C dopo un tempo di equilibratura di 120 secondi.

4.1.3 Spettrofluorimetria

Lo *spettrofluorimetro* è lo strumento in grado di misurare l'intensità di fluorescenza di una sostanza, direttamente correlabile alla sua concentrazione in soluzione. Si definisce fluorescenza, l'emissione luminosa radioattiva, caratteristica di alcune molecole a seguito di eccitazione elettronica, derivante dal decadimento degli elettroni a livelli quantici di minore energia. Accade ciò in seguito al passaggio ad un livello superiore di singoletto per gli elettroni presenti nel livello orbitalico fondamentale, per azione di una fonte eccitatrice. Infine, oltre ad altri fenomeni di decadimento non radiativo, il ritorno allo stato fondamentale stabile con emissione raggiante può avvenire per una conversione singoletto-singoletto, determinando l'emissione fluorescente (*Figura 4.1.3*)³³

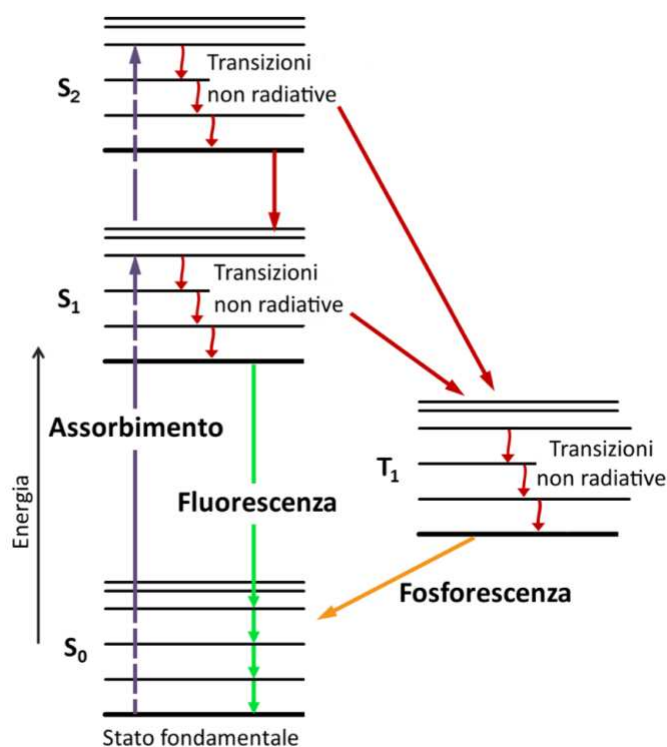


Figura 4.1.3 Diagramma di stato elettronico di Jablonski con indicazione delle transizioni, in verde la fluorescenza.

Le molecole per emettere fluorescenza devono essere dotate di peculiari caratteristiche chimico fisiche, ovvero essere costituite da una struttura rigida, planare, tipica delle strutture policicliche aromatiche come la Doxorubicina e gli amminoacidi aromatici (Trp, Phe, Tyr).

Il vantaggio dell'utilizzo della spettrofluorimetria rispetto al classico assorbimento sono la sensibilità e la specificità quasi mille volte superiori.

Lo strumento utilizzato per l'analisi spettrofluorimetrica è *JASCO FP-6500*. Una sorgente luminosa stabile fornisce energia eccitante, dalla quale viene selezionata una specifica lunghezza d'onda (λ) grazie alla presenza di un monocromatore. All'interno dello strumento, in una camera termostata, si pone la cuvetta totalmente trasparente in quarzo, la quale viene colpita dalla radiazione incidente ed emette successivamente la fluorescenza raccolta a 90° rispetto alla sorgente. La presenza di un monocromatore in

emissioni seleziona la radiazione luminosa uscente che arriva al detector. Infine, grazie ad un fotoamplificatore il segnale viene registrato.^{33 37}

In questo progetto di tesi, la spettrofluorimetria viene utilizzata per quantificare il rilascio di Doxorubicina incorporata all'interno delle formulazioni liposomiali, a differenti condizioni di pH. (Paragrafo 5.2 "Metodi")

4.1.4 *Microscopio a Trasmissione Elettronica (TEM)*

Il microscopio *TEM* (*Transmission Electron Microscope*) viene utilizzato per determinare le proprietà morfologiche e dimensionali delle preparazioni liposomiali ottenute. Lo strumento emette un fascio di elettroni ad elevata tensione, il quale colpisce il campione e viene disperso, al fine di colpire uno schermo fluorescente per creare un'immagine ingrandita del campione. Con la tecnica della trasmissione elettronica si ha un ingrandimento di 100.000 volte, con una risoluzione di 0,5 nm.

Per l'analisi TEM, si usa una tecnica di *negative staining*, per evitare la degradazione e/o alterazione dei liposomi investigati. Inizialmente, il campione viene circoscritto in modo da ottenere delle sottili sezioni di circa 80-100 nm, al fine di permettere il passaggio degli elettroni, infine fissate su una resina. Si aggiunge quindi l'*acetato di uranile*, il quale agisce da colorante indiretto. Esso infatti è un metallo pesante elettrondenso, che impedisce il passaggio del fascio di elettroni nelle zone dove il campione si accumula, determinando il contrasto nell'immagine finale³⁴. Tale colorante si fissa in modo selettivo sulla parete dei liposomi, interagendo con i lipidi.

Per l'analisi si utilizzano circa 25 µL di sospensione liposomiale ad una concentrazione finale di 01, mg/mL diluita con H₂O milliQ. I liposomi si lasciano aderire su griglie di rame con supporto di carbone da 400 mesh per EM. In seguito vengono colorati con uranil acetato 1%. Il campione allestito, viene visualizzato attraverso il *microscopio elettronico a trasmissione Tecnal G2 (FEI)*, operando con un potenziale di 100 kV. Le foto sono state acquisite con la telecamera *OSIS Veleta 4Kpixel*.³⁴

4.2 *Saggi*

4.2.1 *Saggio di Stewart*

Il saggio di Stewart viene utilizzato per valutare la concentrazione totale di fosfolipidi nella sospensione liposomiale mediante la formazione di un complesso con *ammonio ferro (III) tiocianato* $NH_4Fe(SCN)_3$ in solvente organico. Il vantaggio di questo saggio è la possibilità di determinare la concentrazione dei fosfolipidi nel buffer di conservazione (PBS 1x) contenente sali fosfato, in quanto la presenza di fosfato inorganico non interferisce con l'analisi.

Il reattivo di Stewart, $NH_4Fe(SCN)_3$, è un composto inorganico di colore rosso scuro insolubile in solvente organico, ma una volta complessato ai fosfolipidi è lipofilo e in grado di dissolversi in cloroformio. Questo reagente viene preparato sciogliendo 27,03 g di *cloruro di ferro (III) esaidrato* ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$; PM=270,33 g/mol) e 30,40 g di *tiocianato di ammonio* (NH_4SCN ; PM=76,12 g/mol) in 1 litro di acqua milliQ.

Per ottenere una precisa concentrazione di liposomi, è necessario creare una retta di taratura usando concentrazioni crescenti di HSPC, a partire da una soluzione stock a 0,2 mg/mL in $CHCl_3$. I campioni vengono preparati tre volte come indicato nella *Tabella 4.2.1.1*, miscelati con vortex e successivamente centrifugati a 1000 rpm per 10 minuti a 4°C. La fase organica sottostante viene analizzata tramite spettroscopia UV-Vis, alla lunghezza d'onda di 485 nm. Quando i liposomi sono caricati con DXR al loro interno è necessario preparare tre bianchi utilizzando il tampone di dispersione al posto del reagente di Stewart e sottrarre la loro assorbanza a quella dei campioni al fine di rimuovere il contributo del farmaco incapsulato. (*Tabella 4.2.1.2*)

	<i>Quantità HSPC</i>	<i>CHCl₃</i>	<i>Reattivo di Stewart</i>
Bianco	/	2 mL	2 mL
1	0.1 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,9 mL	2 mL
2	0.2 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,8 mL	2 mL
3	0.3 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,7 mL	2 mL
4	0.4 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,6 mL	2 mL
5	0.5 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,5 mL	2 mL
6	0.6 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,4 mL	2 mL
Campione 3x	n° mL Liposomi	2 mL	2 mL

Tabella 4.2.1.1 Preparazione retta di taratura e dei campioni per formulazioni prive del farmaco

	<i>Quantità HSPC</i>	<i>CHCl₃</i>	<i>Reattivo di Stewart</i>
Bianco	/	2 mL	2 mL
1	0.1 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,9 mL	2 mL
2	0.2 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,8 mL	2 mL
3	0.3 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,7 mL	2 mL
4	0.4 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,6 mL	2 mL
5	0.5 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,5 mL	2 mL
6	0.6 ml STOCK 0,2 mg/mL	1,4 mL	2 mL
Campione 3x	n° mL Liposomi	2 mL	2 mL
Bianco DXR	n° mL Liposomi	2 ml	2 mL PBS 1x

Tabella 4.2.1.2 Preparazione retta di taratura e dei campioni per formulazioni contenenti il farmaco

4.2.2 Efficienza di Incorporazione, EE%

Una volta che il farmaco viene incapsulato, l'efficienza di incorporazione viene valutata con un'analisi spettrofotometrica a 477 nm ($\epsilon_{DXR}=13050 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$). Il campione viene diluito in una soluzione di metanolo al fine di ottenere una soluzione a 1 mg/mL di HSPC, a cui vengono aggiunti 4 μL di TRITON X-100 1M. Questo tensioattivo ha il compito di rompere i liposomi e garantire la liberazione di DXR in soluzione. Il campione viene agitato con vortex e successivamente viene trattato a 60°C in THERMOMIXER per garantire la dissoluzione del bilayer fosfolipidico. La soluzione così ottenuta, in seguito a raffreddamento, viene analizzata con spettroscopia UV-Vis e ne viene determinata la concentrazione del farmaco. L'efficienza di incorporazione si ricava grazie all'applicazione della seguente *Formula 4.2.2*:

$$EE\% = \frac{\text{DXR incapsulata (mg)}}{\text{DXR usata per l'incapsulazione (mg)}} \cdot 100$$

Formula 4.2.2 Operazione per ricavare l'EE%

4.2.3 Saggio dell'Acido Biciconinico, BCA

Il saggio permette la determinazione della concentrazione proteica in soluzione tramite una reazione colorimetrica che prevede la formazione di un complesso colorato e la sua comparazione con una retta di calibrazione. Il range di concentrazioni misurabili va da 0,1 e 1 mg/mL. Nel primo step di reazione si forma un complesso tra lo *ione rameico* (Cu^{2+}) e il legame peptidico delle proteine, il quale riduce il rame dalla forma Cu^{2+} a Cu^+ . La reazione avviene in ambiente alcalino. (*Figura 4.2.3.1*)

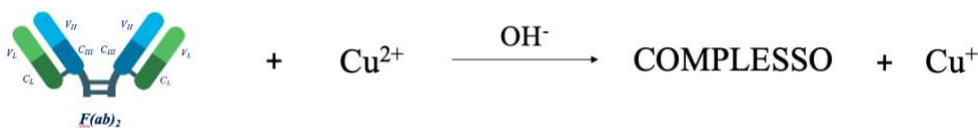


Figura 4.2.3.1 Riduzione Cu^{2+} da parte dei legami peptidici di $F(ab)_2$

In queste condizioni l'acido bicinconinico reagisce con elevata specificità con lo ione rameoso ridotto. La loro reazione porta alla formazione di un complesso color viola, la cui concentrazione è direttamente correlabile al quantitativo di proteina in soluzione. Il complesso viene analizzato tramite spettroscopia UV-Vis a 562 nm. (Figura 4.2.3.2). La reale concentrazione proteica in soluzione si ottiene grazie alla correlazione con una retta di taratura costituita da soluzione di TRS (Trastuzumab) a concentrazione crescente: 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 mg/mL in H₂O milliQ.

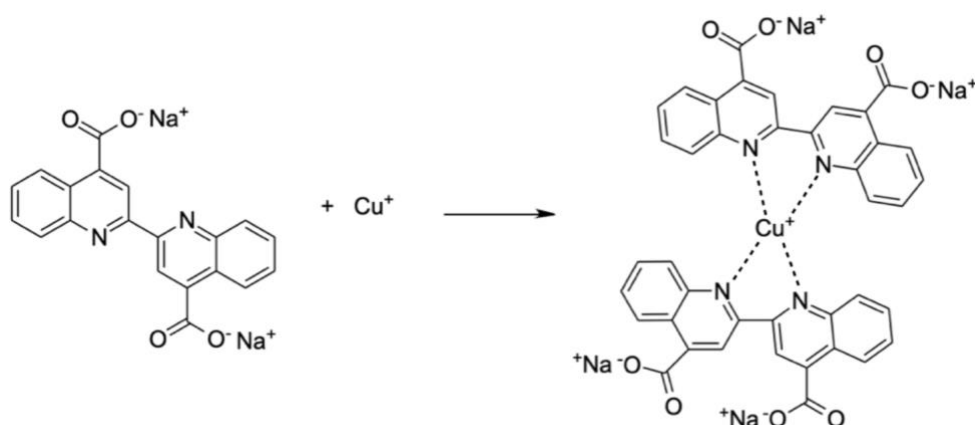


Figura 4.2.3.2 Formazione del complesso tra acido bicinconinico e Cu^+

Il *Working Reagent (WR)* viene preparato a monte dell'incubazione, grazie alla miscelazione del *reattivo A* (una soluzione di carbonato e bicarbonato di sodio, acido bicinconinico, tartrato di sodio e idrossido di sodio 0,1M) e il *reattivo B* (una soluzione al 4% di CuSO_4), in rapporto 50:1. Tutti i campioni sono preparati secondo tabella sotto riportata (Tabella 4.2.3). La reazione avviene in eppendorf a 37°C per due ore. I dati vengono poi ricavati allo spettrofotometro a 562 nm.

	Quantitativo (uL)	Working Reagent (WR)
Bianco	25 uL H ₂ O milliQ	500 uL
0,1	25 uL di 0,1 mg/mL TRS	500 uL
0,2	25 uL 0,2 mg/mL TRS	500 uL
0,3	25 uL 0,3 mg/mL TRS	500 uL
0,4	25 uL 0,4 mg/mL TRS	500 uL
0,5	25 uL 0,5 mg/mL TRS	500 uL
0,6	25 uL 0,6 mg/mL TRS	500 uL
Campione x3	25 uL di Liposomi	500 uL

Tabella 4.2.3 Preparazione soluzioni per saggio BCA in eppendorf

4.2.4 Micro-BCA

Il saggio del micro-BCA viene utilizzato in questo progetto di tesi per determinare il quantitativo finale di anticorpo funzionalizzato sulla superficie dei liposomi e ottenere un indicativo numerico delle molecole di F(ab)' per liposoma.

Si differisce dal precedente saggio per essere condotto, innanzitutto, in piastra da 96 pozzetti, per la sensibilità, la quale permette di investigare un range di concentrazioni che va da 0,5 a 20 ug/mL e per la retta di taratura costituita rispettivamente da soluzioni di TRS: 1 – 2,5 – 5 – 10 – 20 ug/mL.

