



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



*Ministero dell'Istruzione
dell'Università e Ricerca*

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Farmacia

**Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e
Farmaceutiche**

DOTTORATO DI RICERCA

in

“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”

XXIV CICLO, A.A. 2010/2011

SSD CHIM/09

*Nanosistemi polimerici per la veicolazione di farmaci
antitumorali o attivi sul sistema nervoso centrale*

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

Cinzia Scialabba

Tutor:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

INDICE:

1. INTRODUZIONE

1.1 Nanotecnologia e Nanomedicina	1
1.2 Nanovettori nel drug delivery system	3
1.2.1 Sistemi direzionati	5
1.3 Micelle polimeriche	19
1.3.1 Micellizzazione e concentrazione di aggregazione critica (CAC)	21
1.3.2 Metodi di preparazione delle micelle e incorporazione di farmaci al loro interno	25
1.3.3 Vantaggi delle micelle polimeriche	30
1.3.4 Stabilità delle micelle polimeriche	32
1.3.5 Composizione delle micelle polimeriche	34
1.4. Nanoparticelle superparamagnetiche	36
1.4.1 Cenni sul magnetismo	36
1.4.2. Proprietà magnetiche da "bulk a nano"	41
1.4.3 Applicazioni delle SPIONs in campo biomedico e tecnologico	44
1.4.4 Caratteristiche chimico fisiche essenziali per il drug delivery	57
1.4.5 Strategie di targeting per le SPIONs	71
1.4.6 Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione delle SPIONs	71
1.4.7 Limiti dell'utilizzo delle SPIONs come Drug Delivery System	76
1.4.8 Tossicità	79
1.4.9 Prospettive future	80

2. SCOPO DELLA TESI	82
RISULTATI E DISCUSSIONE	
3. SISTEMI NANOSTRUTTURATI CONTENENTI DERIVATI SQUALENICI PER IL DIREZIONAMENTO DI FARMACI AL SISTEMA NERVOSO CENTRALE	95
3.1 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS ₈₀	95
3.2 Preparazione e caratterizzazione delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS ₈₀ contenenti Rivastigmia	98
3.3 Saggi biologici in vitro	104
4. CONCLUSIONI	111
RISULTATI E DISCUSSIONE	
5. NANOPARTICELLE SUPERPARAMAGNETICHE PER IL DIREZIONAMENTO DI FARMACI ANTITUMORALI	113
5.1 Preparazione e caratterizzazione delle SPIONs rivestite di PHEA-IB-p(BMA)	114
5.2 Determinazione del contenuto di magnetite e valutazione del comportamento magnetico delle MNPs rivestite con PHEA-IB-p(BMA)	120
5.3 Misure magnetiche	122
5.4 Valutazione biologica in vitro di nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-IB-p(BMA)	127
5.5 Studi in vivo	133
6. CONCLUSIONI	138
RISULTATI E DISCUSSIONE	
7. NANOPARTICELLE SUPERPARAMAGNETICHE PER IL “DUAL TARGETING” AL TUMORE	141
7.1 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-PLA-	142

PEG-FA e PHEA-PLA-PEG	
7.2 Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG	150
7.3 Valutazione biologica in vitro delle MNPs-FA e delle MNPs	161
8.CONCLUSIONI	172
RISULTATI E DISCUSSIONE	
9.NANOPARTICELLE SUPERPARAMAGNETICHE RIVESTITE CON UN DERIVATO SQUALENICO DELL'INULINA PER IL "MAGNETIC DRUG TARGETIG"	175
9.1 Sintesi e caratterizzazione del copolimero Inu-EDA-Sq-PEG	175
9.2 Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con Inu-EDA-Sq-PEG	180
9.3 Studi di rilascio in vitro	186
9.4 Valutazioni biologiche in vitro delle nanoparticelle magnetiche di Inu-EDA-Sq-PEG: citotossicità e uptake	189
10. CONCLUSIONI	197
11. PARTE SPERIMENTALE	
11.1 Materiali	199
11.2 Metodi	202
11.3 Sintesi del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS ₈₀	206
11.3.1 Preparazione delle micelle polimeriche caricate con Rivastigmina	208
11.3.2 Determinazione delle concentrazione critica di aggregazione	210

11.3.3	Caratterizzazione delle micelle: determinazione delle dimensioni e del potenziale zeta	210
11.3.4	Studi di biocompatibilità	211
11.3.5	Studi di uptake	212
11.3.6	Studi di stabilità in plasma umano	213
11.4	Sintesi del copolimero PHEA-IB-p(BMA)	215
11.4.1	Preparazione delle nanoparticelle superparamagnetiche (MNPs) di PHEA-IB-p(BMA)	217
11.4.2	Caratterizzazione delle MNPs	218
11.4.3	Determinazione della quantità di farmaco incorporato all'interno delle nanoparticelle magnetiche e studi di rilascio del farmaco	221
11.4.4	Studi di citotossicità in vitro e uptake cellulare delle nanoparticelle magnetiche caricate con farmaco	222
11.4.5	Esperimenti in vivo ⁺	225
11.5	Sintesi del copolimero NH ₂ -PEG-FA	228
11.5.1	Sintesi dei copolimeri PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG	229
11.5.2	Coniugazione del fluoroforo Alexa con PHEA-PLA	232
11.5.3	Preparazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG	232
11.5.4	Caratterizzazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-PLA-PEG-FA e con PHEA-PLA-PEG	234
11.5.5	Studi di citotossicità in vitro delle nanoparticelle magnetiche	237
11.5.6	Studi di uptake in vitro delle nanoparticelle magnetiche caricate con doxorubicina	238

11.5.7 Eccitazione a due fotoni e microscopia confocale	240
11.6. Sintesi dell'INU-EDA	242
11.6.1 Sintesi dell'INU-EDA-Sq	243
11.6.2 Sintesi INU-EDA-Sq-PEG	244
11.6.3 Preparazione delle nanoparticelle superparamagnetiche di INU-EDA-Sq-PEG	245
11.6.4 Preparazione delle nanoparticelle superparamagnetiche di INU-EDA-Sq-PEG caricate con Doxorubicina	246
11.6.5 Determinazione del contenuto di farmaco	246
11.6.6 Caratterizzazione delle nanoparticelle superparamagnetiche rivestite con INU-EDA-Sq-PEG	247
11.6.7 Studi di rilascio del farmaco.	249
11.6.8 Studi di citotossicità in vitro	250
11.6.9 Studi di Uptake	251
12. BIBLIOGRAFIA	253

1. INTRODUZIONE

1.1 Nanotecnologia e Nanomedicina

Il termine “nanotecnologia” include un vastissimo ambito di ricerca e di applicazioni accomunate dal fatto che le dimensioni dei materiali coinvolti rientrano nel range dei 0,1-1000 nanometri [*Sahoo and Labhasetwar*, 2003]. Proprio in virtù di queste dimensioni tali materiali possiedono proprietà peculiari; infatti, le caratteristiche chimiche e fisiche dei materiali possono cambiare in modo radicale quando la loro dimensione si riduce a un livello pari a quello di un aggregato di atomi. Dimensioni piccole implicano arrangiamenti spaziali specifici degli atomi di superficie dai quali dipendono le proprietà chimico-fisiche del “nano-oggetto” in esame.

Ad oggi la nanotecnologia è un campo in rapida espansione e coinvolge diversi settori, tra i quali, l’ingegneria, l’elettronica, le scienze dei materiali e la biomedicina. Pertanto, non è sorprendente che con la convergenza di numerose discipline scientifiche vi siano molte interpretazioni dei termini "nanobiotecnologie", "nanomedicina" e "nanomateriali".

Il campo della "nanomedicina" è distinguibile poiché correlato unicamente con la medicina: *nanotecnologie al centro del paziente*.

A seguito di numerose discussioni la Fondazione europea della scienza

(FSE) Forward Look Nanomedicine ha definito, tramite conferenza di consenso, la nanomedicina nel seguente modo:

“La Nanomedicina è quella disciplina che utilizza strumenti di dimensioni nanometriche per la diagnosi, la prevenzione e il trattamento di malattie e per avere una maggiore comprensione dei complessi meccanismi fisiopatologici che sono alla base delle malattie. Pertanto, l'obiettivo finale è migliorare la qualità della vita.”

L'applicazione dei benefici della scienza colloidale (nano) è riconducibile a diversi secoli fa. I primi pionieri dell'era moderna sono stati Faraday, che nel 19° secolo ha riconosciuto l'importanza del "rubino" oro colloidale [Faraday, 1857], Ilya Metchnikov e Paul Ehrlich, che nel 1908 hanno ricevuto il premio Nobel per la medicina. In particolare, Metchnikov ha contribuito molto alla valorizzazione della fagocitosi [Cooper, 2008], mentre Ehrlich ha sostenuto il concetto di diagnostica cellula-specifica e terapie cellulari mirate. Quest'ultimo, infatti, è stato il primo a sostenere il concetto di nanomedicina coniando la frase *"pallottola magica"*, cioè quel sistema capace di trasportare il farmaco nella cellula bersaglio in modo da non agire sulle cellule circostanti.

Anche il '900 è stato un secolo estremamente importante, sia per lo sviluppo dei polimeri sintetici che per l'ingresso nell'uso clinico di

routine delle prime nanostrutture come vettori di farmaci.

Invece, negli ultimi decenni è cresciuto notevolmente l'interesse nell'utilizzo di nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIONs) come drug delivery system [Mahmoudi et al., 2011].

Ciò che ha spinto molti ricercatori ad approfondire lo studio di tali sistemi è stato il fatto che già negli anni '30 le nanoparticelle di ossido di ferro erano state utilizzate in clinica sotto forma di infusione parenterale di soluzione di ferro per il trattamento dell'anemia [Marchasin et al., 1964; Silverstein et al., 2004], e che già negli anni '90 venivano utilizzate come agenti di contrasto nella risonanza magnetica per immagine (MRI) [Bean et al., 1959; Ferrucci, 1991].

1.2 Nanovettori nel drug delivery system

Gli strumenti utilizzati in nanomedicina come carriers di altre molecole sono detti *nanovettori*. L'utilizzo di questi come trasportatori di farmaci è oggi l'epicentro delle moderne strategie di drug delivery.

Diverse tipologie di *drug delivery systems* (DDS) sono state sviluppate con lo scopo di minimizzare la perdita e la prematura degradazione del farmaco in seguito a disattivazione chimica e/o enzimatica, aumentare la biodisponibilità del farmaco, ridurre gli effetti collaterali dannosi,

incrementando la frazione di farmaco accumulata in una determinata zona dell'organismo [Torchilin, 2001].

Tali DDS possono essere realizzati in modo da ottenere dei sistemi con proprietà ben definite, ad esempio: una lenta degradazione nell'organismo che permette di prolungare il tempo di permanenza nel torrente ematico; la possibilità di essere somministrati per qualunque via, (orale, nasale, oftalmica, endovena); capacità di attraversare le barriere fisiologiche, ad esempio la barriera ematoencefalica e la barriera oftalmica; la reattività a determinati stimoli quali variazioni di pH o di temperatura. Inoltre, è possibile ottenere sistemi che garantiscono un rilascio specifico in un particolare tessuto mediante la coniugazione sulla superficie di molecole direzionanti, sfruttando il legame di queste a specifici recettori cellulari caratteristici dell'area di interesse [Muller, 1991; Torchilin, 1996].

Per ottenere i DDS sono stati proposti diversi materiali di partenza, tra cui lipidi, polimeri e materiali inorganici, ottenendo così dei sistemi con differenti proprietà chimico-fisiche che ne permettono quindi differenti applicazioni [Liggins and Burt, 2002; Paciotti et al., 2006].

Visti i numerosi vantaggi associati all'impiego di tali sistemi innovativi, nella letteratura internazionale sono stati proposti diversi vettori per i

farmaci, tra cui microparticelle, microcapsule, liposomi, nanoparticelle e micelle.

1.2.1 Sistemi direzionati

L'obiettivo dei "*targeted drug delivery system*" è quello di veicolare e direzionare il farmaco verso un organo o un tessuto bersaglio, sfruttando le differenze biochimiche e metaboliche fra cellule "malate" e cellule "sane", e di rilasciarlo in maniera prolungata nel tempo.

Il direzionamento del principio attivo può essere di tipo attivo o passivo.

Targeting passivo

Il targeting passivo consiste nel trasporto, per convezione o diffusione passiva, dei nanocarriers, attraverso gli spazi dei capillari fenestrati tumorali, nell'interstizio del tumore e nelle cellule [Haley *et al.*, 2008].