La preparazione dei pozzetti avviene secondo *Tabella 4.2.4* sottostante:

	Quantitativo (uL)	Working Reagent (WR)
H₂O	25 uL H ₂ O milliQ	25 uL
PBS	25 uL	25 uL
Punti Retta	25 uL	25 uL
1 – 2,5 – 5 – 10 – 20		
Campione x3	25 uL di Liposomi	25 uL

Tabella 4.2.4 Preparazione soluzioni per saggio micro-BCA in piastra

Il *Working Reagent (WR)* si ottiene miscelando 25 parti di tampone QuantiPro QA (*reagente QA*), 10 parti di tampone QuantiPro QB (*reagente QB*) e, una volta combinate, 1 parte di solfato di rame (III) pentaidrato (*Reagente QC*). Il reagente QA è costituito da carbonato di sodio, bicarbonato di sodio e tartrato di sodio in NaOH 0,2 M, pH 11,25. Il reagente QB, invece, è composto da una soluzione di BCA al 4% (p/v), pH 8,5. Tutti i campioni vengono preparati come descritto nella *tabella 4.2.4* e la reazione avviene come discusso nel *paragrafo 4.2.3*.

Per la determinazione del quantitativo di molecole di F(ab)' presenti sulla superficie liposomiale, tramite l'equazione della retta di taratura ottenuta, si ricava la concentrazione in ug/uL e applicando la *formula 4.2.4* si ottiene il numero di molecole presenti indicativamente per ogni liposoma.

$$\mathbf{N^{\circ} molecole F(ab)'} = (1,2 \cdot 10^{13} \frac{F(ab)'}{1 \text{ ug}} \cdot \frac{\text{ug } F(ab)'}{\text{umol HSPC}}) / 7,8 \cdot 10^{12} \frac{\text{liposomi}}{\text{umol HSPC}}$$

Formula 4.2.4 Calcolo molecole di F(ab)' per liposoma

5. STUDIO DELLE FORMULAZIONI LIPOSOMIALI

Lo studio in questo progetto di tesi ha come protagonisti le formulazioni di liposomi e immunoliposomi stealth con *PEG misto* e *PEG da 5kDa*, confrontate tra loro in termini di stabilità nel tempo, rilascio del farmaco, attività citotossica in vitro e resistenza all'opsonizzazione. Lo studio pone l'obiettivo di valutare le differenze sostanziali, come conseguenza dell'utilizzo di una diversa dimensione di polimero stealth usato come coating superficiale (2 kDa o 5 kDa) e come molecola linker per l'anticorpo (5 kDa).

5.1 Studio di stabilità a lungo termine

Tale studio in vitro valuta l'omogeneità delle sospensioni liposomiali nel tempo, a differenti temperature di conservazione, sia a 4°C che a 25°C. Si utilizza la tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS), introdotta precedentemente al *paragrafo 4.2.1 "Metodi"*, monitorando sia la dimensione che il PDI, indice relativo di formazione di eventuali aggregati.

Lo studio ha una durata di 60 giorni e i dati sono stati rilevati dal giorno del termine della preparazione della formulazione, il successivo e il terzo giorno e successivamente ogni 5 giorni fino al termine dei due mesi.

Sono state oggetto di studio le sospensioni di liposomi SL e SIL sia formulate con PEG misto (2 kDa per il coating superficiale e 5 kDa per l'agente di targeting) che con 5kDa, diluite in un buffer di conservazione PBS 1x pH=7,4 a una concentrazione 3mM in termini di HSPC, con un'aggiunta di NaN₃ allo 0,05% p/V. La sodio azide agisce da agente antimicrobico per evitare una possibile contaminazione durante il periodo di analisi. Le sospensioni sono state conservate in frigo a 4°C e in THERMOMIXER a 25°C.

L'analisi è stata effettuata secondo i tempi precedentemente indicati, prelevando 4 uL di ogni rispettiva sospensione liposomiale che è stata diluita in 196 uL di buffer di conservazione e successivamente analizzata al DLS. I parametri strumentali utilizzati sono riportati al *paragrafo 4.2.1 "Metodi"*.

5.2 Studio di rilascio del farmaco

La Doxorubicina è una molecola che, grazie alla sua struttura policiclica aromatica planare, è in grado di emettere fluorescenza, tranne nel caso in cui essa si trova precipitata nell'ambiente interno liposomiale sotto forma di sale solfato. Questo studio permette, quindi, di indagare la stabilità del farmaco internalizzato e l'eventuale rilascio dello stesso esternamente al bilayer fosfolipidico, dove, nella forma libera è in grado di dare fluorescenza.

L'obiettivo dello studio è di mimare gli ambienti fisiologici e tumorali che le formulazioni incontreranno in seguito a somministrazione, valutarne l'eventuale perdita precoce del farmaco e come essa varia in funzione del tipo di polimero utilizzato a livello superficiale. L'ambiente fisiologico è rappresentato dal buffer *PBS 1x pH=7,4*, mentre quello tumorale, più acido per la presenza di diversi metaboliti e nutrienti, è costituito dal medesimo buffer ma a *pH=5,5*.

Lo studio viene condotto preparando una sospensione liposomiale 1mM in HSPC, in 500 uL di volume di buffer, il quale viene analizzato allo *spettrofluorimetro JASCO FP-6500*. La durata dello studio è di 16 ore a temperatura corporea di 37°C, rilevando l'intensità di fluorescenza ogni 30 minuti. Il settaggio dello strumento è riportato in *Tabella 5.2*

ANALISI	Long Time-course measurement
Durata	16 ore
Time-point	30 min
$\lambda_{\text{eccitazione}}$	470 nm
$\lambda_{\text{emissione}}$	584 nm
Banda di eccitazione	5 nm
Banda di emissione	10 nm
Sensibilità	Media
Risposta	0,5 sec
Temperatura interna (peltier)	37°C

Tabella 5.2 Settaggio di JASCO FP-6500, per analisi Long time-course measurement.

Al termine dell'analisi, si prelevano 250 uL dalla soluzione, i quali vengono trattati con TRITON-X-100 1 M al 5% v/v, al fine di liberare il quantitativo totale di DXR e ricavarne il 100%. Da questa soluzione si preleva un quantitativo necessario per diluire la soluzione e rimanere nei range di rilevanza strumentale. Per differenza, tramite foglio di calcolo, si ricava la % di farmaco rilasciata nel tempo.

5.3 Studi di Opsonizzazione

Il fenomeno dell'opsonizzazione rappresenta uno dei principali meccanismi di immunità innata, e concerne con il rivestimento di entità non-self ad opera di molecole che favoriscono successivamente la fagocitosi. Queste molecole prendono il nome di *opsonine* e comprendono immunoglobuline sanguigne, prodotti derivati dall'attivazione del complemento (Cb3) e altre proteine presenti in circolo. I liposomi al momento della loro introduzione nel sistema circolatorio sono soggetti ad una serie di complesse interazioni che ne determinano sostanzialmente il destino. Per svelare queste interazioni, viene spesso posta particolare enfasi sul concetto di *corona proteica*. Secondo questo concetto, le proteine plasmatiche si legherebbero ai liposomi per alterare le loro proprietà superficiali e, quindi, ne regolerebbero l'emivita plasmatica, la biodistribuzione e la capacità di targeting.⁴¹ (Figura 5.3)

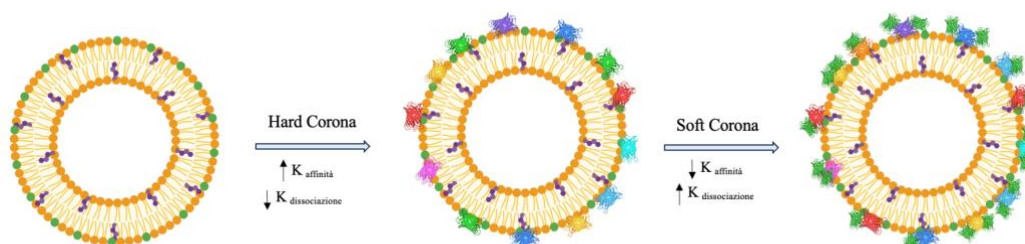


Figura 5.3 Adsorbimento delle proteine corona sulla superficie liposomiale

L'obiettivo di questo studio è valutare come la presenza superficiale di PEG nelle formulazioni liposomiali, sia esso *misto* che *5kDa*, possa indurre una resistenza nei confronti del processo di opsonizzazione da parte delle proteine corona.

Sperimentalmente, le formulazioni liposomiali vengono incubate in una soluzione al 60% di plasma murino, in un volume finale di 400 μ L e ad una concentrazione finale di 1mM in termini di HSPC. L'incubazione avviene a 37°C per un'ora in THERMOMIXER.

I complessi liposoma-proteine corona vengono successivamente purificati dalle opsonine non adsorbite in superficie e dal rimanente plasma, tramite Size Exclusion Chromatography (SEC). La colonna utilizzata è una *Sepharose CL-4B*, con eluente PBS 1x pH=7,4 a 1,5 mL/min di flusso. La presenza delle proteine corona viene valutata tramite SDS-PAGE con colorazione all'argento (*Paragrafo 4.1.1.3 "Metodi"*).

5.4 Studio di citotossicità in vitro

L'effetto citotossico delle formulazioni è stato valutato sulle linee cellulari *HER2+* (*SKOV3*) e *HER2-* (*MDA-MB-231*) mediante il sistema di test di rilevamento *ATP Luminescente "ATPlite"*.

Lo studio ha come obiettivo evidenziare la specificità di targeting maggiore degli immunoliposomi nei confronti delle formulazioni senza anticorpo e valutare un possibile miglior riconoscimento per le formulazioni con PEG_{2kDa} in superficie, più corto del polimero portante l'agente di targeting. Si ipotizza, infatti, che la maggior distanza dovuta alla molecola linker (PEG 5 kDa) rispetto al PEG superficiale (PEG 2 kDa) possa aumentare l'esposizione del F(ab)' di Trastuzumab, in grado di riconoscere, teoricamente, con minor ingombro il recettore HER2.

Gli esperimenti sono stati condotti nel laboratorio della Prof.ssa De Martin, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova. Il saggio ATPlite (*luminescent ATP detection Assay System, Perchin Elmer*) permette il monitoraggio della crescita cellulare in base alla variazione di ATP (adenosina trifosfato) prodotta, tipico marker di vitalità cellulare. La sua produzione, infatti, è correlata ad un attivo metabolismo cellulare, il quale diminuisce qualora la cellula vada incontro a necrosi o apoptosi. La luminescenza è resa possibile dall'enzima luciferasi, della lucciola *Photinus Pyralis*, la quale catalizza la reazione tra una molecola di ATP e D-Luciferina in presenza di ossigeno, con produzione di ossiluciferina e altri sottoprodotti, come riportato in *Figura 5.5*

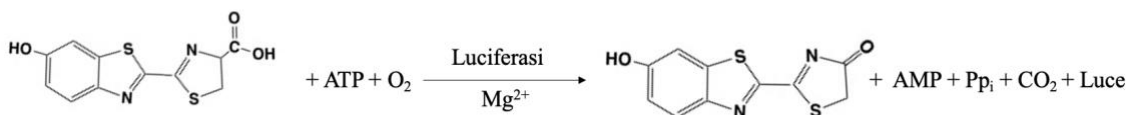


Figura 5.5 Reazione tra ATP e D-Luciferina, catalizzata da Luciferasi

La quantità di luce prodotta è proporzionale alla concentrazione di ATP presente, risalente al numero di cellule metabolicamente attive.³⁹

In breve, le cellule sono state seminate in pozzetti neri da 96 piastre con una densità di 5.000 cellule/pozzetto (SKOV3 e MDA-MB-231). Le due linee cellulari sono state mantenute in un terreno di coltura completo (88% DMEM High Glucose without L-Glutamine; 10% FBS; 1% soluzione Pen Strep; 100 UI penicillina; 0,1 mg/mL streptomina; 1%. Glutammina 2mM, in condizioni di umidità controllata e temperatura costante (37°C) in presenza di CO₂ al 5%.

Le cellule sono state trattate con soluzioni contenenti Doxorubicina e i liposomi SL/SIL_{misti/5kDa} a concentrazioni 25-5-1-0,5-0,1-0,01 μM in termini di farmaco. Alla fine del trattamento 50 μL di soluzione “*mammalian cell lysis solution*” sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, in agitazione per 5’ a temperatura ambiente. La piastra viene quindi lasciata al buio per dieci minuti e infine l’emissione di luminescenza è stata misurata con lo strumento *Victor-Wallac*. I valori IC₅₀ sono stati calcolati utilizzando GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, USA) mediante un modello di regressione non lineare.

5.5 Microscopia confocale in vitro

Il test in vitro ha come obiettivo la valutazione dell’entità dell’internalizzazione delle formulazioni liposomiali, su cellule cancerose sovra esprimenti il recettore HER2.³⁸ Viene quindi eseguito un esperimento di microscopia confocale in vivo utilizzando cellule SKOV3, caratterizzate dalla presenza di HER2, e trasfettate con GFP (*Green Fluorescence Protein*) che ne determina la fluorescenza in verde. I liposomi vengono invece marcati con VYBRANT® DiD (Thermo Fisher), una sostanza fluorescente in

grado di ancorarsi al bilayer grazie alle sue catene lipofile, e con un massimo di emissione di fluorescenza nel rosso (Figura 5.3.1).³⁶

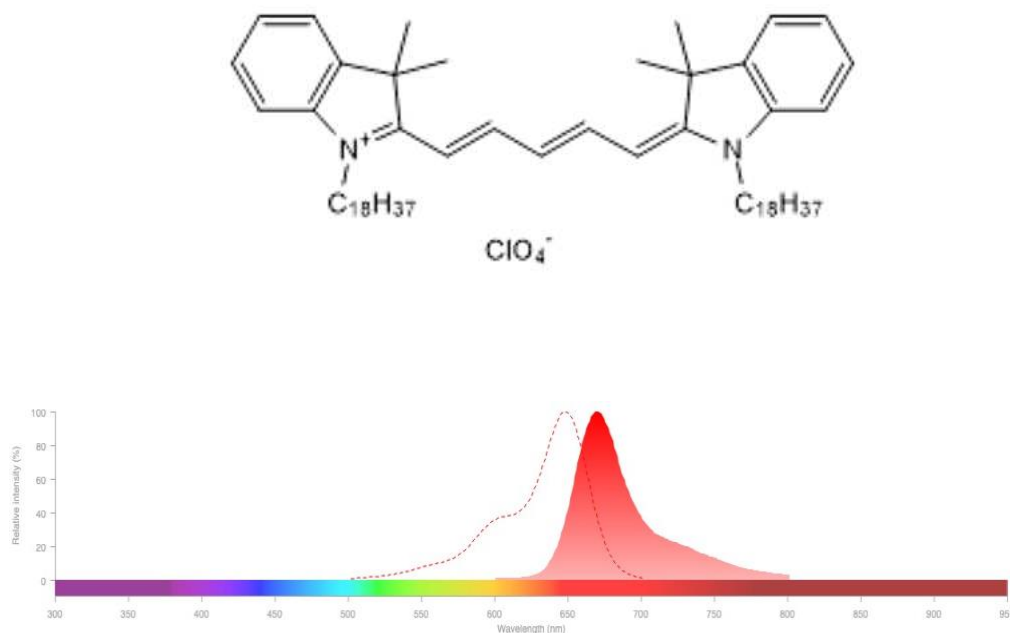


Figura 5.3.1 Formula chimica e spettro di assorbimento/emissione del VYBRANT® DiD

Per incorporare il DiD si è utilizzato un rapporto molare $HSPC : DiD = 1 : 0,01$. La reazione è stata condotta a 37°C 300 rpm in THERMOMIXER per 75 minuti. I liposomi fluorescenti vengono, successivamente, purificati dal colorante non legato con colonna PD-10 con eluente PBS 1x pH=7,4. Per valutare l'efficienza di incorporazione di DiD si è eseguita una misura di assorbimento a 647 nm, con $\epsilon_{molare} = 245000 M^{-1} cm^{-1}$.

Le cellule (LINTERNA SK-OV-3, Innoprot, Bizkaia, Spagna) sono mantenute in terreno McCoy integrato con 10% FBS, 0,5% L -glutamina e 0,5% G418. Per l'esperimento, 35×10^4 cellule sono state seminate in camere di coltura con fondo di vetro a 4 pozzetti (Ibidi GmbH, Germania) e caricate con formulazioni SL/SIL misti/5kDa marcate con DiD. Le immagini sono state acquisite periodicamente per 24 ore utilizzando un microscopio confocale time-lapse (Zeiss LSM 800, ingrandimento 40×)²⁹.

RISULTATI

1. CARATTERIZZAZIONE DELLE FORMULAZIONI

I liposomi stealth, gli immunoliposomi stealth e le relative versioni super stealth, sono state caratterizzate in termini di dimensioni grazie all'analisi DLS (*Paragrafo 4.1.2 "Metodi"*) e dal punto di vista morfologico tramite TEM (*Paragrafo 4.1.4 "Metodi"*). In seguito a incorporazione del farmaco ne è stata quantificata l'efficienza (*Paragrafo 4.2.2 "Metodi"*). La digestione e riduzione dell'anticorpo TRS (*Paragrafi 2.1 / 2.2 / 2.3 "Metodi"*) per ottenere la porzione F(ab)' e la successiva inserzione nel film liposomiale, sono state valutate con la tecnica dell'SDS-PAGE (*Paragrafo 4.1.1 "Metodi"*). Il quantitativo di anticorpo sulla superficie dei liposomi è stato calcolato con il saggio del micro-BCA (*Paragrafo 4.2.4 "Metodi"*).

1.1 Analisi DLS di SL, SIL, SSL₂ e SSIL₂

Le analisi DLS mostrano come la dimensione media dei *liposomi stealth (SL)* rientri in un range tra i 90 e i 100 nm, sia per le formulazioni con PEG superficiale di ridotta lunghezza (2 kDa), sia per le formulazioni con PEG superficiale e PEG per il targeting della stessa lunghezza (5 kDa). Leggermente superiore è risultata essere la dimensione media delle formulazioni *super stealth (SSL₂)*.

Tutte formulazioni al termine della loro caratterizzazione hanno mostrato bassa polidispersità, infatti, il valore di PDI rientra tra 0,03 e 0,09. Le analisi dimensionali sono state condotte per tutte le formulazioni vuote, in seguito a caricamento di Doxorubicina e al termine con la coniugazione superficiale di F(ab)' (*Figure 1.1.1, 1.1.2 e 1.1.3*). L'obbiettivo è stato monitorare come tutti questi procedimenti formulativi influiscano sulle dimensioni del film.

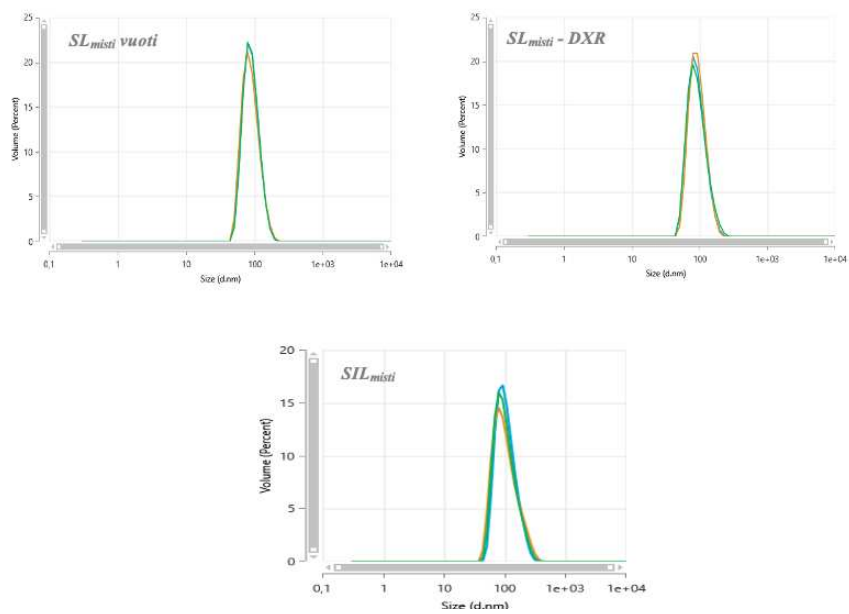


Figura 1.1.1 Distribuzione dimensionali in termini di Volume di SL/SIL misti

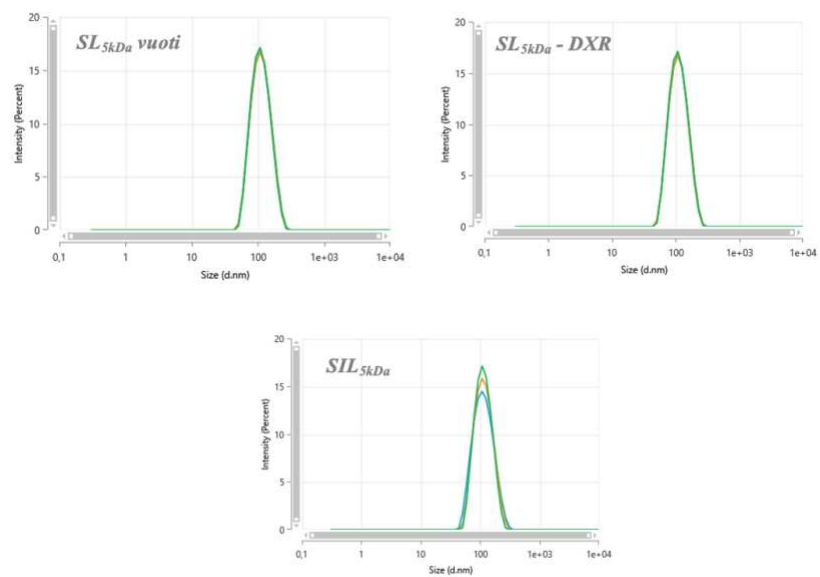


Figura 1.1.2 Distribuzione dimensionali in termini di Volume di SL/SIL_{5kDa}

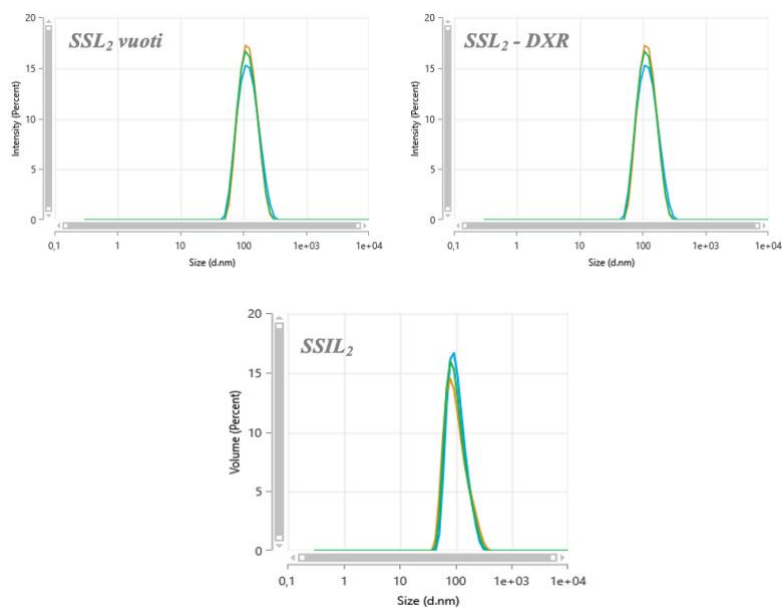


Figura 1.1.3 Distribuzione dimensionali in termini di Volume di $SSL_2/SSIL_2$

Come riportato in *Tabella 1.1.1* e come si nota dalle *Figure 1.1.1, 1.1.2 e 1.1.3*, la dimensione delle formulazioni aumenta sia in seguito a incorporazione del farmaco sia successivamente alla post-insertion.

	Vuoti	DXR	Post-Insertion
SL/SIL_{misti}	91,67 nm ± 1,43	96,25 nm ± 2,30	101,26 nm ± 1,07
	PDI: 0,06270 ± 0,019	PDI: 0,07270 ± 0,016	PDI: 0,0805 ± 0,019
SL/SIL_{5kDa}	94,41 nm ± 2,29	98,46 nm ± 2,80	100,4 nm ± 2,52
	PDI: 0,07407 ± 0,020	PDI: 0,07579 ± 0,018	PDI: 0,07920 ± 0,017
SSL₂/SSIL₂	101,6 nm ± 3,51	102,8 nm ± 2,93	105,8 nm ± 3,26
	PDI: 0,0483 ± 0,031	PDI: 0,08245 ± 0,042	PDI: 0,0836 ± 0,024

Tabella 1.1.1 Media dei valori dimensionali e di PDI ottenuti tramite DLS

Nella *Tabella 1.1.2* sono riportate, invece, le concentrazioni caratterizzanti ogni formulazione, in termini di HSPC e DXR, ricavate rispettivamente dal saggio di Stewart (*Paragrafo 4.2.1 “Metodi”*) e dall’efficienza di incorporazione (*Paragrafo 4.2.2 “Metodi”*).

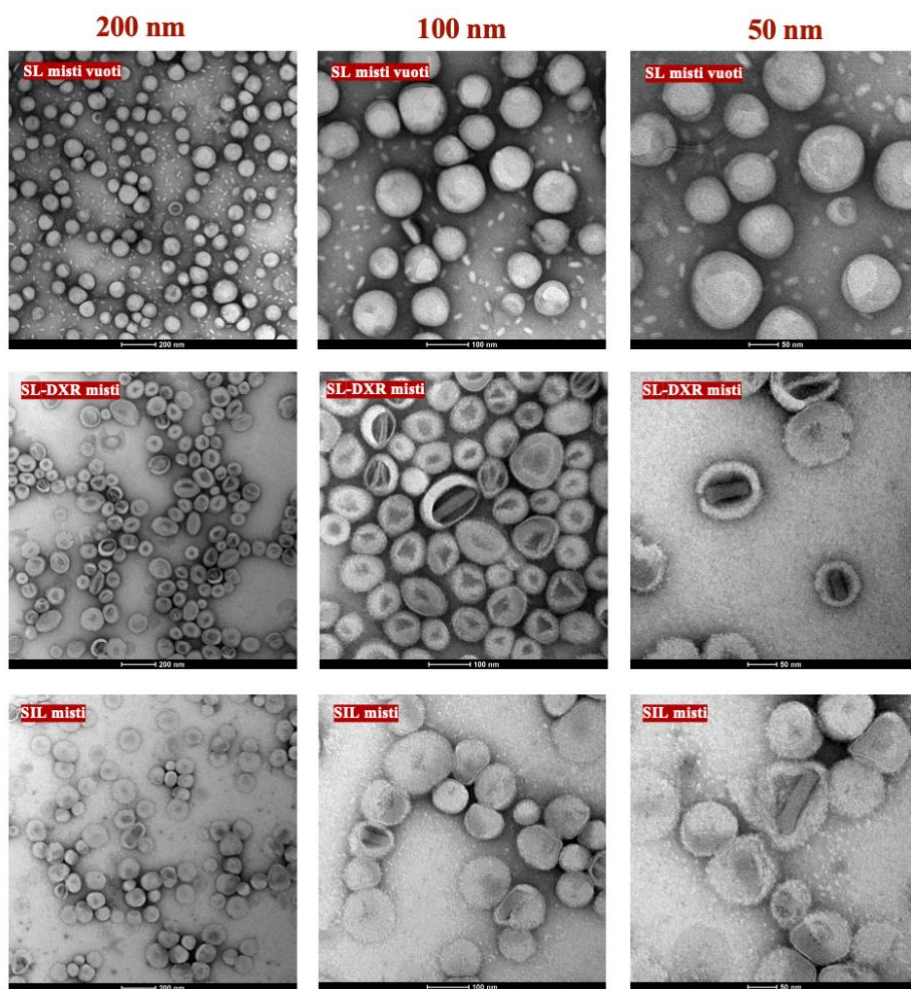
	<i>[HSPC] mg/mL</i>	<i>[DXR] mg/mL</i>	<i>EE%</i>
<i>SL_{misti vuoti}</i>	17,04	/	/
<i>SL-DXR_{misti}</i>	2,67	0,844	97,59
<i>SIL_{misti}</i>	0,87	0,299	98,63
<i>SL_{5kDa vuoti}</i>	15,59	/	/
<i>SL-DXR_{5kDa}</i>	2,11	0,699	95,77
<i>SIL_{5kDa}</i>	0,85	0,324	93,34
<i>SSL_{2 vuoti}</i>	16,06	/	/
<i>SSL_{2-DXR}</i>	3,41	0,7019	95,05
<i>SSIL₂</i>	0,64	0,097	98,12

Tabella 1.1.2 Valutazione delle concentrazioni di HSPC, DXR ed efficienza di incorporazione

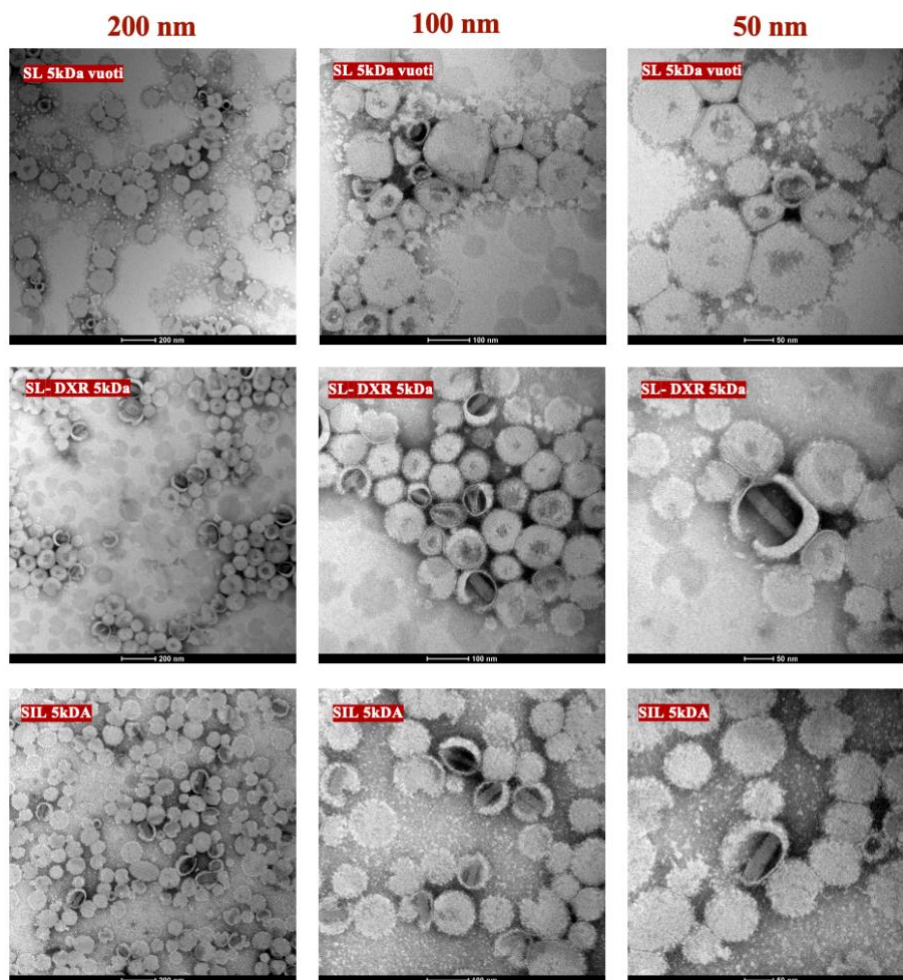
Tutte le formulazioni sono caratterizzate da un’elevata efficienza di incorporazione, conferma che il rapporto di $HSPC : DXR = 1 : 0,2$ è ottimale per il caricamento del farmaco all’interno del film.