La convezione si riferisce al movimento delle molecole all'interno dei fluidi. Questa avviene attraverso pori di grosse dimensioni e dovrebbe essere il meccanismo di trasporto predominante per la maggior parte delle molecole di grosse dimensioni, quando la velocità netta di filtrazione è pari a zero. Al contrario, composti con basso peso molecolare, come l'ossigeno, sono principalmente trasportati per diffusione, definito come un processo di trasporto di molecole attraverso la membrana cellulare secondo un gradiente di concentrazione, e

pertanto, senza apporto di energia cellulare. Tuttavia, poiché la convezione attraverso l'interstizio dei tumori è scarsa, a causa di un'ipertensione interstiziale, il principale meccanismo di trasporto dei farmaci è la diffusione [*Danhier et al.*, 2010].

L'accumulo selettivo dei nanocarriers e del farmaco veicolato avviene tramite l'effetto *Enhanced Permeability and Retention effect* (EPR) [*Haley et al.*,2008]. Alla base di tale fenomeno vi sono le caratteristiche strutturali fisiopatologiche di un tessuto (figura 1); in particolare sistemi a lunga circolazione, contenenti farmaci o aggregati macromolecolari, possono accumularsi lentamente in siti patologici con endotelio vascolare discontinuo e permeabilità alterata, come aree tumorali, infiammate o infartuate, e indurre o aumentare il rilascio del farmaco in queste aree [*Maeda et al.*, 2000; *Maeda et al.*,2009].

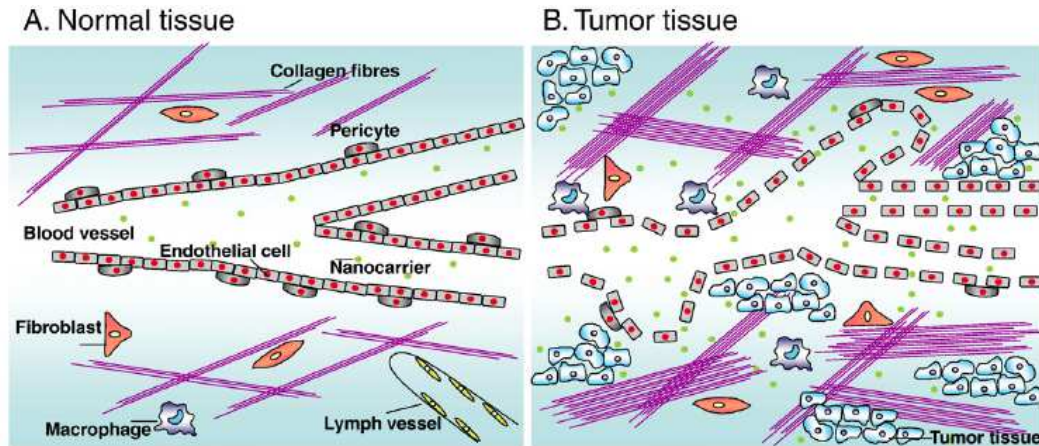


Figura 1. Rappresentazione schematica delle differenze fisiopatologiche tra un tessuto normale e tumorali che determinano l'accumulo dei sistemi colloidali per effetto EPR. **A.** Tessuto normale con vasi sanguigni lineari tenuti insieme dai periciti. Nella matrice extracellulare sono presenti fibre di collagene, fibroblasti e macrofagi. Sono, inoltre, presenti i vasi linfatici. **B.** Tessuto tumorale con vasi sanguigni difettosi e altamente fenestrati. La matrice extracellulare contiene molte più fibre di collagene, fibroblasti e macrofagi; mancano i vasi linfatici.

L'effetto EPR sarà ottimale se i nanovettori riescono a sfuggire al sistema immunitario e pertanto circolare per un lungo periodo. In questo modo concentrazioni locali molto alte di nanosistemi farmaco-caricati possono accumularsi a livello tumorale; per esempio, entro 1-2 giorni si possono riscontrare concentrazioni 10-50 volte superiore rispetto ai tessuti normali [Iyer *et al.*, 2006]. A tal fine, sono particolarmente importanti almeno tre proprietà dei nanosistemi:

- 1- I nanosistemi dovrebbero avere dimensioni comprese tra 10 e 100 nm. In realtà, per un'efficiente extravasazione dalle fenestrature dei vasi, i nanosistemi dovrebbero avere dimensioni inferiori a

400 nm. D'altra parte, per evitare la filtrazione renale, i nanosistemi devono essere più grandi di 10 nm, mentre per evitare la cattura da parte del fegato i nanosistemi devono essere più piccolo di 100 nm.

- 2- La carica delle particelle dovrebbe essere neutra o negativa per evitare l'eliminazione da parte dei reni.
- 3- I nanosistemi devono sfuggire al sistema reticoloendoteliale, che distrugge qualsiasi materiale estraneo attraverso opsonizzazione seguita da fagocitosi [*Malam et al.*, 2009; *Gullotti and Yeo* 2009].

Poiché il targeting passivo dipende dal grado di vascolarizzazione tumorale e dall'angiogenesi [*Bae*, 2009)], l'accumulo dei nanosistemi varierà col tipo di tumore e dei siti anatomici. Per esempio, l'alta pressione del fluido interstiziale dei tumori solidi riduce l'uptake e l'omogenea distribuzione dei farmaci nel tumore [*Heldin et al.*, 2004]. Invece, l'alta pressione del fluido interstiziale dei tumori associati ad uno scarso drenaggio linfatico spiega come siano importante le dimensioni del sistema per avere un buon effetto EPR: nanosistemi grandi e a lunga permanenza nel circolo sistemico (100 nm) sono più trattenuti a livello del tumore, mentre le molecole più piccole diffondono facilmente [*Pirollo et al.*, 2008] (Figura 2.A.2).

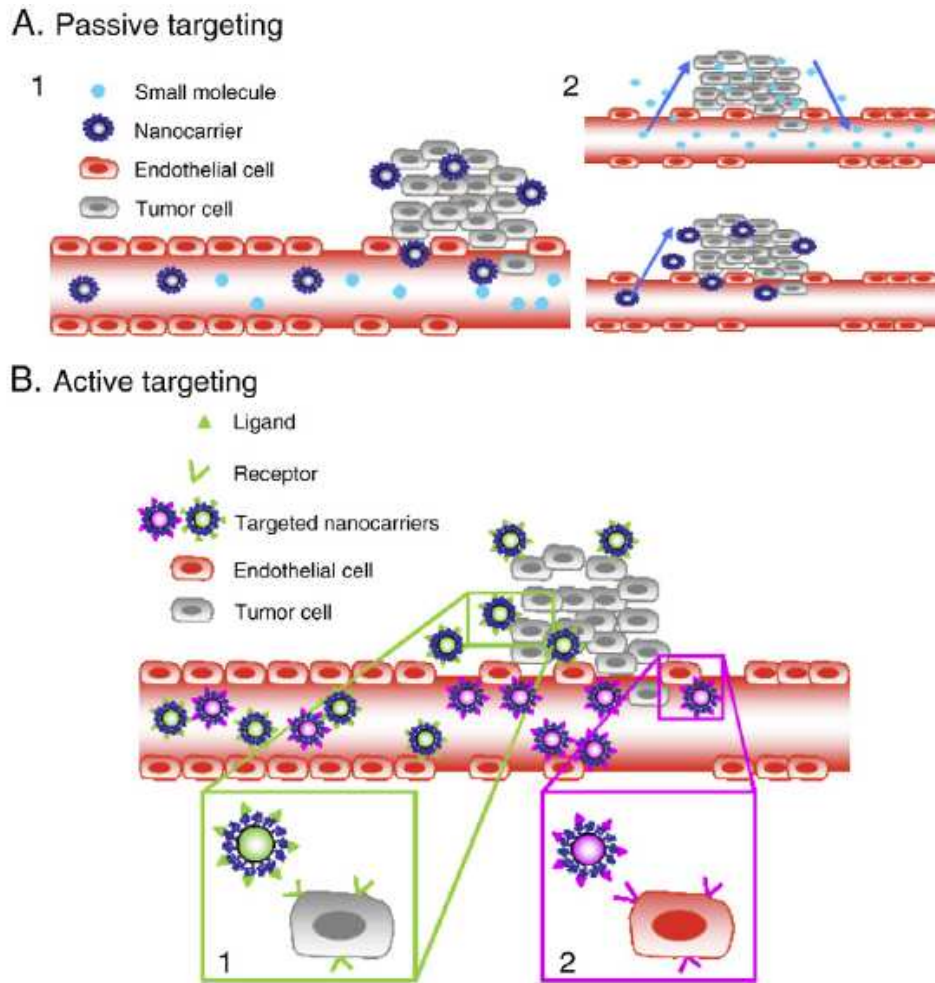


Figura 2. A. Targeting passivo dei nanosistemi. (1) I nanosistemi raggiungono selettivamente il tumore attraverso il sistema vascolare discontinuo lo che circonda. (2) Rappresentazione schematica della influenza della dimensione nella ritenzione nel tessuto tumorale. I farmaci da soli diffondono liberamente dentro e fuori i vasi sanguigni del tumore a causa delle loro piccole dimensioni e quindi la loro concentrazione efficace nel tumore diminuisce rapidamente. Invece, i nanosistemi carichi di farmaco non possono diffondere indietro nel flusso sanguigno a causa delle loro grandi dimensioni, con conseguente progressivo accumulo: effetto EPR. **B.** Strategie di targeting attivo. I ligandi legati sulla superficie dei nanosistemi si legano ai recettori sopra-espressi dalle (1) cellule tumorali o (2) dalle cellule endoteliali angiogeniche.

Targeting attivo

Il targeting attivo si ottiene coniugando sulla superficie esterna dei sistemi carrier molecole direzionanti (ligando targeting) [Gao *et al.*, 2005], che legano appropriati recettori espressi nel sito targeting (Figura 2.B). Nel caso in cui si vuole veicolare un farmaco antitumorale il ligando viene scelto in maniera tale che si leghi ad un recettore sovraespresso dalle cellule tumorali o dai vasi tumorali e non espresso dalle cellule normali. Inoltre, i recettori target dovrebbero essere espressi omogeneamente su tutte le cellule bersaglio. Ciò che influenza la penetrazione a livello tumorale è l'affinità di legame dei ligandi.

Alcuni esempi di “*targeted drug delivery system*” sono riportati in figura 3.

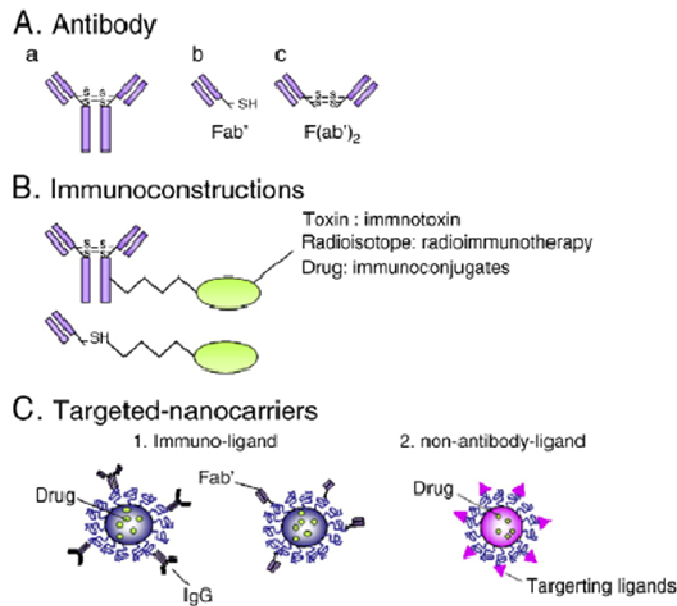


Figura 3. Rappresentazione schematica di alcuni esempi di “*targeted drug delivery system*”. **A.** Gli anticorpi targeting sono generalmente immunoglobuline monoclonali g (IgG) (a) o frammenti Fab’ (b) o frammenti F(ab’)₂ (c). **B.** Gli immunocostrutti sono formati dal legame tra anticorpi o frammenti di anticorpi con molecole terapeuticamente attive. **C.** I nanosistemi targeting sono nanovettori che presentano in superficie un ligando targeting. Il ligando può essere un anticorpo monoclonale o frammenti di anticorpo (immuno-nanocarrier) o ligandi di tipo peptidico e non; inoltre, tali nanosistemi contengono un farmaco.