1.2 Analisi TEM di SL, SIL

La microscopia a trasmissione elettronica (TEM) (*Paragrafo 4.1.4 “Metodi”*) è stata utilizzata per valutare la morfologia di tutte le formulazioni preparate, confrontando se ne varia la forma in funzione dell’incorporazione del farmaco e l’inserimento dell’anticorpo nel film liposomiale. Lo strumento acquisisce immagini a diversi livelli di zoom, tali da determinare una scala dove due centimetri in figura rappresentano in ordine 200, 100, 50 nm nel campione. Tutte le formulazioni sono state analizzate ad una concentrazione di 0,1 mg/mL in termini di HSPC.



*Figura 2.4.1 Immagini TEM SL/SIL misti, nella versione senza farmaco, con DXR, e post-inseriti;
Scala 200 – 100 – 50 nm*



*Figura 2.4.2 Immagini TEM SL/SIL 5kDa, nella versione senza farmaco, con DXR, e post-inseriti;
Scala 200 – 100 – 50 nm*

Come mostrato in *Figura 2.4.1 e 2.4.2*, i liposomi vuoti mostrano una forma sferica con un bordo ben definito e regolare. Attorno alle vescicole è presente un'ombra dovuta alla colorazione utilizzata per l'analisi. In seguito a caricamento, i liposomi mantengono una forma sferoidale e la doxorubicina, una volta precipitata all'interno dei liposomi come sale solfato, si auto assembla in strutture lineari simili a fibre. Il bordo degli immunoliposomi risulta meno definito e ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di F(ab)' PEGilato sulle superfici.

2. PREPARAZIONE $F(ab)'$ - PEG5kDa -DSPE

2.1 Digestione Enzimatica

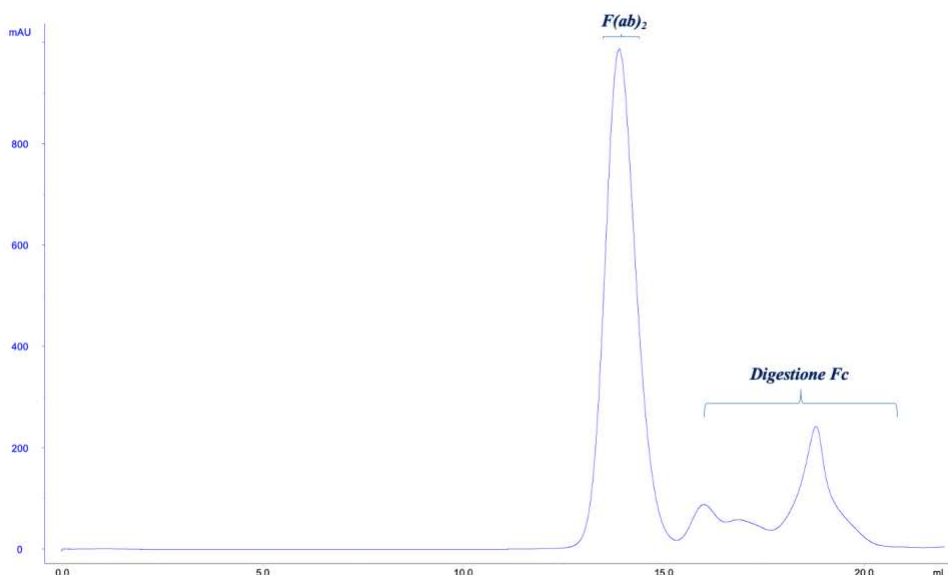


Figura 2.1 Purificazione $F(ab)_2$ con Size Exclusion Chromatography in condizioni isocratiche, usando colonna Superose 30/100 GL e PBS 1x pH=7,4 come buffer di eluizione.

In Figura 2.1 è rappresentato il cromatogramma dei prodotti ottenuti dalla digestione enzimatica dell'anticorpo Trastuzumab. In questa cromatografia è stata utilizzata la tecnica SEC (Size Exclusion Chromatography), in grado di separare i composti in base al diverso peso molecolare. Composti a peso molecolare superiore eluiscono prima dei composti a basso peso molecolare, trattenuti maggiormente dalla fase stazionaria.

In accordo con il cromatogramma la reazione di digestione è avvenuta correttamente. Il primo picco di maggior rilievo rappresenta $F(ab)_2$, e l'assenza di picchi precedenti conferma la corretta digestione dell'intero anticorpo. I picchi successivi a quello di interesse si configurano nei prodotti di ulteriore digestione della porzione cristallina F_c di Trastuzumab e non sono stati raccolti.

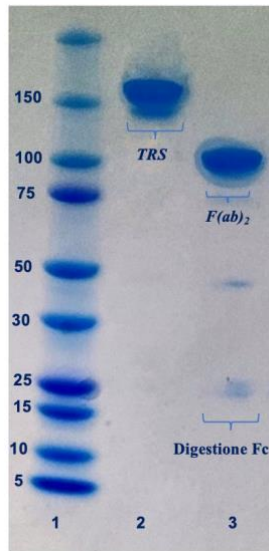


Figura 2.1.2: SDS-PAGE in condizioni non riducenti; Schema caricamento pozzetti: #1 Standard PM; #2 TRS; #3 Miscela di reazione

Successivamente alla purificazione di $F(ab)_2$, è stato eseguito un gel di SDS-PAGE per confermare che la digestione di TRS è avvenuta correttamente. Come mostrato in *Figura 2.1.2*, nel pozzetto #3 la miscela di reazione presenta $F(ab)_2$ non purificato, rappresentato dalla banda più intensa a 100 kDa. Inoltre, si conferma che i picchi successivi al $F(ab)_2$ nel cromatogramma in *Figura 2.1* rappresentano la digestione della porzione F_c dell'anticorpo, individuati nel gel dalle bande sottostanti. Dal gel sottostante si può dedurre quindi che, in confronto al pozzetto #2 con TRS puro, la reazione è avvenuta con successo (*Figura 2.1.3*), e $F(ab)_2$ è stato correttamente purificato.

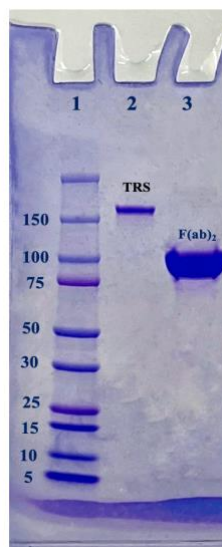


Figura 2.1.3 SDS-PAGE in condizioni non riducenti; Schema caricamento pozzetti: #1 Standard PM; #2 TRS; #3 $F(ab)_2$ purificato

2.2 Riduzione $F(ab)_2$

Nel corso del progetto di tesi, si sono variate le condizioni di riduzione del $F(ab)_2$ ad opera della *cisteamina*. Si è passati infatti, da una reazione condotta in PBS 1x pH=7,2 10 mM EDTA per 30', a pH a 7,4 per un totale di 45 minuti di reazione. Come si può notare dal confronto tra i cromatogrammi in *Figura 2.2.1* e *2.2.2*, si ha un aumento della resa di riduzione del primo picco, rappresentante $F(ab)_2$, a parità di quantitativo in mg.

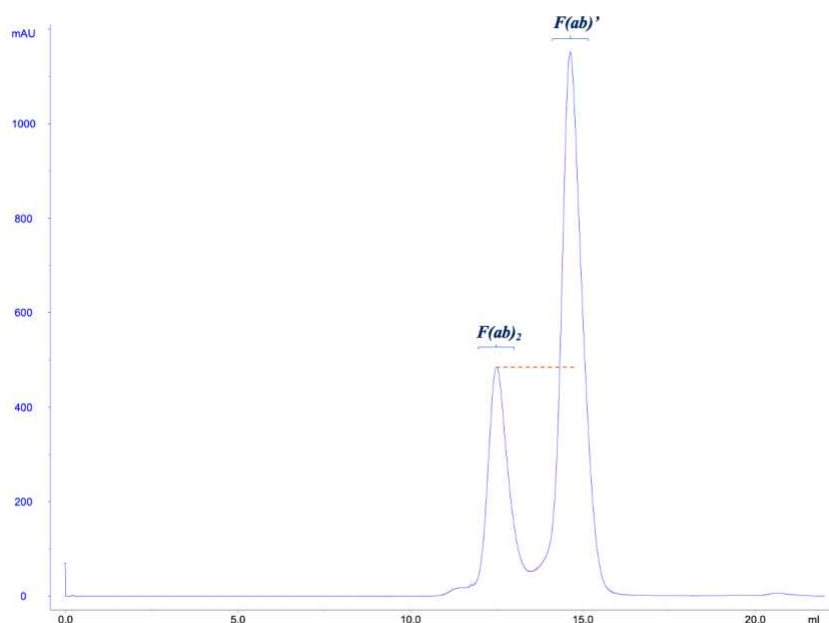


Figura 2.2.1 Purificazione $F(ab)'$ con Size Exclusion Chromatography in condizioni isocratiche, usando colonna Superdex 200 30/100 GL e PBS 1x pH=7,2 10 mM EDTA come buffer di eluzione. tempo di reazione = 30 minuti

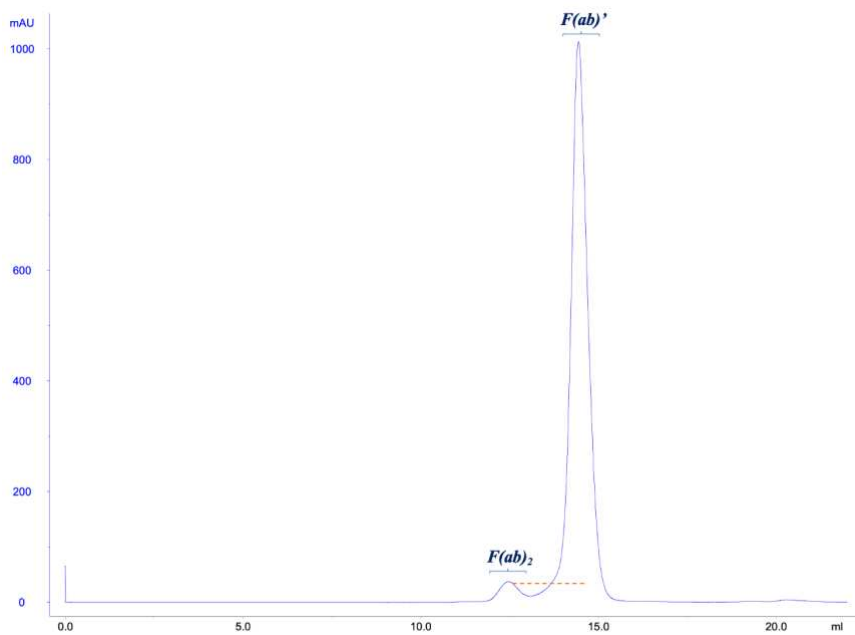


Figura 2.2.2 Purificazione $F(ab)'$ con Size Exclusion Chromatography in condizioni isocratiche, usando colonna Superdex 200 30/100 GL e PBS 1x pH=7,4 10 mM EDTA come buffer di eluizione. Tempo di reazione = 45 minuti

In accordo con le analisi SEC, non tutto il $F(ab)_2$ viene ridotto, data la presenza di due picchi distinti, il cui primo rappresenta proprio $F(ab)_2$ che eluisce prima per maggior PM. Il secondo picco rappresenta, invece, $F(ab)'$. Si può dedurre dal rapporto tra i relativi picchi che la reazione a pH 7,4 e per un tempo prolungato, ha una miglior resa. Il prodotto $F(ab)'$ purificato è confermato dalla presenza della banda a 50kDa nel gel sottostante.

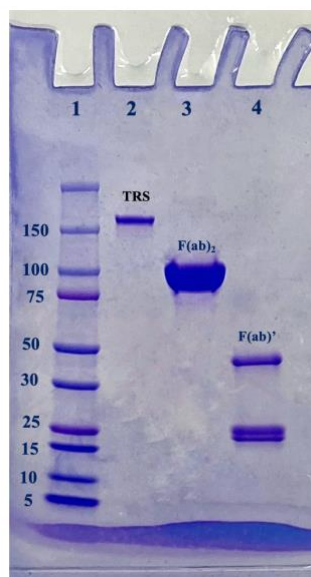


Figura 2.2.3 SDS-PAGE in condizioni non riducenti; Schema caricamento pozzetti: #1 Standard PM; #2 TRS; #3 $F(ab)_2$ purificato; #4 $F(ab)'$ purificato

2.3 PEGilazione F(ab)'

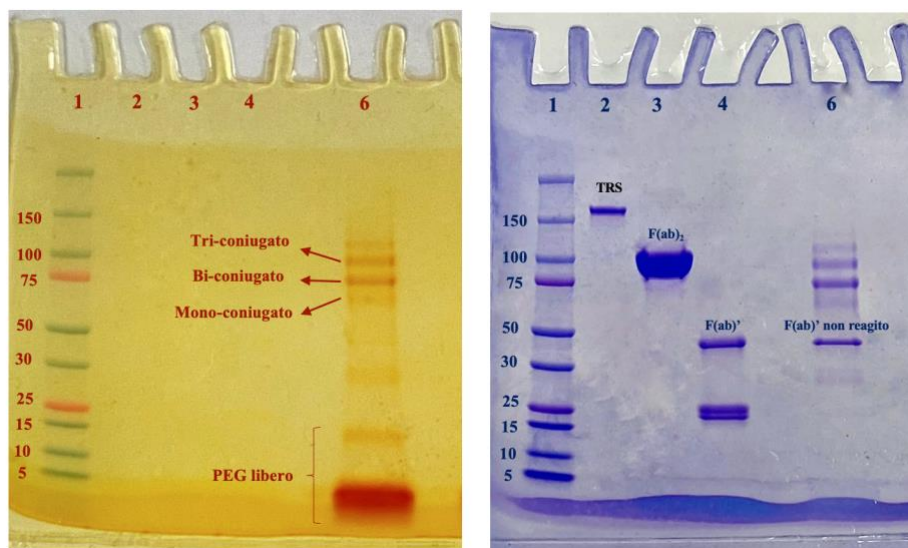


Figura 2.3 SDS-PAGE in condizioni non riducenti; Schema di caricamento: #1 Standard; #2 TRS; #3 F(ab)₂; #4 F(ab)'; #6 Miscela di reazione PEGilazione

Le formulazioni di F(ab)'-PEG-DSPE per SL/SIL_{misti}/5kDa sono state caratterizzate in SDS-PAGE (Paragrafo 4.1.1 "Metodi") in condizioni non riducenti secondo lo schema di caricamento in Figura 2.3. Con la colorazione allo iodio si evidenzia la presenza di PEG, e i composti che hanno subito PEGilazione. Per la miscela di reazione (pozzetto #6; #8) si possono notare i differenti coniugati ottenuti: il *tri-PEGilato* che ha un guadagno di 10 kDa circa per ogni molecola di PEG legata, migra come una proteina dal peso molecolare di circa 100 kDa; il *bi-PEGilato* (banda intermedia) con peso molecolare di circa 70 kDa; infine il *mono-PEGilato* a 60kDa. Nella sottostante porzione di gel si possono notare delle lievi bande a 30 kDa, rappresentanti probabilmente i residui di sola catena pesante del F(ab)' PEGilati, e infine il *PEG libero*, che non ha reagito. Grazie alla colorazione al *Coomassie* è possibile confermare l'ottenimento del coniugato. Il confronto tra le due colorazioni conferma la sovrapposizione delle bande a circa 100kDa, 70 kDa e 60 kDa confermando che le reazioni di PEGilazione sono avvenute con successo.