Tra i possibili ligandi vanno ricordati anticorpi, porzioni zuccherine, transferrina e residui di folato. Gli ultimi due sono attualmente adoperati nel direccionamento di principi attivi a cellule tumorali, poiché la maggior parte di esse presenta una sovraespressione sulla loro superficie di recettori specifici per il folato [Licciardi *et al.*, 2008] e per la transferrina [Jule *et al.*, 2003; Dash, 2000]. Mentre, per un possibile direccionamento attivo al sistema nervoso centrale (SNC) si sono avuti

esiti molto interessanti funzionalizzando la superficie dei sistemi colloidali con tensioattivi idrofili come i Polisorbati 20, 40, 60 e 80, capaci di interagire con l'endotelio cerebrale [*Kreuter et al.*, 1997].

- I polisorbati come agenti direzionanti al SNC

Risultati interessanti per un possibile direzionamento attivo al SNC si sono avuti funzionalizzando la superficie dei sistemi colloidali con tensioattivi idrofili come i poloxameri (conosciuti anche con il nome commerciale di Pluronic), i polisorbati 20, 40, 60 e 80 (conosciuti anche con il nome commerciale di Tween), capaci di interagire con l'endotelio cerebrale [*Kreuter et al.*, 1997].

Una delle interpretazioni di tale interazione ritiene che ciò sia dovuto all'adsorbimento di proteine plasmatiche, come le apolipoproteine (Apo), sulla superficie di sistemi rivestiti con Polisorbato (PS) quando questi vengono somministrati per via endovena. Luck [*Luck*, 1997] osservò, infatti, l'adsorbimento di Apo E sulla superficie di nanoparticelle rivestite con Polisorbato 20, 40, 60 e 80 in plasma umano.

In particolare, in uno studio condotto da Kreuter si osservò che nanoparticelle di polibutilcianoacrilato (PBCA) aventi in superficie il PS₈₀, erano capaci di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) per

interazione di tali sistemi con l'Apo E e per successiva endocitosi mediata dal recettore del complesso così formato [Kreuter *et al.*, 2002].

Le Apo sono proteine anfipatiche, costituenti delle lipoproteine, in grado di legare i lipidi e aggregati molecolari deputati al trasporto di colesterolo e trigliceridi nel sangue. L'Apo E in particolare, interagendo con un tipo di lipoproteine, le lipoproteine a bassa densità (*Low Density Lipoproteins*, LDL), forma un complesso che viene riconosciuto da uno specifico recettore, il quale è espresso copiosamente sul versante luminale delle cellule endoteliali che formano la BEE. In seguito all'interazione del recettore e del complesso LDL-Apo E si assiste ad un processo di endocitosi che garantisce al SNC il corretto apporto di lipidi [Dehouck *et al.*, 1994; Meresse *et al.*, 1989].

Numerosi studi *in vivo* hanno dimostrato che il PS₈₀ presente sulla superficie delle nanoparticelle costituisce un sito di legame per le Apo B e le Apo E. Le nanoparticelle diventano così in grado di interagire con il recettore per le LDL prima di essere internalizzate, attraverso un processo di endocitosi mediata da recettore, dalle cellule endoteliali del microcircolo cerebrale [Kreuter *et al.*, 1995; Alyautdin *et al.*, 2001]. Appare evidente perciò che le nanoparticelle rivestite con PS₈₀ mimano le LDL adsorbite sull'Apo E, proteina che è molto espressa nei tumori cerebrali [Murakami *et al.*, 1988].

- L'acido folico come agente direzionante ai tumori

L'acido folico (Figura 4), un ligando ad elevata affinità per i recettori del folato, è uno tra i ligandi target proposti con maggior successo per il drug delivery tumore-specifico.

Un importante caratteristica dell'acido folico è che quando derivatizzato o coniugato attraverso il suo gruppo γ -carbossilico mantiene inalterate la sua capacità a legarsi ai recettori [Cavallaro *et al.*, 2010].

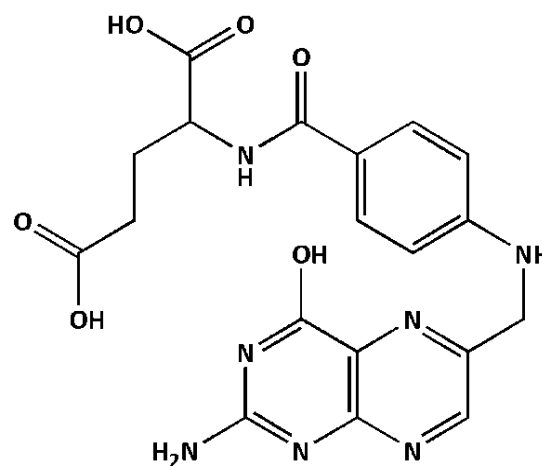


Figura 4. Struttura dell'acido folico.

L'acido folico è una vitamina a basso peso molecolare richiesta dalle cellule eucariote, in quanto è coinvolto in alcune vie metaboliche nella sintesi di nucleotidi.

Poiché l'acido folico è essenziale per la biosintesi di basi nucleotidiche, la vitamina è consumata in elevate quantità dalle cellule proliferanti,

nonostante le cellule animali manchino della via biosintetica del folato. Per questa ragione, le cellule normali trasportano fisiologicamente i folati attraverso la membrana plasmatica tramite carrier per il folato ridotto e recettori per il folato (FR) [*Elnakat and Ratnam, 2004; Antony, 2004*].

Il primo meccanismo, potenzialmente presente in tutte le cellule, coinvolge una proteina transmembrana a bassa affinità, che trasporta i folati ridotti direttamente nel citosol delle cellule e costituisce la principale via responsabile dell'uptake dei folati fisiologici.

Il secondo meccanismo si trova principalmente sulle cellule epiteliali polarizzate e sui macrofagi attivati [*Nakashima-Matsushita et al., 1999*]; tali recettori FR, glicoproteici ad alta affinità, legano e internalizzano preferenzialmente i folati ossidati attraverso endocitosi mediata da recettore [*Antony, 1992; Leamon and Low, 1991; Leamon and Low, 1993; Shen et al., 1994*].

Piccole concentrazioni di acido folico sono sufficienti affinché il recettore per il folato ridotto fornisca il giusto apporto di folato alla maggior parte delle cellule normali; invece l'FR è frequentemente sovraespresso nelle cellule tumorali umane, probabilmente consentendo alle cellule maligne di competere per la vitamina allo scarseggiare delle

risorse [Garin-Chesa *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1994; Toffoli *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1999; Bueno *et al.*, 2001].

La presenza degli FR in molte cellule cancerose, di fatto, identifica questa classe di recettori come un potenziale target per molti sistemi terapeutici direzionabili al tumore [Gruner and Weitman, 1998; Leamon and Low, 2001; Lu and Low, 2002].

Inoltre, gli FR presentano una peculiarità che potrebbe ulteriormente qualificare questo recettore come target tumore-specifico: generalmente diventa accessibile ai farmaci somministrati per via endovenosa solamente dopo trasformazione maligna. Infatti, normalmente, gli FR sono selettivamente espressi sulla superficie apicale della membrana di alcune cellule epiteliali e, pertanto, sono inaccessibili alle sostanze presenti nel sangue, quindi non disponibile ai sistemi terapeutici diretti verso i recettori FR. Di contro, poiché le cellule epiteliali maligne perdono la polarità espongono al flusso ematico i recettori FR, i quali diventano accessibili ai sistemi target circolanti [Lu and Low, 2002].

Quindi, come ampiamente descritto in letteratura, poiché i recettori FR sono sovraespressi in un gran numero di cellule tumorali maligne (Tabella 1), l'acido folico è diventato una delle più popolari molecole per il *drug-targeting* alle cellule tumorali.

Tabella 1. Recettori per l'acido folico sovraespressi nei tumori dell'uomo.

Tipologia di cancro umano	% dei casi di tumore con sovraespressione di FR
Ovarico	90 %
Mammario	50 %
Cerebrale	75 %
Endometriale	66 %
Renale	43 %
Polmonare	37 %
Mesoteliale	73 %
Colon-rettale	18 %

L'uso dell'acido folico come agente targeting è ulteriormente supportato dal suo legame ad alta affinità ($K_d \pm 10^{-10}M$), bassa immunogenicità, facile manipolazione, piccola dimensione ($M_r = 441.4$), stabilità durante la conservazione, compatibilità con solventi organici e acquosi, basso costo e facile reperibilità [Reddy and Low, 1998].

La coniugazione dell'acido folico a macromolecole o a *drug delivery system* colloidali può essere facilmente ottenuta attivando i gruppi carbossilici dell'acido folico per farli reagire con i gruppi basici primari presenti nella macromolecola d'interesse [Cavallaro et al., 2010].

Dati sperimentali hanno dimostrato che se la formazione dei coniugati avviene per reazione tra il gruppo γ -carbossilico dell'acido folico e la

macromolecola di interesse il coniugato che si forma può interagire con i recettori FR [Leamon and Low, 1991; Wang et al., 1996], viceversa l'associazione con il recettore FR è fortemente compromessa. Tuttavia, ciò non rappresenta un problema reale, poiché in diversi studi è stato dimostrato che, seppure le reazioni di derivatizzazione possono avvenire sia a livello del gruppo γ - o α -carbossilico dell'acido folico, si ha una resa di attivazione dell'80% del gruppo γ -carbossilico e del 20% del gruppo α -carbossilico [Shukla et al., 2003, Wang et al., 1996, Leamon et al., 1999].

1.3 Micelle polimeriche

Le micelle polimeriche come carrier di farmaci sono state introdotte da Ringsdorf nel 1984 [*Bader et al.*, 1984] e l'impiego di tali sistemi ha suscitato nel mondo scientifico particolare attenzione per le peculiari caratteristiche dei polimeri adoperati, quali biocompatibilità, biodegradabilità e molteplicità di gruppi funzionali potenzialmente utilizzabili per la coniugazione con molecole direzionanti [*Andrianov and Payne*, 1998].

Le micelle sono delle dispersioni colloidali appartenenti ad una grande famiglia di sistemi dispersi, formati da materiale particellare (fase dispersa), distribuito all'interno di un mezzo disperdente (fase continua). Tra le dispersioni colloidali, normalmente divise in tre gruppi principali, liofile, liofobe e colloidali di associazione, le micelle appartengono al gruppo dei colloidali di associazione o colloidali anfifilici.

In particolare, le micelle polimeriche sono ottenute a partire da copolimeri costituiti da unità monomeriche sia idrofile che idrofobe. Diversamente dagli omopolimeri costituiti da unità monomeriche identiche, i copolimeri presentano due o più tipi di unità monomeriche, che differiscono per la loro polarità. Questi diversi tipi di gruppi monomerici possono essere organizzati in una catena polimerica in modi

differenti dando origine a copolimeri *random*, *blocks* o *graft* (Figura 5)

[Zhang and Eisenberg, 1995].

Omopolimero (non forma micelle)	XXXXXXXXXXXXXXXXXX
Copolimero Random	XOXXOXXOXXOXXX
Copolimero Block	
di-block	XXXXXXXXO000000
tri-block	XXXXO00000OXXXX
Copolimero Graft	XXXXXXXXXXXXXXXXXX
	O O
	O O
	O O
	O

Figura 5. Principali tipologie strutturali di copolimeri (X = idrofilo, O = idrofobo).

Generalmente, quando il segmento idrofilo è più lungo del *block* idrofobico le micelle assumono una forma sferica, e pertanto esse risultano composte da un *core* di *blocks* idrofobici, stabilizzato da una corona, *shell*, di catene polimeriche idrofile (Figura 6) [Lin et al.,2009]. Mentre, se aumenta la lunghezza della porzione idrofoba rispetto al segmento idrofilo si possono formare strutture con una morfologia non micellare (non sferica), ma del tipo ad aste e a lamella [Zhang and Eisenberg, 1995].

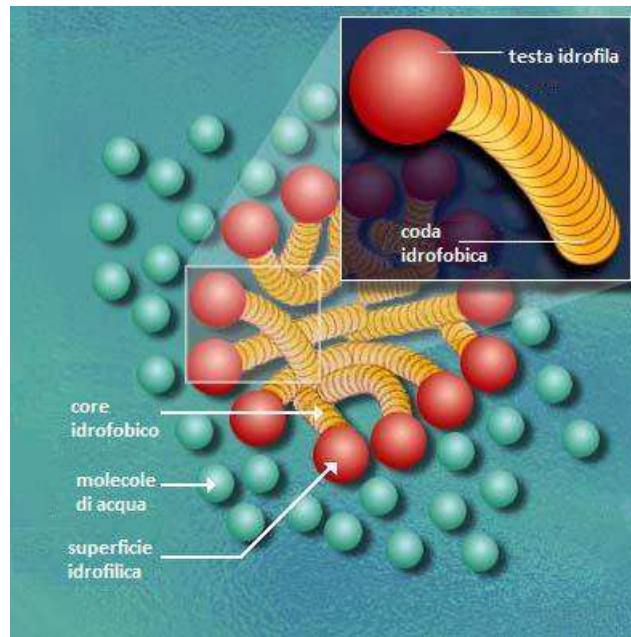


Figura 6. Schematizzazione di una micella in ambiente acquoso.

1.3.1 Micellizzazione e concentrazione di aggregazione critica (CAC)

Le micelle polimeriche sono delle strutture con diametro compreso normalmente tra 5 e 100 nm, ottenute dall'associazione spontanea in soluzione di copolimeri anfifilici, in seguito al raggiungimento di una certa concentrazione (detta concentrazione di aggregazione critica, CAC) e ad una data temperatura (temperatura critica di micellizzazione, TMT). Il processo di micellizzazione è un fenomeno regolato termodinamicamente, infatti, la forza che spinge i polimeri anfifilici ad auto-assemblarsi è la diminuzione di energia libera del sistema, dovuta alla rimozione dei frammenti idrofobici all'interfaccia con il solvente

acquoso, al ripristino dei legami a idrogeno tra le molecole di acqua e alla formazione di interazioni tra la porzione idrofila del polimero e il solvente; tale fenomeno è favorito anche dall'instaurarsi di forze di Van der Waals tra i gruppi idrofobi all'interno del sistema, le quali permettono di ottenere un ulteriore guadagno energetico [*Jones and Leroux, 1999; Martin, 1993*].

Un parametro chiave nel processo di formazione delle micelle è la concentrazione di aggregazione critica o CAC, ciò rappresenta la concentrazione di un copolimero anfifilico in soluzione alla quale le micelle iniziano a formarsi e sono in equilibrio con gli unimeri, mentre il numero delle singole molecole che formano le micelle è chiamato numero di aggregazione delle micelle. Ai valori di CAC o leggermente al di sopra le micelle sono ancora poco compatte e contengono dell'acqua nel *core* [*Gao and Eisenberg, 1993*]. All'aumentare della concentrazione del copolimero anfifilico nel mezzo, l'equilibrio tra unimeri e micelle si sposta a favore della formazione delle micelle, le quali diventano più compatte e stabili, perdono il residuo di solvente presente nel *core* e diminuiscono le proprie dimensioni.

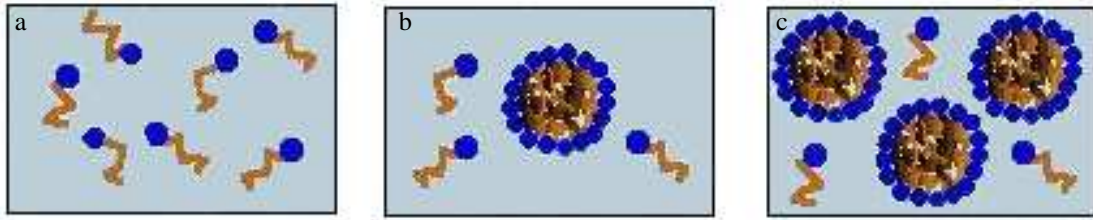


Figura 7. Rappresentazione schematica di polimeri anfifilici in acqua: a valori di concentrazione: al di sotto (*a*), uguale (*b*) e al di sopra della CAC (*c*).

Più basso è il valore della CAC per un dato copolimero anfifilico, più stabili sono le micelle, anche ad una bassa concentrazione del copolimero nel mezzo. Ciò conferisce alle micelle polimeriche stabilità alla diluizione. Questo è un parametro di fondamentale importanza dal punto di vista farmacologico dato che, in seguito alla diluizione in un grande volume, come può essere il torrente ematico, solo le micelle con un basso valore di CAC sono ancora presenti, mentre le micelle con un alto valore di CAC possono dissociarsi in unimeri e il loro contenuto può precipitare nel compartimento ematico [*Kwon and Kataok, 1995; Muranishi et al., 1981; Gao and Eisenberg, 1993; Marques, 1997*].

I copolimeri anfifilici genericamente mostrano dei valori di CAC dell'ordine di 10^{-6} - 10^{-7} M, contrariamente a quanto si verifica per le micelle di tensioattivi a basso peso molecolare la cui concentrazione critica di aggregazione è in genere dell'ordine di 10^{-3} - 10^{-4} M.

Il valore della CAC è condizionato dalle porzioni lipofile delle micelle polimeriche poiché, all'aumentare della lunghezza del blocco idrofobo rispetto a quella del blocco idrofilo, si ha generalmente una notevole diminuzione dei valori di CAC, a cui fa seguito un incremento sensibile della stabilità micellare [*Kwon and Kataoka, 1995*].

Esistono vari metodi per determinare il valore della CAC per un dato composto anfifilico; tra i vari metodi si ricordano: analisi HPLC (High-performance liquid chromatography), la determinazione delle dimensioni delle nanostrutture mediante light scattering "small-angle" e la spettroscopia a fluorescenza. Quest'ultimo metodo è il più sensibile e preciso [*Turro and Chung, 1984; Astafieva et al., 1993*], ed è basato sulla tendenza di alcune sonde fluorescenti, come il pirene, ad associarsi con le micelle piuttosto che con la fase acquosa, e sul fatto che la loro fluorescenza varia in dipendenza dell'intorno chimico circostante [*Jones and Leroux, 1999*].

Altro importante parametro che descrive il processo di micellizzazione è la Temperatura Critica di Micellizzazione o CMT. Al di sotto di questa temperatura, i polimeri anfifilici sono presenti come unimeri, mentre al di sopra sono già presenti nel sistema sia come unimeri che come aggregati.

1.3.2 Metodi di preparazione delle micelle e incorporazione di farmaci al loro interno

In base alle caratteristiche chimico-fisiche del copolimero di partenza e del farmaco che si desidera incorporare, per ottenere le micelle polimeriche si possono applicare due principali metodi di preparazione [Allen *et al.*, 1999].

Il primo metodo, *la dissoluzione diretta*, si applica quando il copolimero scelto è relativamente solubile in acqua, e consiste nell'aggiunta di una soluzione organica di principio attivo ad una soluzione di copolimero disperso in acqua, facendo evaporare successivamente la fase organica.

Mentre il secondo metodo, utilizzato per copolimeri che hanno una bassa solubilità in acqua, prevede la dissoluzione del copolimero e del farmaco in un solvente organico, come ad esempio dimetilsolfossido (DMSO), dimetilformammide (DMF), tetraidrofurano (THF), acetone, dimetilacetammide (DMA), e successiva rimozione del solvente organico.

I solventi organici miscibili con l'acqua possono essere allontanati dializzando la miscela contro acqua, il lento allontanamento della fase organica attiva la micellizzazione.

In alternativa, si può applicare il metodo "*solution casting*", che comporta l'evaporazione della fase organica con formazione di un film

polimerico, il quale favorisce l'interazioni polimero-farmaco. La reidratazione del film polimerico con solvente acquoso caldo determina la formazione delle micelle cariche di farmaco.

L'incorporazione fisica del farmaco idrofobico può essere ulteriormente ottenuta attraverso un'emulsione olio in acqua (O/W), processo che comporta l'uso di un solvente organico volatile non miscibile con l'acqua (come diclorometano, etilacetato). L'evaporazione di tale solvente determina la formazione delle micelle cariche di farmaco.

Recentemente, è stata proposta un'innovativa procedura “*one-step*”, basata sulla dissoluzione del polimero e del farmaco in una miscela acqua-*tert* butanolo (TBA) con successiva liofilizzazione del solvente. Solubilizzando il liofilizzato in un opportuno veicolo iniettabile si avrà la formazione delle micelle cariche di farmaco [Dufresne et al., 2003].

L'incorporazione di farmaci apolari all'interno delle micelle viene resa possibile dall'orientamento caratteristico *core-shell* assunto dai copolimeri (figura 8).

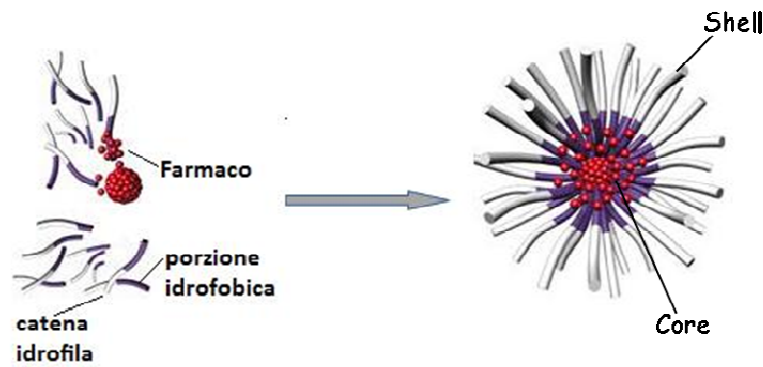


Figura 8. Struttura core-shell di una micella e disposizione del farmaco al suo interno.

L'efficacia dell'incorporazione di farmaci poco solubili da parte delle micelle dipende fortemente dal tipo di interazioni tra il farmaco solubilizzato e le catene idrofobiche formanti il *core* [Allen *et al.*, 1999], ma può anche essere influenzato dalle interazioni tra il farmaco solubilizzato e le catene idrofiliche che costituiscono lo *shell*, così come anche dalle interazioni interfacciali tra il farmaco e il solvente acquoso [Nagarajan and Ganesh, 1989].

Recenti studi [Xing and Mattice, 1998] hanno dimostrato che l'iniziale solubilizzazione avviene per sostituzione delle molecole di solvente dal *core* micellare e successivo accumulo delle molecole di farmaco nella zona più centrale della micella, spingendo via le catene idrofobiche da quest'area. Ciò può determinare un aumento della dimensione della micella in seguito all'espansione del *core* che contiene il farmaco solubilizzato all'interno. L'esito finale del processo, inoltre, può essere

influenzato dalle dimensioni delle catene lipofile che danno origine al *core* e dalle dimensioni delle porzioni idrofile formanti lo *shell* [Allen et al., 1999]. Nel primo caso, più grande è la catena idrofobica maggiore sarà la dimensione del *core* e quindi sarà possibile incorporare maggiori quantità di principio attivo [Allen et al., 1999], ed inoltre, aumenterà la capacità del sistema di trattenere il farmaco idrofobico, dato che le interazioni idrofobiche sono le principali forze coinvolte nella solubilizzazione micellare di farmaci poco solubili in acqua [Zhang et al., 1997]. Nel secondo caso, un aumento nella lunghezza della catena idrofila determina un aumento del valore della CAC; quindi, ad una data concentrazione del copolimero anfifilico in soluzione, solo una piccola frazione di questo copolimero sarà presente nella forma micellare e di conseguenza diminuirà la quantità di micelle con farmaco incorporato.

L'incorporazione del farmaco nelle micelle può avvenire non solo a seguito di interazioni di tipo fisico con le porzioni polimeriche idrofobiche, ma anche in seguito ad un legame covalente del principio attivo alla macromolecola polimerica.

Se il farmaco è legato covalentemente al *core* idrofobo, la sua incorporazione all'interno delle micelle procede simultaneamente con la formazione del sistema; il rilascio del principio attivo, quindi, risulterà controllato dal processo di penetrazione dell'acqua nel *core* lipofilo,

dalla dissociazione micellare e dalla finale rottura del legame farmaco-copolimero.

Se l'incorporazione del principio attivo avviene invece attraverso interazioni fisiche, il suo rilascio dal sistema dipenderà dalla sua velocità di diffusione dal *core* micellare e dalla disaggregazione delle micelle.

La disposizione spaziale del farmaco da solubilizzare all'interno delle micelle dipende dalla sua polarità. In un sistema acquoso, le molecole polari vengono adsorbite sulla superficie delle micelle [Attwood and Florence, 1983], le molecole non polari vengono incorporate nel *core* idrofobico, mentre le molecole con polarità intermedia si distribuiscono lungo le molecole del copolimero in determinate posizioni intermedie (figura 9).

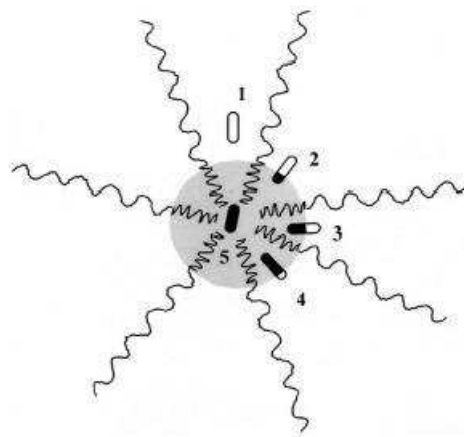


Figura 9. Schema di una possibile associazione del farmaco con la micella in dipendenza dell'idrofobicità del farmaco (la porzione in nero della molecola del farmaco rappresenta l'area idrofobica, mentre la porzione in bianco simboleggia l'area idrofila).