2.4 Valutazione della Post-Insertion

Con la tecnica dell' SDS-PAGE, più in specifico con la colorazione all'argento (*Paragrafo 4.1.1.3 "Metodi"*), è possibile ottenere informazioni di natura qualitativa sulla presenza di proteine nel campione. In questo caso, la tecnica è stata utilizzata per valutare la presenza di F(ab)' sulla superficie dei liposomi in seguito alla post-insertion.

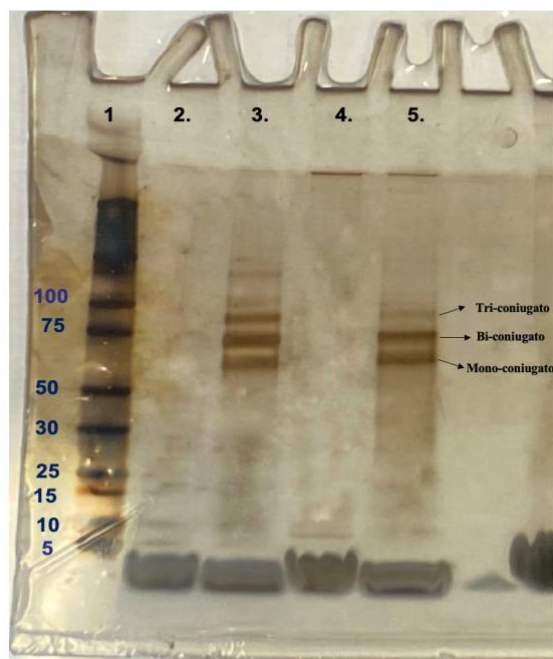


Figura 2.4: SDS-PAGE in condizioni non riducenti con colorazione all'argento; Schema di caricamento: #1 Standard; #2 SL-DXR_{misti}; #3 SIL-DXR_{misti}; #4 SL-DXR_{5kDa}; #5 SIL-DXR_{5kDa}

Come mostrato in *Figura 2.4*, si può confermare che la porzione F(ab)' è stata correttamente inserita nel bilayer liposomiale, data la differenza, per ogni formulazione, con il controllo, ossia formulazioni che non hanno subito la post-insertion (*pozzetti #2; #4*). Per le formulazioni del pozzetto #3 e #5 inoltre, si conferma la corretta purificazione, avvenuta in seguito ad eluizione in colonna CL-4B, data l'assenza della banda di F(ab)' che invece è presente nella miscela di PEGilazione (*Figura 2.3*). Si può confermare, quindi, la presenza sulla superficie dei tre diversi coniugati ottenuti con la reazione di PEGilazione, come discusso nel paragrafo precedente.

2.5 Quantificazione di F(ab)' su SIL

Una volta confermata la presenza di F(ab)' nelle formulazioni finali, se ne valuta la concentrazione grazie al saggio del *micro-BCA* (Paragrafo 4.2.4 "Metodi"). In seguito alla determinazione del quantitativo finale di HSPC con il saggio di Stewart e la determinazione della concentrazione particellare al DLS, è stato possibile calcolare il numero di molecole di F(ab)' in superficie e la relativa concentrazione.

Per la retta di taratura sono state preparate concentrazioni crescenti di TRS (0,1 ug/mL – 2,5 ug/mL – 5 ug/mL – 10 ug/mL – 20 ug/mL); PBS 1x pH=7,4 e H₂O milliQ sono stati entrambi utilizzati come bianchi. Per la determinazione di F(ab)' su SIL_{misti/5kDa} sono stati analizzati SL_{misti/5kDa} vuoti e caricati con il farmaco con l'obiettivo di rimuovere il contributo di HSPC e DXR dal campione di SIL. Le relative assorbanze e concentrazioni sono riportate in *tabella 2.5.1*.

SIL_{misti}	$ABS_{finale} = 0,119$ Retta di taratura: $y = 0,005x - 0,0356$ $R^2 = 0,9987$ [F(ab)'] = 14,36 ug/mL
SIL_{5kDa}	$ABS_{finale} = 0,131$ Retta di taratura: $y = 0,005x - 0,0356$ $R^2 = 0,9987$ [F(ab)'] = 10,82 ug/mL

Tabella 2.5.1 Concentrazione finale di F(ab)' per SIL_{misti/5kDa}

Il saggio del micro-BCA determina una concentrazione di F(ab)' = 0,143 mg/mL per SIL_{misti} e 0,108 mg/mL per SIL_{5kDa}, le quali corrispondono rispettivamente a circa 14 e 16 molecole di F(ab)' per ogni liposoma.

3. STUDI IN VITRO DELLE FORMULAZIONI

3.1 Studi di stabilità a lungo termine

Lo studio (Paragrafo 5.1 “Metodi”) è stato svolto su formulazioni SL/SIL sia con PEG misto (2 kDa/5 kDa) che 5 kDa, con l’obiettivo di valutare un’eventuale tendenza all’aggregazione di entrambe le tipologie di formulazione e la stabilità nel tempo. Le formulazioni sono state conservate in PBS 1x pH=7,4 a 4°C e 25°C, con l’aggiunta di sodio azide per evitare la contaminazione del campione.

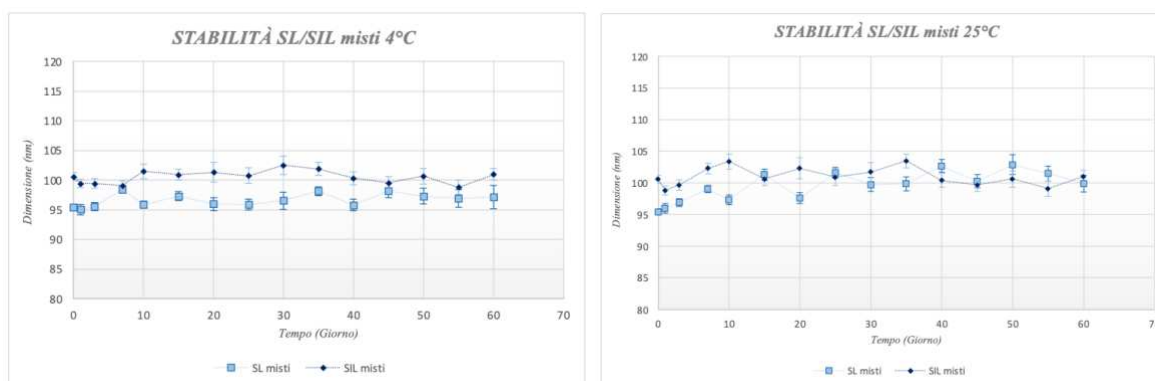


Figura 3.1.1 Stabilità nel tempo di SL_{misti} in azzurro e SIL_{misti} in blu a 4° (sinistra) e 25°C (destra)

Si evince dalla Figura 3.1.1 che sia a 4°C che a 25°C, per le formulazioni SL/SIL con PEG superficiale con lunghezza di 2kDa, la stabilità è garantita in modo ottimale. Gli stessi valori di PDI compresi tra 0,03 e 0,09 (Tabella 3.1.1) nell’arco dei due mesi confermano la resistenza all’aggregazione.

SL_{misti}

GIORNO	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 4°	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 25°
0	95,44	0,28	0,0376	95,44	0,47	0,0376
1	95,08	0,87	0,0501	96,03	0,76	0,0559
3	95,55	0,64	0,0382	96,92	0,62	0,0421
7	98,47	0,67	0,0544	99,07	0,55	0,0498
10	95,92	0,58	0,0298	97,31	0,78	0,0286
15	97,31	0,77	0,0761	101,3	0,92	0,1593
20	95,97	1,1	0,0473	97,64	0,85	0,0119
25	95,89	0,91	0,0247	101,6	0,87	0,0914
30	96,55	1,44	0,0327	99,75	1,095	0,0631
35	98,16	0,74	0,0571	99,88	1,09	0,0062
40	95,81	0,98	0,0452	102,7	0,98	0,0535
45	98,23	1,19	0,0329	100,3	1,032	0,0942
50	97,32	1,34	0,0784	102,9	1,56	0,0874
55	96,95	1,497	0,0984	101,5	1,21	0,0855
60	97,17	1,99	0,0736	98,89	1,36	0,0895

SIL_{misti}

GIORNO	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 4°	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 25°
0	100,6	0,68	0,0604	100,6	0,62	0,0604
1	99,45	0,73	0,0742	98,83	0,57	0,0852
3	99,43	0,81	0,0941	99,67	0,52	0,0924
7	99,1	0,83	0,0852	102,3	0,42	0,0851
10	101,5	1,21	0,0893	103,4	1,3	0,0305
15	100,95	0,97	0,0853	100,62	0,73	0,0878
20	101,34	1,64	0,0886	102,32	1,22	0,0793
25	100,78	1,34	0,0911	100,91	1,74	0,0782
30	102,54	1,53	0,0734	101,72	1,41	0,0734
35	101,92	1,09	0,0375	103,5	1,28	0,0854
40	100,37	1,094	0,0354	100,4	1,53	0,0532
45	99,52	1,04	0,0535	99,67	1,42	0,0643
50	100,66	1,31	0,0743	100,63	1,09	0,0743
55	98,81	1,21	0,0859	99,12	0,988	0,0732
60	100,96	0,97	0,0864	101,03	1,14	0,0932

Tabella. 3.1.1 Valori tabulati in termini di dimensioni, σ e PDI, per le formulazioni SL/SIL_{misti} a 4°C (sinistra) e 25°C (destra)

La medesima condizione di stabilità si conferma anche con le formulazioni SL/SIL con PEG da 5kDa, come mostrato in *Figura 3.1.2*.

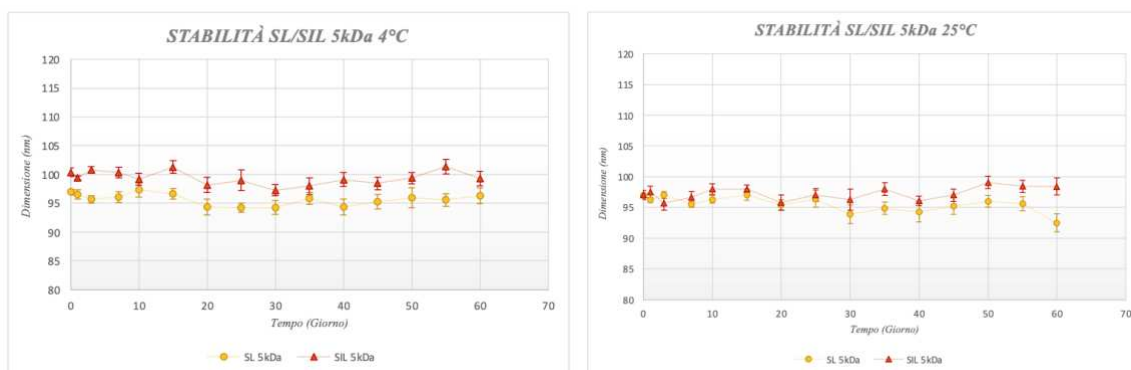


Figura 3.1.2 Stabilità nel tempo di SL_{5kDa} in giallo e SIL_{5kDa} in rosso a 4° (sinistra) e 25°C (destra)

Anche il valore di PDI risulta inferiore a 0,15 indice di assenza di aggregazione (*Tabella 3.1.2*).

SL_{5kDa}

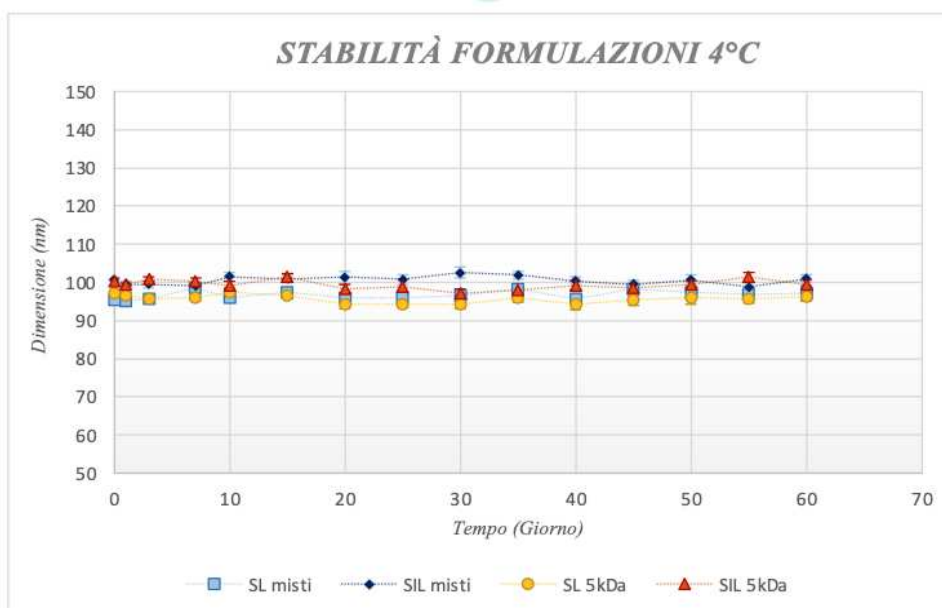
GIORNO	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 4°	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 25°
0	96,98	0,51	0,0427	96,98	0,51	0,0427
1	96,53	0,43	0,0356	96,28	0,82	0,0549
3	95,74	0,57	0,0673	97,03	0,63	0,0584
7	99,1	0,47	0,0937	95,53	0,95	0,1145
10	100,3	0,63	0,0753	96,32	1,2	0,0563
15	98,65	0,89	0,0726	97,09	0,92	0,0978
20	94,36	0,86	0,0625	95,45	1,336	0,0736
25	93,22	1,34	0,0653	96,42	0,78	0,0853
30	94,27	1,52	0,0783	93,89	1,21	0,0941
35	95,86	0,98	0,0815	94,88	1,04	0,0841
40	94,32	1,67	0,0758	94,32	1,37	0,0851
45	95,27	1,41	0,0843	95,27	1,28	0,0911
50	96,02	0,97	0,0924	96,02	1,72	0,0944
55	95,61	1,11	0,0875	95,61	1,09	0,0911
60	96,32	1,485	0,0753	95,03	1,34	0,0842

SIL_{5kDa}

GIORNO	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 4°	Dimensione (nm)	Dev STD	PDI 25°
0	96,98	0,76	0,0968	97,08	0,76	0,0967
1	96,53	0,35	0,0874	97,52	0,93	0,0948
3	95,74	0,56	0,0932	95,74	1,21	0,0236
7	96,1	0,92	0,0847	96,63	1,02	0,0628
10	97,3	1,03	0,0951	97,99	0,87	0,0754
15	96,65	1,12	0,0869	98,04	0,62	0,0573
20	94,36	1,32	0,0445	95,78	1,22	0,0623
25	94,22	1,78	0,0623	97,04	1,09	0,0523
30	94,27	0,98	0,0654	96,31	1,72	0,0743
35	95,86	1,42	0,0755	98,02	1,07	0,0743
40	94,32	1,22	0,0581	96,07	0,77	0,0551
45	95,27	1,06	0,0543	97,01	0,99	0,0664
50	96,02	0,98	0,0505	99,09	1	0,0712
55	95,61	1,26	0,0467	98,43	1,04	0,0835
60	96,32	1,31	0,0429	98,42	1,34	0,0911

Tabella. 3.1.2 Valori tabulati in termini di dimensioni, σ e PDI, per le formulazioni SL/SIL_{5kDa} a 4°C (sinistra) e 25°C (destra)

Per tutte le formulazioni (Figura 3.1.3), quindi, nell'arco di 2 mesi, le dimensioni rimangono costanti nel tempo, con una variazione di pochi nm, data dall'errore strumentale, e un PDI sempre inferiore al valore di aggregazione. Questo conferma che sia il PEG da 2kDa che da 5kDa prevengono l'aggregazione, sia a temperatura di conservazione che a temperatura ambiente.