1.3.3 Vantaggi delle micelle polimeriche

L'utilizzo delle micelle in campo farmaceutico presenta molteplici vantaggi, sia per quanto riguarda le metodiche di preparazione che risultano essere semplici e riproducibili, sia da un punto di vista farmacologico. Infatti, l'associazione di un farmaco con un qualunque *carrier* determina un assorbimento ritardato, una ristretta biodistribuzione, un ritardo nella clearance ed una diminuzione della velocità di metabolismo del farmaco [Hwang, 1987].

Un'importante proprietà delle micelle è la loro capacità di incrementare la solubilità di principi attivi poco solubili in mezzi acquosi [Elworthy et al., 1968; Attwood and Florence, 1983]. Infatti, la bassa solubilità di un farmaco può determinare uno scarso assorbimento e quindi una bassa biodisponibilità, soprattutto per quanto riguarda le somministrazioni orali [Lipinski et al., 2000]. Inoltre, nel caso di somministrazione per via endovenosa, potrebbe verificarsi l'aggregazione del farmaco in nanocristalli, determinando embolia, per l'ostruzione di un'arteria o di una vena, oppure un accumulo di tali aggregati in un sito specifico, associato ad effetti tossici locali e ad una diminuita biodisponibilità sistemica.

L'utilizzo delle micelle, grazie allo *shell* idrofilo esterno, il quale garantisce anche la dispersione in acqua delle stesse, determina la

protezione del farmaco incorporato da possibili inattivazioni chimiche e/o enzimatiche dovute all'ambiente biologico che lo circonda [*Inoue et al.*, 1998].

Altro vantaggio delle micelle è il loro piccolo diametro (5-100 nm); tale caratteristica determina una riduzione della clearance e di conseguenza una maggiore permanenza delle micelle nel torrente ematico. Tali sistemi, infatti, sono sufficientemente grandi da evitare l'escrezione renale ($> 50\text{kDa}$) e allo stesso tempo abbastanza piccoli ($< 200\text{nm}$) da bypassare la filtrazione da parte delle cellule fenestrate interendoteliali della milza [*Kwon*,2003].

Le micelle, pertanto, somministrate per via parenterale, incrementando la biodisponibilità e il tempo di permanenza dei farmaci nella circolazione sistemica, aumentano la probabilità che i principi attivi si possano accumulare nel sito bersaglio e contribuiscono in tal modo alla riduzione di effetti secondari indesiderati. [*Jones and Leroux*, 1999; *Torchilin*, 2001; *Kwon and Kataoka*, 1995].

Le piccole dimensioni delle micelle, inoltre, risultano essere vantaggiose per i processi di sterilizzazione associati alla produzione farmaceutica, e quindi possono essere facilmente ed economicamente sterilizzate per filtrazione.

1.3.4 Stabilità delle micelle polimeriche

La stabilità fisica dei *drug delivery system* è di fondamentale importanza al fine di prevenire, dopo l'ingresso nella circolazione sistemica, la loro dissociazione ed il prematuro rilascio del farmaco incorporato. Generalmente le proteine plasmatiche tendono a adsorbirsi sulla superficie di sostanze idrofobiche, incrementandone la loro clearance e quindi determinando la loro eliminazione dal torrente ematico. Tuttavia, le micelle sono organizzate in modo tale che la superficie esterna, esposta all'ambiente acquoso circostante, sia costituita da porzioni che interagiscono difficilmente con i componenti del sangue o dei tessuti, in maniera tale da consentire a questi sistemi di permanere nel sangue o nei tessuti per un periodo sufficientemente lungo, senza essere riconosciute da proteine o da cellule fagocitiche [Muller, 1991; Torchilin, 1996]. Grazie a questa caratteristica, le micelle possono essere utilizzate anche come agenti diagnostici. Infatti, agenti diagnostici a circolazione prolungata sono di primaria importanza per indagini diagnostiche vascolari mediante traccianti radioattivi [Winslow *et al.*, 1996].

Diversi studi hanno dimostrato che la stabilità delle micelle dipende dalla natura e composizione dei copolimeri di partenza [Toncheva *et al.*, 2003].

Uno dei polimeri sintetici più utilizzati per la realizzazione della corona esterna idrofilica è il poliossietilenglicole (PEG). Il largo impiego di tale polimero è frutto delle sue molteplici proprietà: solubilità eccellente in soluzioni acquose, elevate flessibilità delle catene polimeriche, minima influenza sulle proprietà biologiche dei prodotti farmaceutici modificati [Calvo et al., 2001; Moghim, 2002].

Inoltre, il suo uso, per somministrazioni parenterali, è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) in virtù delle sue caratteristiche, quali biocompatibilità, bassissima tossicità, assenza di immunogenicità e antigenicità.

Le catene di PEG in un ambiente acquoso, come i fluidi biologici, richiamano molecole di acqua formando uno *shell* altamente idrofilo che conferisce stabilità termodinamica alla micelle stesse. Tale effetto è ottenuto sia attraverso una diminuzione dell'energia libera di superficie che attraverso la riduzione delle interazioni idrofobiche intermicellari [Adams et al., 2003; Otsuka et al., 2003].

In aggiunta, la presenza sulle superficie esterna delle micelle di PEG conferisce a tali sistemi proprietà “*stealth*”, cioè impedisce le interazioni tra i componenti del sangue e la superficie dei sistemi rivestiti, riduce il legame delle proteine del plasma con le particelle *PEGhilate*, previene le interazioni del vettore con le opsonine e ne rallenta la rapida cattura da

parte del sistema reticolo endoteliale (RES); in tal modo si ha un prolungamento del tempo di permanenza di tali sistemi nel circolo ematico [*Storm et al.*, 1995; *Kwon*, 2003].

Generalmente vengono utilizzate catene di PEG con peso molecolare compreso nel range che va da 1 a 15 KDa, anche se alcuni studi hanno dimostrato che all'aumentare della lunghezza della catena del PEG aumenta la flessibilità delle loro catene ed anche l'emivita delle particelle [*Adams et al.*, 2003].

1.3.5 Composizione delle micelle polimeriche

Da tutte queste osservazioni si evince che un ruolo cruciale nel conferire le proprietà alle micelle è giocato dalla composizione chimica del copolimero di partenza. Sono stati proposti numerose tipologie di polimeri utilizzati per la costituzione di molecole anfifiliche in grado di formare micelle e, in particolare, recentemente sono stati proposti diversi sistemi micellari ottenuti a partire da poliamminoacidi [*Cavallaro et al.*, 2004b; *Licciardi et al.*, 2010]. Questi materiali pensati appositamente per il *drug delivery* sono substrati biocompatibili e biodegradabili che vengono opportunamente coniugati con porzioni idrofile o idrofobe a seconda della necessità.

Per la porzione idrofila sono frequentemente utilizzati i PEG con un peso molecolare compreso tra 1 e 15 kDa [Kwon, 2003]. Altre valide alternative ai PEG sono il poli(N-vinil-2-pirrolidone) (PVP), dotato di un'alta biocompatibilità [Johnson et al., 1992; Benahmed et al., 2001]; il poli(vinil alcol) e il suo copolimero poli(vinilalcol-co-viniloleato), già usati per preparare micelle che incrementano la permeazione transcutanea del retinil palmitato [Luppi et al., 2002].

Le porzioni lipofile delle micelle sono normalmente costituite da composti ottenuti dalla polimerizzazione di L-lisina [Katayose and Kataoka, 1998], acido aspartico [Yokoyama et al., 1990; Harada and Kataoka, 1998], acido D,L-lattico (PLA) [Ramaswamy et al., 1997] e spermina [Kabanov and Kabanov, 1990].

1.4 Nanoparticelle superparamagnetiche

Si definiscono nanoparticelle superparamagnetiche un particolare tipo di nanoparticelle costituite da elementi magnetici come ferro, nichel, cobalto e loro derivati, che sono in grado di rispondere a campi magnetici esterni.

Con un opportuno rivestimento superficiale, le nanoparticelle magnetiche, possono essere disperse in un adeguato solvente, formando una sospensione omogenea, chiamata *ferro-fluido*. Questo tipo di sospensione può interagire con un campo magnetico esterno ed essere direzionate in una specifica area.

1.4.1 Cenni sul magnetismo

Schrödinger formulò nel 1926 una teoria nota come meccanica quantistica o meccanica ondulatoria, che permette di descrivere matematicamente le proprietà ondulatorie delle particelle microscopiche ed in particolare dell'elettrone. Egli associò all'elettrone una funzione, detta funzione d'onda $\Psi(x,y,z)$ tale che, il suo quadrato $|\Psi(x,y,z)|^2$ dà la probabilità di trovare la particella in un punto dello spazio di coordinate (x,y,z) . La funzione d'onda di un elettrone in un atomo è chiamata orbitale atomico, il quale può essere descritto qualitativamente come la regione dello spazio attorno al nucleo dove è maggiore la probabilità di

trovare l'elettrone. Quest'ultimo si comporta come se fosse una sfera carica in rotazione (attorno al proprio asse) e come un dipolo magnetico (di fatto un piccolo magnete) nella direzione dell'asse magnetico e con verso determinato dalla regola della mano destra. Dato che l'elettrone può ruotare solo in due direzioni, il numero quantico può assumere solo due valori: $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$.

In base alla struttura elettronica posseduta, i materiali sono caratterizzati da differenti proprietà magnetiche e da una diversa interazione con campi magnetici esterni.

Inserendo materiali di tipo diverso all'interno di un solenoide è possibile evidenziare gli effetti della magnetizzazione. L'esperienza mostra che alcuni materiali vengono respinti debolmente dal campo magnetico prodotto dal solenoide (diamagnetismo), altri vengono attratti debolmente (paramagnetismo) e altri ancora vengono attratti in maniera molto forte dal solenoide (ferromagnetismo).

Il fenomeno può essere spiegato a livello microscopico dalla presenza di dipoli magnetici microscopici entro la materia, che inizialmente sono disposti in maniera casuale. Applicando un campo magnetico esterno questi dipoli tendono a orientarsi parallelamente al campo, cioè si hanno fenomeni di polarizzazione magnetica i quali generano un momento magnetico di dipolo diverso da zero.

Pertanto, un materiale può avere dal punto di vista magnetico tre comportamenti: diamagnetico, paramagnetico e magnetico, a seconda che gli atomi della struttura abbiano o meno un momento magnetico non nullo e in base all'orientazione dei momenti magnetici.

Il materiale magnetico è differenziabile in ferromagnetico (con gli spin tutti allineati nella direzione del campo), anti-ferromagnetico (con gli spin anti-paralleli e di valore uguale, che si compensano esattamente), o ferrimagnetico (con gli spin anti-paralleli, ma che non si compensano esattamente), quest'ultimo avrà un momento magnetico permanente, anche senza l'applicazione di un campo magnetico.

Così come i materiali, anche le particelle di ossido di ferro sono classificate in base alla loro risposta ad un campo magnetico esterno. In particolare, la descrizione dell'orientamento del momento magnetico in una particella aiuta ad identificare i diversi tipi di magnetismo osservati in natura.

Le proprietà magnetiche delle particelle possono essere descritte in dipendenza dell'induzione magnetica (M) rispetto al campo magnetico applicato (H).

In molti materiali la relazione tra M ed H è lineare:

$$M = \mu H$$

dove μ è la permeabilità magnetica delle particelle.

Le particelle di ossido di ferro mostrano paramagnetismo se $\mu > 1$, diamagnetismo se $\mu < 1$. Nel vuoto $\mu = 1$.

In alternativa è usata la suscettività magnetica (χ) come stima dell'efficienza della risposta della magnetizzazione (M) del materiale ad un campo magnetico esterno (H).

Essa può essere definita come $\chi = \delta M / \delta H$ oppure come $\chi = \mu - 1$, ed è una grandezza adimensionale.

Le particelle paramagnetiche hanno $\chi > 0$, particelle diamagnetiche $\chi < 0$ e nel vuoto $\chi = 1$ [Chen C, 1986].

Particelle con gli spin elettronici spaiati si allineano spontaneamente così che il materiale può esibire magnetizzazione senza l'applicazione di un campo magnetico esterno e vengono chiamate particelle ferromagnetiche.

Nello studio delle proprietà magnetiche sono importanti proprio i diagrammi M vs. H che rappresentano le curve di isteresi magnetica (figura 10).