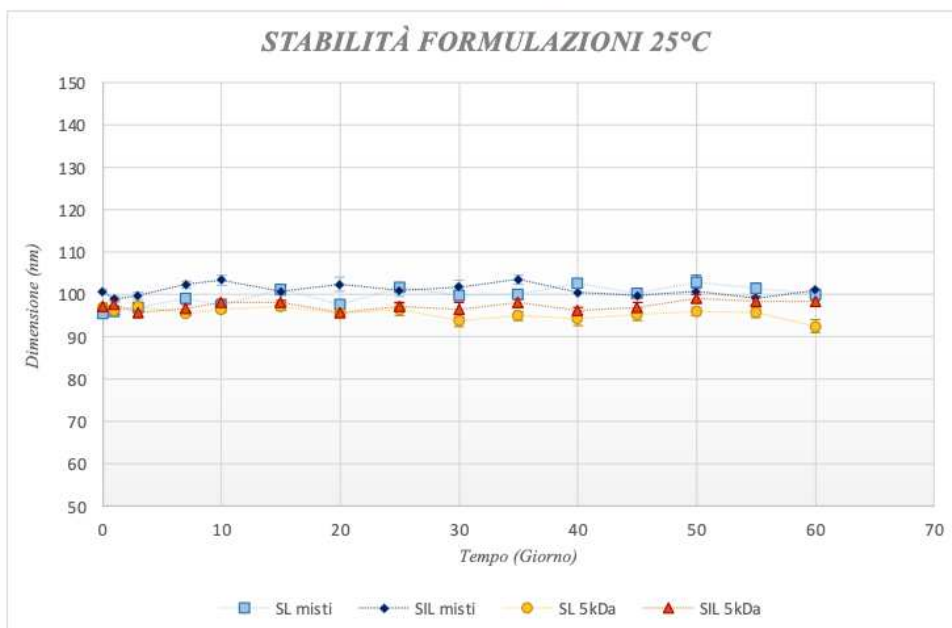


Figura 3.1.3 Confronto della stabilità di tutte le formulazioni a 4°C (sopra) e 25°C (sotto)

3.2 Studi di rilascio del farmaco

L'obiettivo degli studi di rilascio è valutare l'eventuale perdita precoce del farmaco, sia in ambiente fisiologico rappresentato dal buffer PBS 1x pH = 7,4, sia a livello tumorale, con PBS 1x pH= 5,5. Le sospensioni liposomiali vengono diluite nell'opportuno buffer a una concentrazione di 1mM in 500 uL e analizzate per 16 ore allo *spettrofluorimetro JASCO FP-6500*. Per il settaggio dello strumento e la conduzione dell'analisi si rimanda al *Paragrafo 5.2 "Metodi"*.

Per quanto riguarda il rilascio del farmaco in ambiente fisiologico, per entrambe le formulazioni SL/SIL sia con PEG misto che 5kDa, l'andamento è simile e ben delineato. Come si deduce dalla *Figura 3.2.1* per entrambi le formulazioni abbiamo un rilascio del farmaco praticamente nullo, che non supera mai una percentuale del 0,05-0,1%.

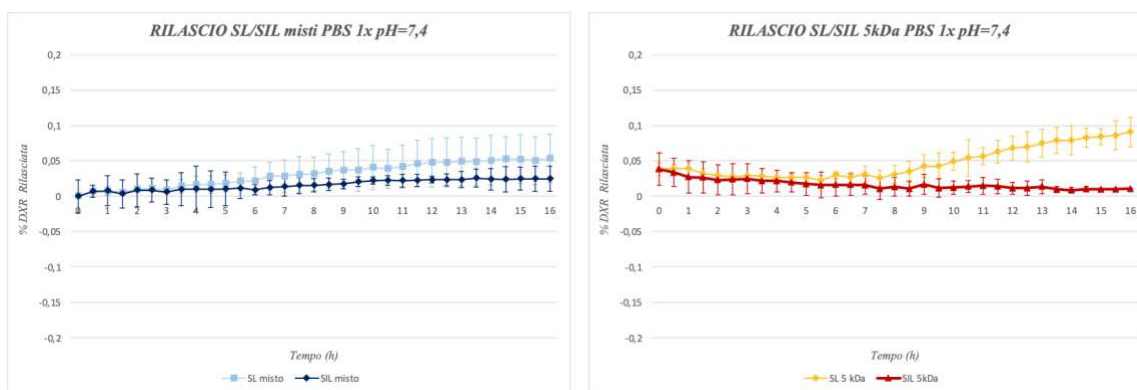


Figura 3.2.1 Studio di rilascio in PBS 1x pH=7,4, 37°C; a sinistra SL_{misti} in azzurro e SIL_{misti} in blu; a destra SL_{5kDa} in giallo e SIL_{5kDa} in rosso.

Per quanto riguarda gli immunoliposomi il rilascio è tendente allo zero e molto lineare nel tempo, probabilmente grazie alla maggior rigidità del bilayer liposomiale data dalla presenza di circa 14-16 molecole di F(ab)'-PEG-DSPE. Non vi è sostanziale differenza in termini di rilascio tra le due tipologie di formulazioni, come mostrato in *Figura 3.2.2*

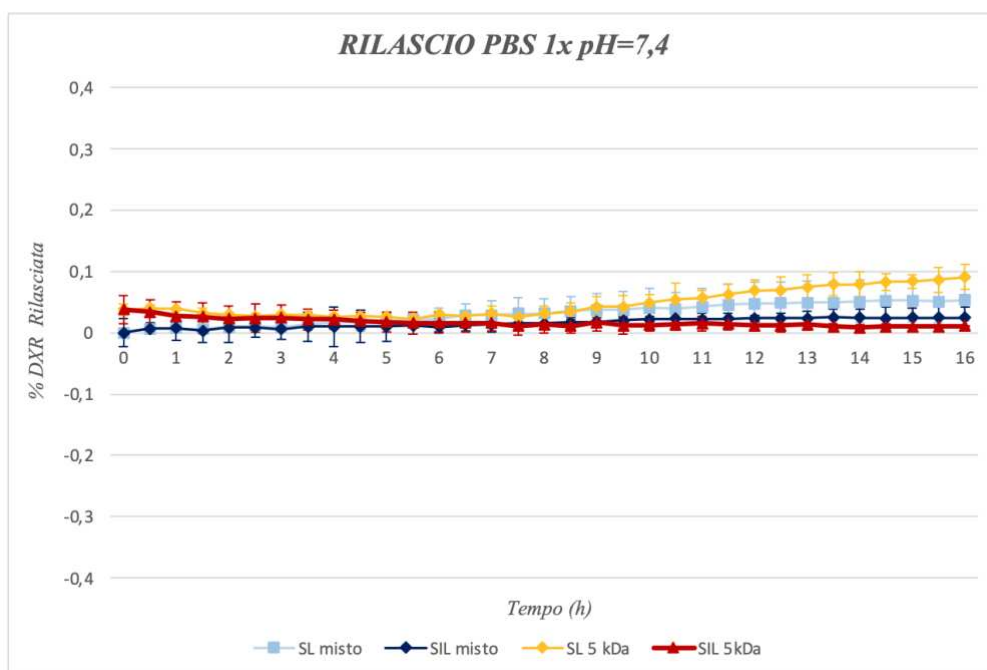
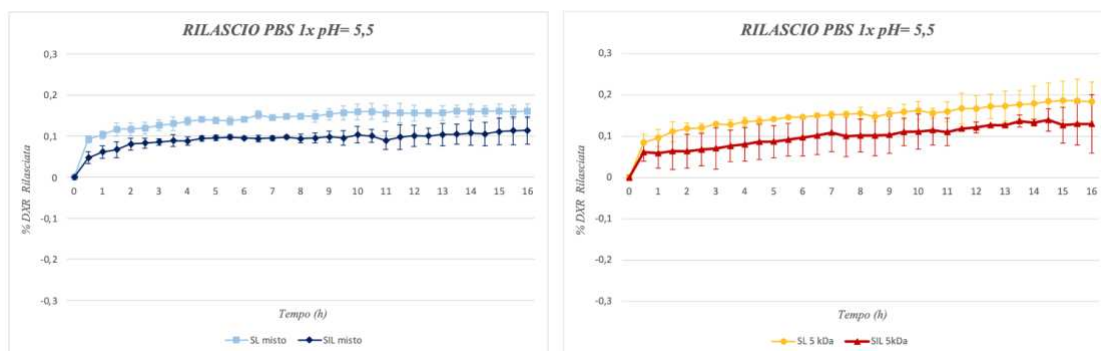


Figura 3.2.2 Confronto di rilascio tra tutte le formulazioni; SL_{misti} in azzurro SIL_{misti} in blu; SL_{5kDa} in giallo; SIL_{5kDa} in rosso.

A valori di pH inferiori, ossia in un ambiente di pH che mima quello tumorale, il rilascio risulta essere leggermente maggiore per tutte le formulazioni. Il rilascio assume un

determinato andamento caratterizzato da un rapido aumento nelle prime ore, per poi stabilizzarsi e rimanere pressoché costante per tutta la durata dell'analisi. (Figura 3.2.3)



A

Figura 3.2.3 Studio di rilascio in PBS 1x pH=5,5; 37°C; a sinistra SL_{misto} in azzurro e SIL_{misto} in blu; a destra SL_{5kDa} in giallo e SIL_{5kDa} in rosso.

I valori di rilascio sono superiori ai precedenti, probabilmente a causa del pH più acido. I valori non superano mai una percentuale dello 0,2%, determinando un rilascio considerabile, anche in questo caso, come nullo. Similmente all'ambiente fisiologico, anche a valori di pH del buffer più acidi, gli immunoliposomi risultano essere più stabili rispetto alle relative formulazioni senza anticorpo, per le peculiarità elencate precedentemente. (Figura 3.2.4)

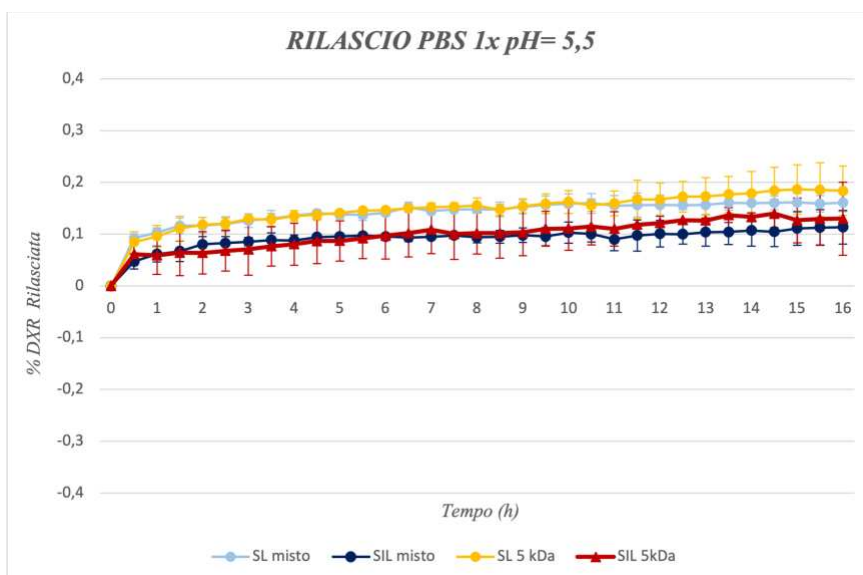


Figura 3.2.4 Confronto di rilascio tra tutte le formulazioni; SL_{misto} in azzurro SIL_{misto} in blu; SL_{5kDa} in giallo; SIL_{5kDa} in rosso.

3.3 Studi di opsonizzazione

Lo studio di opsonizzazione è stato condotto con lo scopo di determinare qualitativamente la resistenza all'azione delle proteine corona del plasma, determinata dalla presenza superficiale del PEG. Sono state confrontate le formulazioni preparate con PEG da 2kDa e da 5kDa, valutando se la presenza stessa dell'anticorpo sulla superficie liposomiale potesse influenzare l'opsonizzazione. I liposomi SL/SIL_{misti}, SL/SIL_{5kDa} e anche i liposomi costituiti da soli HSPC e colesterolo (SL_{noPEG}) sono stati incubati in plasma murino secondo quanto presentato precedentemente al *Paragrafo 5.4 "Metodi"*.

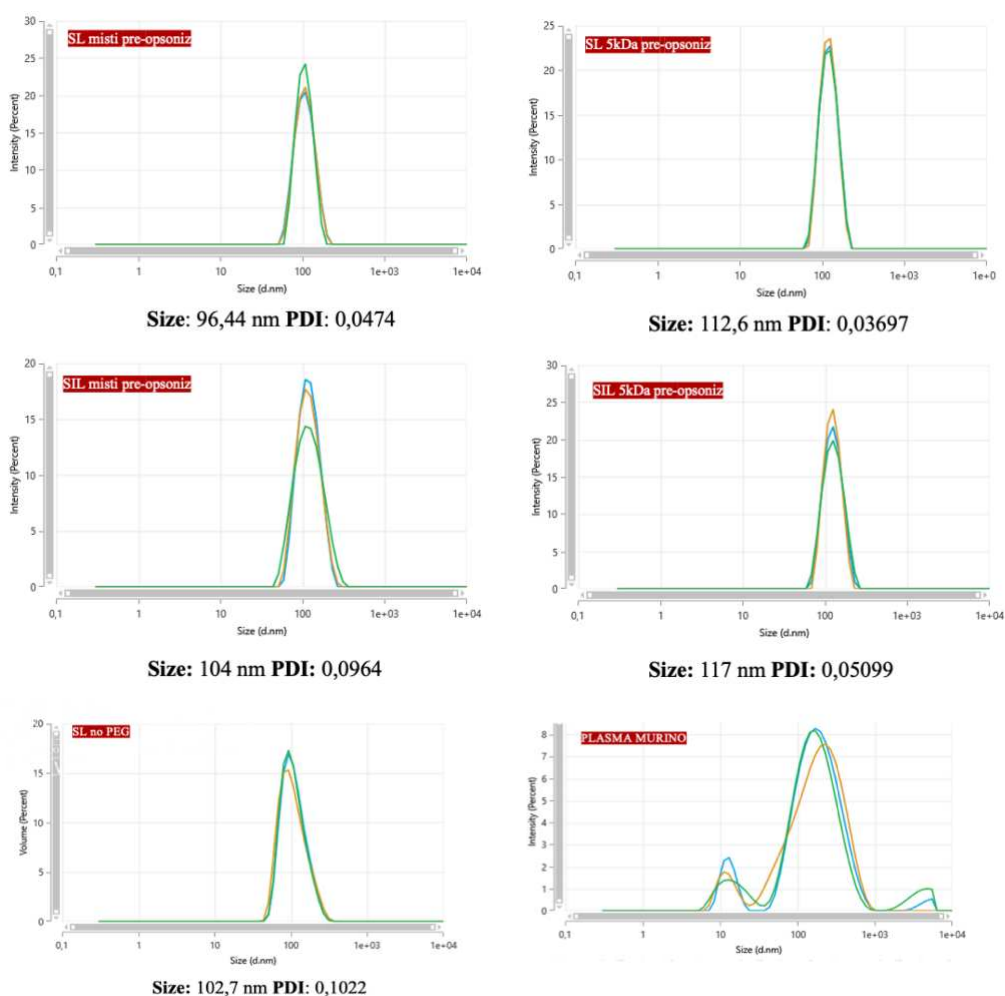


Figura 3.3.1 Analisi DLS precedentemente all'incubazione in plasma di tutte le formulazioni

Le analisi DLS condotte precedentemente all'incubazione in plasma hanno lo scopo di permettere un confronto in termini di stabilità dimensionale e aggregazione in seguito all'adsorbimento delle proteine del plasma (*Figura 3.3.1*).