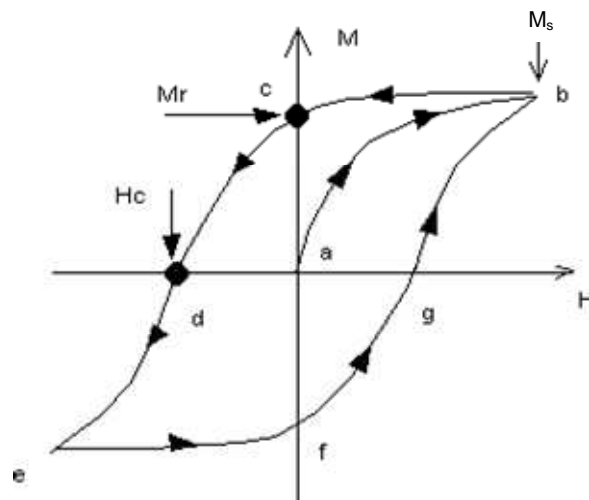


Figura 10. Ciclo di isteresi.

Un comportamento irreversibile nella magnetizzazione è indicato dal fatto che una magnetizzazione residua M_r permane nel campione, anche quando viene rimosso il campo magnetico (H) esterno, per un certo tempo che dipende dalla velocità di decadimento della magnetizzazione, tipica del particolare materiale. L'area compresa all'interno della curva rappresenta l'energia necessaria per invertire la magnetizzazione. M_s è la magnetizzazione di saturazione che si ottiene quando tutti gli spin sono allineati rispetto al campo esterno; H_c è la coercitività, cioè l'intensità di campo che deve essere applicata per portare a zero la magnetizzazione residua del campione.

1.4.2 Proprietà magnetiche da "bulk a nano"

All'interno di un materiale magnetico in bulk si possono individuare una moltitudine di domini, ciascuno dei quali è composto da un gruppo di elettroni con spin che puntano nella stessa direzione e agiscono contemporaneamente (figura 11). La formazione di tali domini è legata alla minimizzazione dell'energia del sistema. La loro dimensione è, infatti, dettata dalla competizione tra l'aumento di energia imposto dal campo magnetico esterno e la spesa di energia richiesta per la formazione delle "pareti" che circoscrivono i domini. Queste ultime possono essere spostate applicando un campo magnetico esterno. Il loro movimento comporta l'aumento della dimensione del dominio orientato nello stesso verso del campo magnetico applicato e dà origine alla curva d'isteresi magnetica. La dimensione caratteristica dei domini dipende dal materiale; di solito è nell'ordine della decina di nanometri.

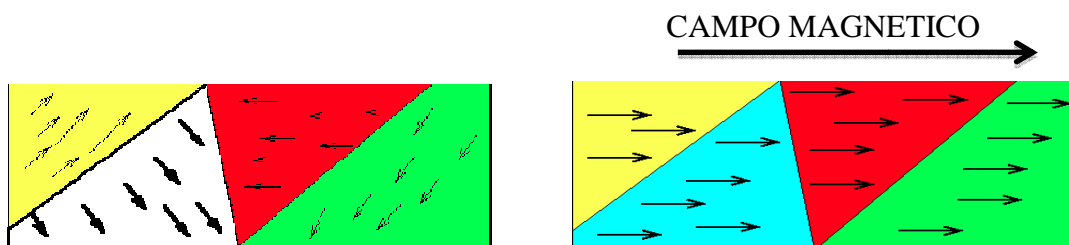


Figura 11. Domini magnetici nei materiali macroscopici.

Quando le dimensioni dei cristalli diventano più piccole di un singolo dominio, esse si comporteranno da singoli domini magnetici, poiché la formazione di ulteriori sottodomini diventa sfavorevole. Tali materiali possiedono caratteristiche chimico-fisiche diverse rispetto al materiale di partenza in bulk [*Babes et al.*, 1999]; infatti, le piccole dimensioni e l'elevata area superficiale delle particelle magnetiche portano ad un radicale cambiamento delle proprietà magnetiche: esse, essendo dei singoli domini magnetici, esibiranno fenomeni di *superparamagnetismo* [*Goya et al.*, 2003].

Nei sistemi superparamagnetici l'applicazione di un campo magnetico esterno determina una forte magnetizzazione, ma a seguito della rimozione del campo magnetico esterno nessuna forza magnetica residua rimane tra le particelle [*Gupta and Gupta*, 2005a].

Le nanoparticelle superparamagnetiche, dette SPIONs, mostrano un'elevata magnetizzazione di saturazione, coercitività e magnetizzazione residua nulle (figura 12) [*Hofmann-Antenbrink et al.*, 2010].

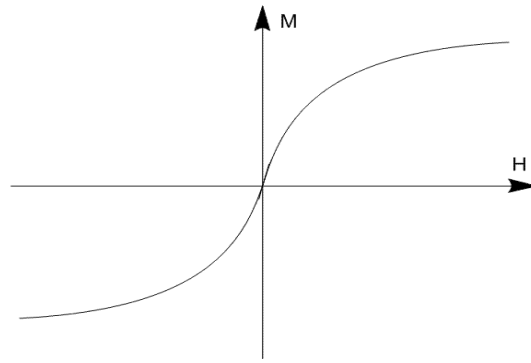


Figura 12. Magnetizzazione di particelle superparamagnetiche.

Diversi tipi di materiali magnetici, come per esempio ossidi di ferro (Fe_2O_3 e Fe_3O_4), leghe metalliche (Fe, Co e Ni), leghe di ferro e cobalto, sono stati ampiamente studiati per il “*Magnetic drug delivery system*”. Tra questi materiali la magnetite (Fe_3O_4 , singoli domini di 5-10 nm), il comune ossido di ferro magnetico, risulta essere il candidato più promettente per la sua biocompatibilità e biodegradabilità [Schwewrtmann et al., 1991].

È stato, infatti, dimostrato che le SPIONs, dopo somministrazione in vivo, possono essere metabolizzate, e che gli ioni ferro rilasciati vanno a sommarsi alla quantità di ferro presente nell’organismo ed incorporarsi nell’emoglobina degli eritrociti, e pertanto degradati lungo il normale percorso di riciclaggio del ferro [Weissleder et al., 1989].

1.4.3 Applicazioni delle SPIONs in campo biomedico e tecnologico

Per la prima volta, nel 1970 Freeman e il suo gruppo di ricerca introdussero il concetto di magnetismo in campo medico [*Freeman et al.*, 1960]. Da allora la ricerca ha permesso di ottenere diversi tipi di particelle magnetiche e vettori.

Oggi l'obiettivo è quello di ottimizzare le proprietà delle nanoparticelle magnetiche al fine di incrementarne la concentrazione nei vasi sanguigni, ridurre l'eliminazione precoce dal torrente circolatorio, minimizzarne le interazioni con siti non specifici ed aumentarne l'uptake nelle cellule bersaglio così da ridurre la dose di farmaco necessaria [*Mahmoudi et al.*, 2001; *Douziech-Eyrolles et al.*, 2007].

Le SPIONs sono particelle sintetiche costituite da: maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetite (Fe_3O_4) ed hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$); esse posseggono un core di diametro compreso tra 10 e 100 nm e presentano un rivestimento sul quale o all'interno del quale, viene caricato il farmaco.

La peculiarità di questi sistemi è quella di poter essere veicolati al tessuto bersaglio attraverso l'applicazione di un magnete esterno. Come suggerisce l'acronimo SPIONs, sono dotate di superparamagnetismo; questa caratteristica, come già detto sopra, le rende magnetizzabili fino a saturazione, in presenza di un campo magnetico applicato dall'esterno;

quando il campo verrà rimosso, le nanoparticelle non presenteranno alcuna magnetizzazione residua. Questa proprietà è funzione della dimensione delle nanoparticelle e di norma subentra per valori di almeno 10-20 nm di diametro. Al di sotto di questi valori il sistema non presenta i domini multipli che sono invece presenti in tutti i magneti più grandi ed al contrario si comporta come un “super spin singolo” con elevata suscettività magnetica. Nei sistemi superparamagnetici, dopo rimozione del campo, le nanoparticelle si ridisperdono, rendendo meno probabile la formazione di aggregati, che potrebbero costituire un limite al tempo di emivita del sistema in quanto esso verrebbe più facilmente fagocitato ed eliminato se si trovasse sotto forma di aggregati. Inoltre, escludere la formazione di aggregati, permette di escludere anche la formazione di eventuali trombi.

Le SPIONs, per le loro proprietà fisiche, chimiche, termiche e magnetiche, si prestano bene a un gran numero di potenziali applicazioni biomediche quali:

- a) Marcatura delle cellule/separazione cellulare
- b) Riparazione tissutale
- c) Immagine di risonanza magnetica (MRI)
- d) Ipertermia
- e) Magnetofection

- f) Trattamento dell'artrite
- g) Drug delivery

Marcatura delle cellule/separazione cellulare

La marcatura delle cellule con sostanze ferro/paramagnetiche è un metodo utilizzato per la separazione di cellule in vivo e per far sì che le cellule marcate siano individuate per mezzo della MRI.

Le tecniche di marcatura e separazione delle cellule in vivo utilizzano due approcci: fissaggio delle nanoparticelle magnetiche sulla superficie delle cellule [*Handgretinger et al.*, 1998] o internalizzazione delle nanoparticelle magnetiche biocompatibili attraverso endocitosi in fase fluida [*Schoepf et al.*, 1998], endocitosi mediata da recettori [*Cuatrecasas and Roth*, 1983] o fagocitosi [*Weissleder et al.*, 1997].

Una strategia per un'efficace e specifica marcatura cellulare con nanoparticelle magnetiche consiste nel modificare la superficie delle nanoparticelle con specifici ligandi, in maniera tale che la cellula non solo riconosca il sistema ma lo internalizza attraverso endocitosi mediata dal recettore [*Cuatrecasas and Roth*, 1983; *Bilbao et al.*, 1998].

Allo scopo di facilitare l'endocitosi delle particelle, sulla loro superficie sono stati coniugati diversi ligandi, tra i quali anticorpi monoclonali (Mabs). Altri agenti targeting come transferrina, lactoferrina, albumina,

insulina e fattori di crescita, sono riconosciuti da recettori sovraespressi frequentemente sulla superficie delle cellule dei mammiferi. Questi recettori, non sono solo marcatori cellulari, ma sono anche in grado di internalizzare molecole legate ad essi. Inoltre, molti di questi ligandi, sono stabili e generalmente poco immunogenici.

In assenza di sistemi che inibiscono l'endocitosi, molte nanoparticelle sono endocitate dalle cellule ed infine, inglobate in vacuoli digestivi.

Una volta che le particelle vengono endocitate, probabilmente vengono staccate dal recettore superficiale, diventando a tutti gli effetti inattive.

Di conseguenza, le cellule sono ad alto rischio di apoptosi, a causa di un carico eccessivo di queste particelle al loro interno. Se a quest'ultima

viene però impedito di lasciare la superficie della cellula, esse resteranno in contatto con il loro specifico recettore, senza subire endocitosi. Infatti,

si è visto che nanoparticelle superparamagnetiche derivatizzate con diverse proteine targeting come lactoferrina, transferrina, ceruloplasmina,

ecc., si legandosi fortemente ai recettori superficiali ed inibiscono la fagocitosi (figura 13) [Gupta et al., 2003; Gupta et al., 2004a].

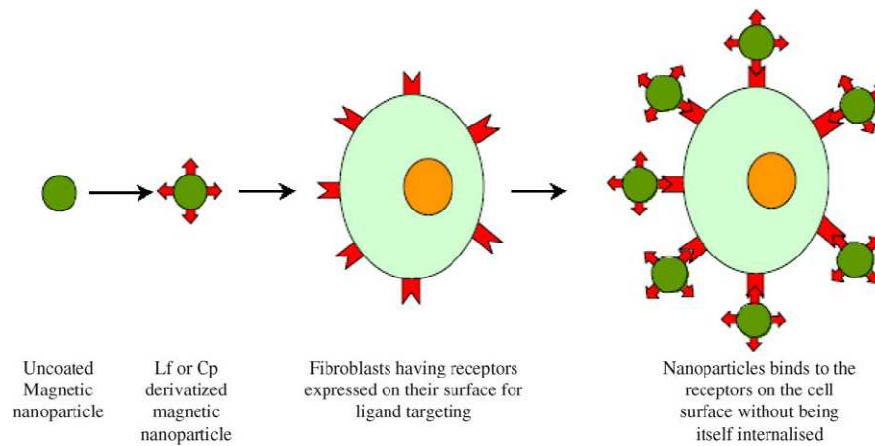


Figura 13. Schema di derivatizzazione delle SPION con ligandi targeting quali lactoferrina (Lf) o ceruloplasmina (Cp) per il direccionamento ai fibroblasti umani.