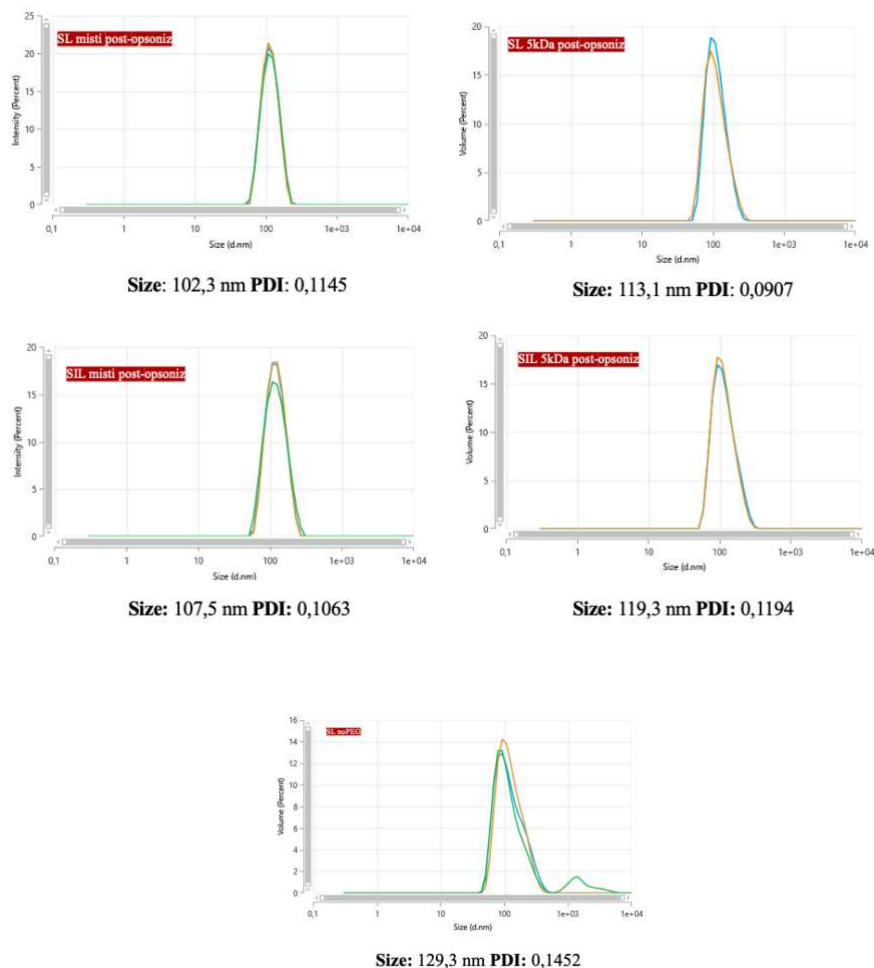


Figura 3.3.2 Analisi DLS successivamente all'incubazione in plasma di tutte le formulazioni

Si deduce dal confronto tra le analisi al DLS pre e post incubazione (*Figura 3.3.2*), che le formulazioni liposomiali dotate di PEG, anche in seguito ad opsonizzazione mantengono relativamente costante la loro dimensione media, la quale varia di pochi nm. Si ha un leggero aumento del grado di polidispersività ma comunque inferiore al valore di 0.15. Solamente la formulazione senza polimero stealth subisce una variazione dimensionale tale da dedurre adsorbimento di proteine.

La presenza delle proteine plasmatiche adsorbite sui liposomi, è stata valutata qualitativamente tramite SDS-PAGE con colorazione all'argento. (Paragrafo 4.1.1.3 "Metodi")

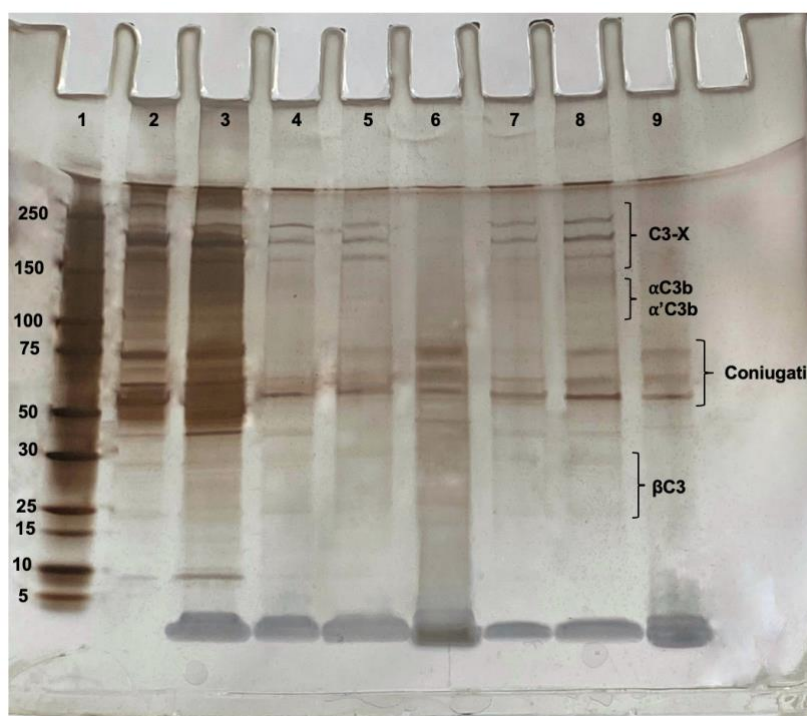


Figura 3.3.3: SDS-PAGE in condizioni non riducenti con colorazione all'argento; Schema caricamento: #1 Standard; #2 Plasma; #3 SL_{noPEG} #4 $SL_{misti/plasma}$; #5 $SIL_{misti/plasma}$; #6 $SIL_{misti\ puri}$; #7 $SL_{5kDa/plasma}$; #8 $SIL_{5kDa/plasma}$; #9 $SIL_{5kDa\ puri}$

Nella Figura 3.3.3 si evidenzia nel pozzetto #3 la netta differenza di risposta all'opsonizzazione per il film liposomiale privo di PEG, il quale dal punto di vista quantitativo risulta in possesso di un maggior numero di proteine plasmatiche adsorbite in superficie. Contrariamente, non si nota sostanziale differenza tra le formulazioni con polimero misto e da 5kDa. Infatti, entrambe risultano qualitativamente e quantitativamente confrontabili in termini di resistenza all'opsonizzazione. Per presa visione e confronto con altri articoli e studi si sono individuati nel gel i maggiori esponenti del sistema del complemento: il sistema proteico C3 e i relativi prodotti di attivazione con le subunità alpha e beta. Quest'ultimi sono i responsabili del richiamo e attivazione della fagocitosi.^{42,43} Rispetto al pozzetto #2 contenente plasma murino puro, nelle formulazioni si nota un arricchimento di proteine C3-X, *hard corona*, le quali si ancorano tenacemente al bilayer fosfolipidico. Le *soft corona*, invece, di dimensioni ridotte ed evidenziate a valori inferiori di 50kDa, sono meno rappresentate data la loro poca affinità ed elevata

costante di dissociazione. Le bande a 60, 70 e 80kDa circa potrebbero rappresentare rispettivamente i mono, bi e tri coniugati di F(ab)' PEGilato, come confermato per confronto con i pozzetti #6 e #9 contenenti gli immunoliposomi non trattati in plasma. Le bande non rappresentano esclusivamente i coniugati, per la presenza delle stesse anche nel plasm.

Le formulazioni dotate di PEG si confermano quindi, maggiormente resistenti all'azione delle proteine plasmatiche rispetto ai liposomi privi di polimero superficiale. Esse mantengono difatti un basso profilo di adsorbimento superficiale e stabilità in termini di dimensione, evitando l'aggregazione. Inoltre, non ci sono differenze dovute alla presenza dell'agente di targeting.

DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo progetto di tesi è la formulazione, caratterizzazione e studio di sistemi di drug delivery che ottimizzino la veicolazione del farmaco *Doxorubicina* a livello delle cellule tumorale del cancro ovarico, sovra esprimenti il recettore *HER2* (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*). Nello specifico, i sistemi di delivery coinvolti comprendono *Liposomi Stealth (SL)* e *Super Stealth (SSL)* e *Immunoliposomi Stealth (SIL)* e *Super Stealth (SSIL₂)* nella cui superficie presentano la porzione F(ab)' dell'anticorpo monoclonale *Trastuzumab (Herceptin®)*, in grado di riconoscere selettivamente HER2.

Il cancro ovarico è considerato ad oggi una delle più frequenti neoplasie per il sesso femminile, provoca tutt'ora migliaia di decessi l'anno solo in Italia. I trattamenti attualmente utilizzati sono principalmente la chirurgia, la chemioterapia e la chemioterapia neoadiuvante con un regime di combinazione carboplatino/paclitaxel. Tutti questi approcci sono però caratterizzati da metodi poco selettivi che portano a diversi effetti collaterali che possono compromettere l'efficacia terapeutica stessa e peggiorare, a volte, il quadro clinico del paziente. Nel corso degli anni la ricerca ha provato a aggirare le problematiche dei trattamenti esistenti esplorando il campo della nanomedicina, sistemi con dimensioni nanometriche in grado di agire da piattaforme di veicolazione di farmaci antitumorali in grado di conferire selettività nei confronti delle cellule cancerose. Questi sistemi migliorano la concentrazione del farmaco sul sito bersaglio e ne rendono la somministrazione specifica per le cellule cancerose mediante meccanismi di targeting attivi o passivi, determinando una riduzione degli effetti collaterali alle cellule sane.

Le formulazioni liposomiali coinvolte in questo progetto agiscono in modo differenziale a livello tumorale. Le formulazioni liposomiali prive di anticorpo (SL) agiscono tramite targeting passivo, sfruttando l'effetto *EPR (enhanced permeability and retention effect)*, mentre le formulazioni dotate di specificità di targeting, grazie alla presenza

dell'anticorpo nella loro superficie, riconoscono attivamente il recettore HER2 sovra espresso nelle cellule tumorali.

Tutte le formulazioni sono dotate di natura stealth, per la presenza superficiale di PEG, un polimero idrofilico, biocompatibile in grado di offrire numerosi vantaggi dal punto di vista farmacocinetico. Il polimero favorisce la stabilità del liposoma riducendone la tendenza all'aggregazione e all'adsorbimento. La presenza superficiale di PEG conferisce resistenza all'opsonizzazione da parte delle proteine e immunoglobuline plasmatiche, permettendo di aggirare l'eliminazione dei liposomi mediata dal RES. Nella fase di formulazione si è differenziata la dimensione del PEG superficiale agente da cover per il bilayer fosfolipidico, determinando la formazione così di SL_{misti} dotati di *mPEG-DSPE* da 2kDa e SL_{5kDa} con *mPEG-DSPE* da 5kDa. Per le formulazioni super stealth invece si è utilizzato un dendrone a base di *mPEG-DPSE₂*, il quale data la duplice presenza di DSPE determina un maggior ancoraggio del polimero stealth al bilayer, e miglior stabilità. Gli immunoliposomi sono costituiti da una molecola di *Mal-PEG_{5kDa}-DSPE* per $SIL_{misti/5kDa}$ e *Mal-PEG_{5kDa}-DSPE₂* per la versione super stealth $SSIL_2$, in grado di reagire con i gruppi tiolici liberi della porzione *F(ab)'* di *Trastuzumab*. Queste forme di lipopolimero, rispettivamente *F(ab)'*- *Mal-PEG_{5kDa}-DSPE* e *F(ab)'*- *Mal-PEG_{5kDa}-DSPE₂*, sono responsabili del riconoscimento specifico del recettore HER2 nel suo dominio extracellulare.

Il farmaco antitumorale utilizzato è la *Doxorubicina*: essa viene caricata con la tecnica del *remote loading* che richiede la creazione di un gradiente transmembrana di ammonio solfato. Questa incapsulazione permette al farmaco di conservare le sue caratteristiche chimico-fisiche e la sua citotossicità, riducendo gli effetti collaterali, specialmente la cardiotossicità. Le formulazioni liposomiali prive di anticorpo raggiungono le cellule tumorali bersaglio grazie all'effetto EPR, vengono così internalizzate grazie alla fusione di membrana e rilasciano il farmaco solamente nell'ambiente intracellulare, dove è in grado di ridurre la proliferazione inducendo apoptosi. Gli immunoliposomi, invece, vengono internalizzati per endocitosi in seguito al legame con il recettore HER2, determinando rilascio intracellulare dell'agente citotossico.

I film lipidici di tutte le formulazioni sono composti da di-stearoilglicerol fosfatidilcolina idrogenata di soia (HSPC), colesterolo e differenti tipologie di PEG in base al tipo di formulazione, come precedentemente introdotto. Il rapporto molare tra le formulazioni risulta invariato, corrispondente a 16 : 8 : 1 (HSPC : CHOL : mPEG_n-DSPE_n). Tutte le formulazioni si ottengono con la tecnica del *thin layer evaporation*. Per quanto riguarda l'incapsulazione del farmaco il rapporto tra HSPC : DXR è del 20% p/p. L'efficienza di incapsulazione per tutte le formulazioni avviene a 60°C per un ora e un quarto, con una resa sempre superiore al 90%.