Le SPIONs, opportunamente funzionalizzate con molecole organiche, che li rendono anche disperdibili in acqua, possono fungere da marker di specifiche cellule in vivo; possono essere usate, per esempio, per individuare zone tumorali soprattutto del fegato e dei linfonodi.

Un'altra applicazione si avrebbe funzionalizzando le SPION con leganti specifici per alcune biomolecole; in tal modo potrebbero, ad esempio, fungere da marker del DNA per individuare sequenze "sbagliate".

Riparazione tissutale

La riparazione dei tessuti prevede il trapianto di cellule staminali in un tessuto lesa, le quali accrescendosi, proliferando e differenziandosi riparano il danno tissutale. In questo campo le SPIONs sono state proposte come strumenti che fungano da sostegno per le cellule staminali

e che ne permettano il rilascio nei siti desiderati. Se le cellule staminali vengono marcate con le SPIONs si rende più semplice rintracciarle all'interno dell'organismo utilizzando, per esempio, la MRI. Così facendo, infatti, si potrà seguire il percorso delle cellule staminali in vivo senza utilizzare tecniche invasive [Bulte *et al.*, 2011; Jendelová *et al.*, 2003].

L'aumentato uso delle SPIONs in tale campo è principalmente dovuto ai vantaggi che l'utilizzo di tali sistemi offrono; primo tra tutti è la loro biocompatibilità, come è dimostrato dal fatto che l'utilizzo delle SPIONs come agenti di contrasto è stato approvato dalla Food and Drug Administration; in secondo luogo, la suscettibilità magnetica delle nanoparticelle rende l'intero sistema un buon agente di contrasto per la MRI. In più le SPIONs possono subire modifiche superficiali al fine di permettere l'ancoraggio di diversi tipi di cellule staminali; ciò può essere realizzato attraverso diversi metodi:

1. le cellule staminali e le nanoparticelle ferromagnetiche vengono incubate insieme fino a quando non si ha l'accumulo passivo delle SPIONs all'interno delle cellule. Con questo metodo non si ottengono grandi risultati poiché all'aumentare della quantità di nanoparticelle all'interno delle cellule aumenta l'attività

macrofagica che limita il successivo uptake [*Doche de Laquintane et al.*, 2002].

2. alla superficie delle SPIONs vengono legati agenti per la transfezione, come Superfect®, poly-L-lisina, protamina e Lipofectamine®, in modo tale da migliorarne l'internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule staminali [*Mailänder et al.*, 2008; *Frank et al.*, 2003; *Miyoshi et al.*, 2005].
3. la permeabilità della membrana delle cellule staminali viene alterata con l'aiuto di un campo magnetico che agevola l'ingresso delle SPIONs all'interno delle cellule [*Walczak et al.*, 2005].

Come già accennato, la risonanza magnetica può tornare utile per seguire il decorso delle cellule staminali in vivo, al fine di comprendere come esse migrino, attecchiscano e si trasformino nei citotipi desiderati a livello del tessuto bersaglio. Chiaramente, al fine di ottenere una buona marcatura delle cellule staminali con le SPIONs, è necessario modificare la superficie di queste ultime. A tal proposito, Horak et al hanno preparato delle nanoparticelle rivestite con mannosio, mediante il metodo della coprecipitazione, per poi marcare con esse le cellule staminali. Successivamente, attraverso la microscopia ottica ed a trasmissione elettronica, hanno appurato che i sistemi venivano internalizzati nelle cellule dello stroma del midollo osseo di ratto [*Horák*

et al., 2005]. Un altro esempio è quello di Babic e il suo gruppo di ricerca, questi hanno voluto valutare come la poli-L-lisina a diverso peso molecolare possa influire nell'uptake delle SPIONs nelle cellule mesenchimali del midollo osseo di ratto. Essi giunsero alla conclusione che il polimero ad alto peso molecolare sia in grado di ottimizzare l'internalizzazione; infatti, alcune delle nanoparticelle ferromagnetiche testate furono ritrovate all'interno di lisosomi mentre altre all'interno di endosomi. In linea generale, da questo studio si è evinto che l'uptake dipende dalla concentrazione di polimero usata per modificare la superficie delle SPIONs [*Babic et al.*, 2008].

Le nanoparticelle ferromagnetiche, oltre che per marcare le cellule staminali, possono essere utilizzate anche come mezzi di trasporto per queste ultime e per consentirne il rilascio nei tessuti bersaglio. Infatti, Yang et al hanno funzionalizzato le SPIONs in modo bivalente: da una parte hanno coniugato un ligando specifico per le cellule staminali, dall'altra un ligando per il tessuto miocardico infartuato. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le SPIONs, guidate da un campo magnetico esterno, riescono a condurre le cellule staminali nella zona cardiaca lesa [Yang et al., 2008].

Immagine di risonanza magnetica (MRI)

Nanocristalli superparamagnetici di ossidi di ferro possono essere utilizzati come agenti di contrasto nella MRI (Magnetic Resonance Imaging), una tecnica usata in ambito medico che misura il rilassamento di spin nucleare protonico nei tessuti, riuscendo a trasformare il segnale in immagine. Particelle magnetiche micrometriche o complessi chelati di ioni magnetici iniettati nei tessuti fungono da agenti di rilassamento protonico, poiché contribuiscono a ridurre i tempi di rilassamento degli spin nucleari protonici T_1 (tempo di rilassamento spin-reticolo) e T_2 (tempo di rilassamento spin-spin). In particolare gli ossidi di ferro superparamagnetici, riducendo T_2 più che T_1 , determinano un oscuramento dell'immagine lì dove essi si accumulano.

I nanocristalli magnetici avrebbero come vantaggio il fatto di poter circolare nel sangue per un tempo maggiore rispetto a cristalli più grandi, di poter attraversare le pareti dei capillari e raggiungere i linfonodi e di essere anche promotori di rilassamento protonico più efficaci [*Gupta and Gupta, 2005a*].

Ipertermia

L'uso dell'ipertermia (calore) nel trattamento di tumori maligni è una tecnica molto antica. Già Ippocrate, il padre della medicina, sosteneva

che i tumori superficiali potevano essere cauterizzati applicando un ferro caldo. Ai giorni nostri, diversi metodi (bagno ad acqua calda, pirogeni come tossine batteriche miste, radiazioni ad alta frequenza, ipertermia dei fluidi metallici) vengono impiegati per riscaldare e distruggere i tumori.

Il campo magnetico non viene assorbito dai tessuti viventi e può essere applicato a regioni profonde del corpo.

Quando le particelle magnetiche sono sottoposte ad un campo magnetico alternato, viene generato calore a causa della perdita magnetica di isteresi. La quantità di calore generato dipende dalla natura del materiale magnetico e dai parametri del campo. Le particelle magnetiche incorporate all'interno delle cellule tumorali sottoposte ad un campo magnetico oscillante, si riscaldano, raggiungendo una temperatura che dipende dalle proprietà magnetiche del materiale, dalla forza del campo magnetico, dalla frequenza di oscillazione e dalla capacità di raffreddamento del flusso sanguigno nel sito in cui è presente il tumore. Pertanto, poiché le cellule tumorali sono sensibili alle elevate temperature verranno distrutte quando la temperatura raggiunge valori prossimi o superiori ai 43°C, mentre, le cellule normali, più resistenti all'elevate temperature, sopravviveranno [*Gordon et al.*, 1979] (figura 14).

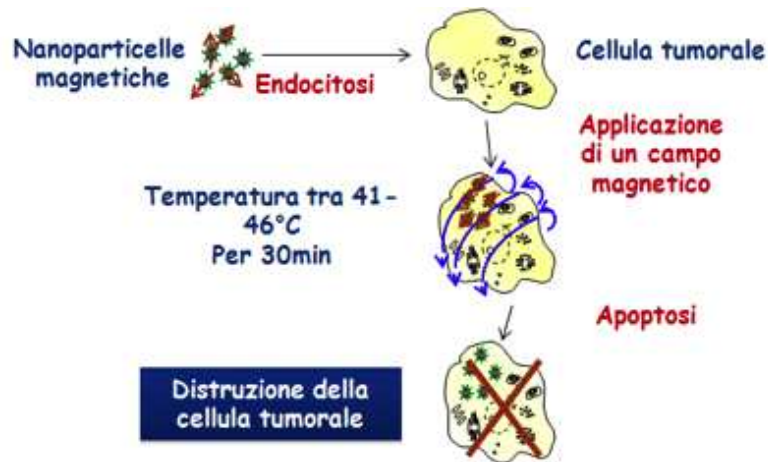


Figura 14. Ipertermia magnetica.

Magnetofection

La magnetofection è una tecnica in cui le nanoparticelle superparamagnetiche associate con vettori di DNA sono trasfettate all'interno delle cellule attraverso l'applicazione di un campo magnetico esterno. Per questo scopo le nanoparticelle superparamagnetiche devono essere rivestite con polimeri, come per esempio polietilenimina (PEI) [Scherer *et al.*, 2002].

In un recente studio, è stato dimostrato che i complessi DNA-PEI-SPIONs, attraverso il proton sponge effect, riescono ad evadere la barriera endosomiale, ed a rilasciare il gene di interesse nel nucleo. Utilizzando magneti permanenti o alternati le nanoparticelle saranno costrette a seguire il campo magnetico evitando la libera diffusione

all'interno del citoplasma, e determinando una maggiore efficacia di transfezione. È stato inoltre dimostrato che i complessi DNA-PEI-SPIONs sono meno tossici dei complessi PEI-DNA [Steitz *et al.*, 2007].

Trattamento dell'artrite

I corticosteroidi rappresentano un capo saldo nella terapia contro l'artrite. Essi vengono iniettati direttamente nelle articolazioni colpite; sebbene riescano a trattare i sintomi di questa patologia, a lungo andare possono provocare la formazione di cristalli che causano infezioni articolari. Recentemente sono stati sviluppati dei sistemi a base di SPIONs e corticosteroidi, ed è stato dimostrato come essi possano essere utili per risolvere il problema sopra detto.

Attraverso l'applicazione di un campo magnetico esterno, questi sistemi possono essere trattenuti nelle capsule articolari evitando le iniezioni ripetute e l'eliminazione dovuta all'attività macrofagica e dei sistemi drenanti [Butoescu *et al.*, 2009]. A tal proposito, SPIONs rivestite con polivinilalcol ed i loro analoghi fluorescenti sono stati iniettati direttamente in zone periarticolari di alcune pecore, per poi essere direzionate tramite campo magnetico esterno [Schulze *et al.*, 2005]. Il risultato dell'esperimento ha dimostrato che i sistemi sono biocompatibili e permangono nella zona di interesse per cinque giorni;

questa evidenza li rende potenzialmente utili per terapie ad azione prolungata.

Drug delivery

Un'importante applicazione delle SPIONs prevede la distribuzione specifica del farmaco, drug delivery systems (DDS), nel sito d'azione. La funzionalizzazione della superficie delle SPIONs le rende ottimi vettori di farmaci che vengono in tal modo direzionati nell'organo bersaglio e lì rilasciati. Infatti, applicando un campo magnetico esterno sarà possibile direzionare il farmaco veicolato in un sito ben specifico, riducendo così le dosi da somministrare e i potenziali effetti collaterali dannosi [*Langer and Peppas.*, 2003; *Langer*, 1998; *Peppas*, 2004].

Carriers opportunamente progettati possono essere applicati in numerosi campi farmaceutici, per la somministrazione orale, per il rilascio sostenuto, per il *drug targeting* in siti specifici, e per la somministrazione parenterale di farmaci antitumorali. Per tale applicazione, sono molto importanti la dimensione, la carica e la chimica superficiale delle particelle magnetiche, in quanto influenzano il tempo di circolazione nel sangue e la biodisponibilità delle particelle all'interno del corpo.

1.4.4 Caratteristiche chimico fisiche essenziali per il drug delivery

Forma: la morfologia delle nanoparticelle magnetiche è influenzata da diversi fattori tra cui le condizioni di reazione ed i reagenti chimici utilizzati.

Huang et al si occuparono di scoprire in che misura la forma delle nanoparticelle potesse condizionare il comportamento in vivo; essi scoprirono che biocompatibilità, biodistribuzione e clearance dipendono fortemente dalla loro forma. Questi si accorsero che le nanoparticelle con forma leggermente allungata, più o meno sferiche, si accumulano nel fegato; mentre, le nanoparticelle più allungate si accumulano principalmente nella milza. Inoltre, scoprirono che le nanoparticelle più corte, subiscono una rapida eliminazione sia per via renale che per via intestinale, se comparate con le nanoparticelle dalla forma più allungata [Huang et al., 2001].