L'agente di targeting $F(ab)'$ -Mal-PEG_{5kD}-DSPE_n è stato ottenuto per addizione tiolica di Michael tra $F(ab)'$ e la soluzione commerciale del derivato maleimmidico di PEG. Nello specifico l'anticorpo monoclonale Trastuzumab subisce una reazione di digestione enzimatica ad opera della pepsina con il fine di rimuovere la porzione cristallina (Fc) adibita al coinvolgimento del sistema immunitario dell'ospite. Il prodotto $F(ab)_2$ ottenuto viene infine ridotto a $F(ab)'$ con cisteamina. La reazione raggiunge la sua massima resa di reazione a pH=7,4, in condizioni di sostituzione dell'ambiente ossigenato con N₂. Questa operazione riduce la capacità riossidante di $F(ab)'$ e ne aumenta la resa. Tutti i frammenti ottenuti vengono analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio, SDS-PAGE con colorazione al *Coomassie Brilliant blue*. La miscela di PEGhilazione di $F(ab)'$ invece viene valutata con colorazione allo iodio per risaltare il PEG presente. I risultati mostrano come la reazione di Michael avvenga su entrambi i gruppi tiolici disponibili, portando alla formazione del derivato mono e bi coniugato. Inoltre, si nota la formazione, seppur in minor percentuale relativa, di tri-coniugato. Il gruppo vinilico della maleimmide reagisce con un gruppo amminico di una Lys nella porzione terminale della hinge region formando il tri-derivato. La resa di PEGhilazione non è massima, per la riossidazione spontanea dei gruppi tiolici di $F(ab)'$, separati nella regione cerniera da due proline⁴⁰, e in grado di chiudersi tra loro e impedirne la formazione del derivato. Infine, alcune molecole di $F(ab)'$ si riossidano a formare $F(ab)_2$, confermato dalla lieve banda presente a circa 100kDa.

La presenza attuale dell'anticorpo sulla superficie liposomiale, in seguito alla tecnica della *post-insertion*, viene valutata con SDS-PAGE con colorazione all'argento. I risultati mostrano che sia l'inserzione che la purificazione con Sepharose CL-4B sono avvenute con successo. Dalla presa visione del gel si conferma l'inserzione di tutti i tre i derivati.

Per confronto con le precedenti inserzioni si convalida la corretta purificazione della miscela di reazione sia per SIL_{misti} che SIL_{5kDa}, dove è assente la banda a 50kDa indice della presenza di F(ab)', il quale rimaneva precedentemente adsorbito sulla superficie dei liposomi.

La concentrazione dell'anticorpo nelle formulazioni finali viene valutata mediante il test del micro-BCA, che conferma la presenza delle proteine.

Tramite questo saggio si è infine, valutata l'efficienza di inserzione, della porzione F(ab)' su entrambe le formulazioni, la quale risulta essere simile sia per SIL_{misti} che SIL_{5kDa}. Il risultato conferma che la differente lunghezza di PEG superficiale non ostacola in maniera differenziale, dal punto di vista sterico, l'inserzione dell'anticorpo. Infatti, per SIL_{misti} si inseriscono all'incirca 14 molecole di F(ab)' per liposoma e 16 per SIL_{5kDa}.

Per tutte le formulazioni sono state valutate le condizioni di stabilità, resistenza all'aggregazione e eventuale rilascio del farmaco.

Per quanto riguarda la stabilità nel tempo, le formulazioni sono state preparate nel buffer di conservazione a pH=7,4 ad una concentrazione 3mM in termini di HSPC con una percentuale del 0,05% di NaN₃. Sono state conservate per 60 giorni sia a temperatura ambiente che a 4°C in frigo, e se ne è presa visione delle dimensioni ogni 5 giorni con la tecnica del *DLS*. Dai grafici riportati, si evince che le formulazioni, per tutta la durata dello studio, mostrano dimensioni pressoché costanti, al netto dell'errore strumentale. Il dato conferma che sia il mPEG-DSPE superficiale da 2kDa che da 5kDa previene con successo la formazione di aggregati e conferisce in egual modo stabilità a tutte le formulazioni.

Anche in termini di rilascio, la differenza dimensionale di PEG superficiale non influisce sulla capacità del film liposomiale di rimanere saldo nella perdita precoce di farmaco. Infatti, sia a pH fisiologico, rappresentato da PBS 1x pH=7,4 che a pH acido tumorale, PBS 1x pH=5,5; il rilascio si aggira ad una percentuale che varia dal 0,1 al 0,2 %, in termini di doxorubicina. La crescita rapida a pH acido può essere giustificata da un iniziale destabilizzazione del film liposomiale, per poi garantire un rilascio costante nel

tempo. Si esclude, quindi, un rilascio del precoce del farmaco dato le percentuali di doxorubicina trascurabili. Le formulazioni rilasciano solamente in seguito a internalizzazione e distruzione del bilayer liposomiale, con conseguente liberazione del farmaco in grado di determinare poi l'attività citotossica.

Il PEG, polimero superficiale caratteristico di ogni formulazione, ha confermato la propria capacità di donare proprietà stealth ai liposomi, per quanto concerne la resistenza alle proteine corona plasmatiche. Esse sono infatti responsabili del fenomeno dell'opsonizzazione, coinvolto nei meccanismi di immunità innata, i quali permettono di evidenziare un elemento non-self, attivare l'azione del sistema immunitario dell'ospite e infine di coadiuvare un processo difensivo che termina con la fagocitosi dell'elemento stesso.

È stato eseguito uno studio qualitativo sull'opsonizzazione incubando in plasma murino ogni formulazione con le proprie differenze dimensionali di polimero superficiale e confrontate con una formulazione priva di PEG. All'analisi dimensionale tutte le formulazioni risultano stabili anche in seguito all'adsorbimento di proteine del complemento plasmatiche, confermando l'azione protettiva del PEG. Questo difatti non avviene per la formulazione SL_{noPEG} . Dall'analisi visiva del gel non si deduce sostanziale divario tra formulazione SL/SIL_{misti} e SL/SIL_{5ka} , confermando che la differenza di pochi kDa tra i due diverse molecole di mPEG-DSPE non influisce sulla resistenza all'adsorbimento. Si nota un arricchimento rispetto al plasma, del principale componente del sistema del complemento, ossia le proteine C3-X, classificate come *hard corona*. Contrariamente risultano poco presenti in superficie le *soft corona*. Questo probabilmente dovuto alla differente affinità che le due tipologie di proteine corona hanno nei confronti della superficie liposomiale. Le hard corona difatti hanno elevata affinità, e creano legami maggiormente stabiliti con la nanoparticella e sono dotate di bassa costante di dissociazione. Durante la separazione in *Sepharose CL-4B* presumibilmente le soft corona perdono la capacità di rimanere adese alla superficie liposomiale, e vengono ritenute dalla fase stazionaria della resina, risultando meno rappresentate nel campione.

Studi futuri in vitro e in vivo, sulle formulazioni SL/SIL_{misti}, saranno eseguiti con l'obiettivo di investigare la possibile aumentata capacità di legame con il recettore HER2, rispetto alle formulazioni SL/SIL_{5kDa} con la medesima dimensione di PEG superficiale e molecola linker.

Infine, la sintesi di un dendrone a base di *mPEG*_{2kDa}-*DSPE*₂ rappresenta la tappa successiva per la realizzazione di formulazioni di immunoliposomi super stealth misti (SSIL_{2 misti}), caratterizzati da una dimensione ridotta di PEG superficiale e una attività citotossica potenzialmente maggiore determinata dall'incremento della forza di ancoraggio di F(ab)', grazie alla doppia molecola di DSPE.

RIFERIMENTI

1. *Tumore ovarico-IRCCS Ospedale San Raffaele;*
2. *Tumore dell'ovaio, sintomi, prevenzioni, cause, diagnosi – AIRC;*
3. *I numeri del cancro in Italia, 2022 – Associazione Italiana di Oncologia Medica;*
4. Meinhold-Heerlein, I., Hauptmann, S. *The heterogeneity of ovarian cancer.* Arch Gynecol Obstet 289, 237–239 (2014);
5. Alexander Burges, Dr. med. and Barbara Schmalfeldt, Prof. Dr. med. *Ovarian Cancer* - Dtsch Arztebl Int. 2011 Sep; 108(38): 635–641. Published online 2011 Sep 23. doi10.3238/arztebl.2011.0635;
6. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer - *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls.* - Lancet. 2008; 371: 303-314;
7. Scully RE, Young RH, Clement PB (1998) – *Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament.* – in: Atlas of tumor pathology, 3rd series, fasc 23. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC;
8. Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., & Nakano, H. (2003). *Histological classification of ovarian cancer.* Medical Electron Microscopy, 36(1), 9–17. doi: 10.1007/s007950300002;
9. Sternberg SS, Mills SE (1991) – *Surgical pathology of the female reproductive system and peritoneum.* – Raven, New York;

10. Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., & Nakano, H. (2003). *Histological classification of ovarian cancer*. Medical Electron Microscopy, 36(1), 9–17. doi: 10.1007/s007950300002;
11. *Linee Guida Tumori all'ovaio- Società Italiana di Ginecologia e ostetricia*;
12. Meinhold-Heerlein, I., Hauptmann, S. *The heterogeneity of ovarian cancer*. Arch Gynecol Obstet 289, 237–239 (2014);
13. Rooth, C. (2013). *Ovarian cancer: risk factors, treatment and management*. British Journal of Nursing, 22(Sup17), S23–S30. doi: 10.12968/bjon.2013.22.sup;
14. Colombo N, Sessa C, du Bois A, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, Morice P, Pignata S, Ray-Coquard I, Vergote I, Baert T, Belaroussi I, Dashora A, Olbrecht S, Planchamp F, Querleu D; ESMO-ESGO Ovarian Cancer Consensus Conference Working Group. *ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease*. Ann Oncol. 2019 May 1;30(5):672-705;
15. Hang AQ, Wu J, Bi F, Zhang YJ, Xu LR, Li LL, et al. *Relationship between HER2 and JAK/STAT-SOCS3 signaling pathway and clinicopathological features and prognosis of ovarian cancer*. Cancer biology & therapy. 2017:1–9;
16. Kim SK, Cho NH. *HER2-positive mucinous adenocarcinomas of the ovary have an expansile invasive pattern associated with a favorable prognosis*. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Jun 15;7(7):4222-30. PMID: 25120802; PMCID: PMC4129037;
17. Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications* - Molecular Biology International, 2014, 1–9. doi: 10.1155/2014/852748;

18. Arteaga, C. L., & Engelman, J. A. (2014). ERBB Receptors: From Oncogene *Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics* - *Cancer Cell*, 25(3), 282–303. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.02;
19. Miricescu, D.; Totan, A.; Stanescu-Spinu, I.-I.; Badoiu, S.C.; Stefani, C.; Greabu, M. *PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects* -*Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 173;
20. Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, Ljubimova JY. *Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance*. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Nov;65(13-14):1866-79. doi: 10.1016/j.addr.2013.09.019. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24120656; PMCID: PMC5812459;
21. Marques, A.C.; Costa, P.J.; Velho, S.; Amaral, M.H. *Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies*. *J. Control. Release* 2020, 320, 180-200;
22. Alibakhshi, A.; Kahaki, F.A.; Ahangarzadeh, S.; Yaghoobi, H.; Yarian, E.; Arezumand, R.; Ranibari, J.; Mokhtarzadeh, A.; de la Guardia, M. *Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines*. *J. Control. Release* 2017, 268, 323-334;
23. *Liposome-Based Bioassays* Jacopo Sforzi, Lorenzo Palagi and Silvio Aime; Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Centro di Imaging Molecolare, Università degli Studi di Torino. DOI: 10.3390/biology9080202;
24. Harris, J., Chess, R. *Effect of pegylation on pharmaceuticals*. *Nat Rev Drug Discov* 2, 214–221 (2003). DOI: 10.1038/nrd1033;
25. Li SD, Huang L. *Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting*. *J Control Release.* 2010 Aug 3;145(3):178- 81. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.03.016. Epub 2010 Mar 23.

26. Pasut G, Paolino D, Celia C, Mero A, Joseph AS, Wolfram J, Cosco D, Schiavon O, Shen H, Fresta M. *Polyethylene glycol (PEG)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy*. J Control Release. 2015 Feb 10; 199:106-13. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.008. Epub 2014 Dec 9. PMID25499917;
- 27 Nieto, C., Vega, M. A., & Martín del Valle, E. M. (2020). *Trastuzumab: More than a Guide in HER2-Positive Cancer Nanomedicine*. *Nanomaterials*, 10(9), 1674. doi10.3390/nano10091674;
- 28 Marques, A.C.; Costa, P.J.; Velho, S.; Amaral, M.H. *Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies*. J. Control. Release 2020, 320, 180-200;
- 29 Elena Canato, Antonella Grigoletto, Ilaria Zanotto, Tommaso Tedeschini, Benedetta Campara, Giovanna Quaglio, Giuseppe Toffoli, Delia Mandracchia, Alberto Dinarello, Natascia Tiso⁴, Francesco Argenton, Katia Sayaf, Maria Guido, Daniela Gabbia, Sara De Martin, Gianfranco Pasut. *Anti-HER2 super stealth immunoliposomes for targeted-chemotherapy*. doi: 10.1002/adhm.202301650. 2023;
- 30 Alibakhshi, A.; Kahaki, F.A.; Ahangarzadeh, S.; Yaghoobi, H.; Yarian, E.; Arezumand, R.; Ranibari, J.; Mokhtarzadeh, A.; de la Guardia, M. *Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines*. J. Control. Release 2017, 268, 323-334;
- 31 QU, Zhengxing, et al. *Development of humanized antibodies as cancer therapeutics*. *Methods*, 2005, 36.1: 84-95;
- 32 Crivianu-Gaita, Victor; Thompson, Michael. *Immobilization of Fab'fragments onto substrate surfaces: a survey of methods and applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 70: 167-180;

- 33 LAKOWICZ, Joseph R. (ed.). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: springer US, 2006;
- 34 C.Y. Tang, Z. Yang- *Transmission Electron Microscopy (TEM)*, Editor(s): Nidal Hilal, Ahmad Fauzi Ismail, Takeshi Matsuura, Darren Oatley-Radcliffe, Membrane Characterization, Elsevier, 2017;
- 35 *The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry*. Devatha P. Nair, Maciej Podgórski, Shunsuke Chatani, Tao Gong†, Weixian Xi, Christopher R. Fenoli, and Christopher N. Bowman;
- 36 Teraski, M.; Dailey, M.E. *Confocal microscopy of living cells*. In Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd Ed.; Pawley, J.B., Ed.; Plenum Press: New York, 1995; 327–346;
- 37 Atkins, P. *Spectroscopy: electronic transitions*. In *Physical Chemistry*, 5th Ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 1994; 590–622;
- 38 S Hermanto et al 2017 J. Phys.: *Molecular dynamic simulation of Trastuzumab F(ab')₂ structure in corporation with HER2 as a theranostic agent of breast cancer*. Conf. Ser. 835 012005;
- 39 Xiaohui Lu, Svetlana Bergelson, *Development of a sensitive potency assay to measure the anti-proliferation effect of an anti-HER2 antibody*. Journal of Immunological Methods, Volume 415, 2014;
- 40 Fan, X., Brezski, R.J., Fa, M. et al. *A single proteolytic cleavage within the lower hinge of trastuzumab reduces immune effector function and in vivo efficacy*. *Breast Cancer Res* 14, R116 (2012).
- 41 G. Caracciolo, *Liposome-protein corona in a physiological environment: challenge and opportunities for targeted delivery of nanomedicines*. Nanomedicine

- 42 S.M. Moghimi, J. Szebeni; *Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties*; Molecular Targeting and Polymer Toxicology Group, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, University of Brighton, Brighton BN2 4GJ, UK
Department of Membrane Biochemistry, Walter Reed Army Institute of Research, MD 20307, USA
- 43 Capriotti, A.L., Cavaliere, C. & Piovesana, S; *Liposome protein corona characterization as a new approach in nanomedicine*. *Anal Bioanal Chem* 411, 4313–4326 (2019).