Con buona probabilità, le nanoparticelle dalla forma allungata, rispetto alle nanoparticelle sferiche, resistono maggiormente nel torrente circolatorio perché stimolano in minor misura l'attività dei fagociti [Faddeel, 2010].

Ad ogni modo, le nanoparticelle magnetiche hanno una superficie che si presta bene a subire diverse modifiche utili sia per il rivestimento che per

le strategie di targeting. Mahmoudi et al dimostrarono come la forma delle SPIONs eserciti una diretta influenza sulla citotossicità; essi, notarono che le nano-perle, i nano-serpentelli e le nano-sfere sviluppano una azione citotossica maggiore rispetto alle nanoparticelle leggermente allungate o ai clusters di nano-cristalli colloidali [Mahmoudi et al., 2009a].

Dimensioni: alla grandezza delle nanoparticelle è direttamente connessa la loro emivita nonché la loro permanenza nel torrente circolatorio [Chouly et al., 1996]. Particelle con diametro minore di 10 nm subiscono filtrazione glomerulare e conseguente eliminazione attraverso le urine. Mentre, se le loro dimensioni superano i 100 nm, o si accumulano nella milza o subiscono fagocitosi; in entrambi i casi si ha una netta riduzione della concentrazione plasmatica del sistema. Si possono considerare ottimali dimensioni comprese tra i 10 ed i 100 nm; infatti, nanoparticelle con queste dimensioni mostrano una maggiore emivita, una maggiore capacità di eludere il sistema reticoloendoteliale ed inoltre riescono a permeare attraverso i capillari più piccoli [Gupta and Wells 2004b] accumulandosi nei tessuti tumorali attraverso l'effetto EPR.

Essendo le proprietà magnetiche delle SPIONs strettamente connesse alle loro dimensioni, tale parametro risulta estremamente importante non solo per il drug delivery, ma anche per le altre applicazioni mediche,

come la risonanza magnetica e l'ipertermia. Tutto ciò fa sì che il controllo delle dimensioni delle nanoparticelle, durante la loro preparazione, costituisca un punto di fondamentale importanza.

Proprietà di superficie: la carica superficiale delle nanoparticelle rende conto della loro stabilità come sistema colloidale. In particolare, le nanoparticelle con elevato potenziale zeta (positivo o negativo) costituiscono sistemi dispersi stabili che non formano aggregati e non danno precipitazioni neppure dopo conservazione. La carica di superficie risulta importante anche per la biodistribuzione del sistema e per l'uptake dello stesso nelle cellule bersaglio. In un recente studio è stato, infatti, dimostrato che le SPIONs vengono internalizzate nelle cellule con meccanismi di endocitosi che variano al variare della superficie delle nanoparticelle [Gupta and Gupta 2005b]: Per esempio, si è visto come le SPIONs con carica positiva subiscono un maggior uptake da parte delle cellule di tumore alla mammella rispetto alle SPIONs con potenziale zeta negativo [Mahmoudi et al., 2011].

Le nanoparticelle rivestite con superfici idrofobiche hanno una clearance plasmatica eccessiva dovuta ai processi di opsonizzazione e digestione da parte dei macrofagi [Veiseh et al., 2010]. Al contrario, nanoparticelle ingegnerizzate con rivestimenti idrofilici, come per esempio polietilenglicole, riescono a superare il sistema reticoloendoteliale non

subendo digestione da parte dei macrofagi; ciò comporta un aumento del tempo di permanenza del sistema nel plasma e quindi la possibilità che si sviluppi l'effetto biologico [Harris *et al.*, 2003].

Formazione del core: I metodi più usati per preparare nanoparticelle superparamagnetiche in soluzione sono il metodo della coprecipitazione e quello della microemulsione [Tartaj *et al.*, 2005].

Il metodo della coprecipitazione può essere applicato secondo due diversi procedimenti; il primo, messo a punto da Sugimoto *et al.* [Sugimoto and Matijevic 1980], consiste nel preparare una sospensione di idrossido ferroso che verrà parzialmente ossidato attraverso l'uso di nitrati. La seconda metodica di coprecipitazione consiste invece nel preparare una soluzione acquosa di Fe^{+2} e Fe^{+3} in rapporto 1:2, alla quale verrà addizionata una base in un ambiente privo di O_2 [Massart *et al.*, 1981]. Quest'ultimo metodo, è stato scelto da Massart *et al.* i quali hanno così ottenuto un precipitato nero di nanoparticelle magnetiche dalla forma sferica e dalle dimensioni di circa 20 nm. Sugimoto *et al.* invece, hanno ottenuto nanoparticelle con diametro maggiore, compreso tra 30 e 200 nm. Questa differenza è dovuta al pH ed alla forza ionica della soluzione in cui avviene la precipitazione; è stato, infatti, dimostrato che le dimensioni delle nanoparticelle diminuiscono all'aumentare del pH e della forza ionica del mezzo di reazione. In realtà questi due fattori non

influenzano soltanto le dimensioni delle nanoparticelle ma anche il loro potenziale elettrostatico di superficie che risulta di fondamentale importanza per la stabilità dell'intero sistema.

Utilizzando la tecnica della microemulsione, si ottengono nanoparticelle più piccole ed uniformi. Questi sistemi si ottengono aggiungendo microgocce di fase acquosa alla fase continua oleosa; in un secondo momento, addizionando un tensioattivo, si formano delle micelle inverse le quali inglobano le microgocce. Le microemulsioni A/O appaiono trasparenti, sono isotropiche e termodinamicamente stabili in fase liquida. [Tartaj *et al.*, 2005]. Questa tecnica offre un enorme vantaggio rispetto alla prima in quanto le microgocce vengono sfruttate come se fossero dei nanoreattori in grado di formare uno spazio ben definito all'interno del quale si formeranno le nanoparticelle. Per fare ciò FeCl_2 e FeCl_3 , precursori del ferro; vengono precipitati nell'emulsione: il ferro che entra nel core acquoso si ossida, il ferro che rimane in fase organica invece è inerte. Così facendo sarà possibile controllare sia le dimensioni delle nanoparticelle che la loro superficie.

Rivestimento: Dopo aver prodotto il core delle SPIONs, si procede con il suo rivestimento. Questo passaggio è di fondamentale importanza perché in funzione del polimero scelto variano le caratteristiche delle nanoparticelle nonché il loro possibile uso ed il loro direccionamento.

Rivestire le SPIONs è essenziale per diversi motivi: aumenta la stabilità e la possibilità di disperdere il sistema, la superficie è protetta dall'ossidazione, si creano siti di ancoraggio per molecole direzionanti, si aumentano le possibilità di uptake, si riduce la clearance plasmatica, si aumenta la biocompatibilità e quindi si riducono citotossicità ed interazioni non specifiche. Per esempio, è stato osservato come la presenza di gruppi amminici nel rivestimento comporti un aumento dell'uptake dei sistemi nelle cellule di melanoma [*Petri-Fink et al.*, 2005].

La superficie delle nanoparticelle può essere modificata attraverso la creazione di alcuni strati atomici costituiti da: polimeri organici, metalli inorganici (oro) o superfici di ossido (silice o alluminio), utilizzati per la funzionalizzazione e l'attacco di molecole bioattive [*Berry et al.*, 2003].

Durante la preparazione di nanoparticelle in forma colloidale, la stabilità del colloide è di massima importanza.

I ferrofluidi sono sospensioni colloidali di nanoparticelle magnetiche (Fe_3O_4 o Fe_2O_3) che risentono dell'effetto di un campo magnetico esterno, mantenendo la loro fluidità [*Bailey*, 1983; *Khalafalla and Reimers*, 1980].

In assenza di un rivestimento superficiale, le nanoparticelle superparamagnetiche presentano una superficie idrofobica, con un

elevato rapporto area superficiale/volume. Queste, per effetto di interazioni idrofobiche, tendono ad aggregarsi e formare clusters, incrementando le dimensioni delle stesse nanoparticelle. Inoltre, tali clusters, attratti reciprocamente da forti interazioni magnetiche di tipo dipolo-dipolo, assumeranno un comportamento di tipo ferromagnetico [Hamley, 2003].

Quando due grandi cluster di particelle si avvicinano tra loro, ognuno di essi penetra nel campo magnetico dell'altro. Oltre l'incremento delle forze di attrazione tra le particelle, ogni particella trovandosi nel campo magnetico del cluster adiacente acquista un'ulteriore magnetizzazione, comportando in ultima analisi un aumento delle proprietà di aggregazione.

Pertanto durante la preparazione delle nanoparticelle magnetiche è indispensabile aggiungere alcuni stabilizzatori, come tensioattivi o colloidali protettori, al fine di prevenire l'aggregazione dei particolati nanometrici.

Molti di questi polimeri aderiscono alla superficie in modo substrato-specifico.

Il rivestimento delle nanoparticelle magnetiche può essere effettuato direttamente durante la loro sintesi, oppure mediante assorbimento in un

secondo step; in entrambi i casi si ottengono sistemi uniformemente rivestiti.

Purtroppo è stato dimostrato che la presenza di uno shell polimerico, per esempio di natura polisaccaridica, riduce le proprietà magnetiche delle SPIONs [Amstad *et al.*, 2009]. Un'eccessiva riduzione di questo valore comporterebbe l'impossibilità di direzionare le SPIONs al sito specifico attraverso l'applicazione del campo magnetico esterno. Pertanto è necessario rivestire le nanoparticelle con un'opportuna struttura che garantisca le medesime proprietà delle SPIONs nude.

Inoltre, la presenza del rivestimento polimerico non solo stabilizza le nanoparticelle, ma fornisce anche gruppi funzionali attivi utilizzabili per la coniugazione di farmaci e specifici ligandi [Zou *et al.*, 2010].

Oggetto di studio di vari gruppi di ricerca sono nanoparticelle di ossido di ferro rivestite con opportuni materiali, ottenendo per esempio vescicole polimeriche [Wei *et al.*; 2010], nanoparticelle magnetiche [Yang *et al.*, 2011], liposomi magnetici [Bothun *et al.*, 2011], e nanoparticelle lipidiche magnetiche [Ying *et al.*, 2011], utilizzate per il drug delivery.

Inoltre, si è visto che nanoparticelle magnetiche non rivestite sono significativamente citotossiche in quanto inducono reazioni cicliche redox e reazioni catalitiche secondo Fenton, costituendo una sostanziale

risorsa di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei sistemi biologici [Gupta et al., 2004b].

Per il rivestimento di nanoparticelle magnetiche si possono utilizzare diversi tipi di materiali inorganici o di natura polimerica [Salzman, 1983; Liz-Marzán and Kamat, 2003], che a loro volta possono essere sintetici o naturali.

Alcuni esempi di polimeri sintetici usati nel rivestimento delle SPIONs sono: il poli(etilene-co-vinil acetato), il poli (vinilpirrolidone) (PVP), il poli(lattico-co-acido glicolico) (PLGA), il poli(etilenglicole) (PEG), il polivinilalcol (PVA), etc. [Miller et al., 1983; Ruiz and Benoit, 1991].

Mentre tipici esempi di polimeri biocompatibili naturali, utilizzati per aumentare la stabilità, il tempo di permanenza nel torrente ematico e la biodistribuzione delle SPIONs, sono la gelatina, il destrano, il chitosano e il pullulano [Gupta and Gupta, 2005a; Li et al., 1997; Massia et al., 2000]. Diversi tensioattivi, come il sodio oleato, la dodecilamina e la sodio carbossimetilcellulosa, sono utilizzati al fine di aumentare la dispersione delle SPIONs in mezzi acquosi [Denizot et al., 1999].

Tra i polimeri naturali il destrano, polimero biocompatibile, può essere utilizzato come agente di rivestimento delle SPIONs legandolo covalentemente ai nuclei delle nanoparticelle, in quanto tende a dissociarsi se adsorbito solo fisicamente [Lin et al., 2008].

Un'ulteriore funzionalizzazione delle nanoparticelle rivestite con destrano può essere ottenuta coniugando molecole di varia natura ai gruppi ossidrilici del destrano.

Un altro polimero naturale è il chitosano, un polisaccaride lineare che consiste di unità ripetitive di N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, formato da una parziale N-deacetilazione del polisaccaride chitina [Muzzarelli, 2005].

Il chitosano, essendo un polimero con proprietà bioadesive e biocompatibile, ha applicazioni nell'industria farmaceutica e viene utilizzato come carrier di farmaci, promotore d'assorbimento e agente chelante di metalli.

Lee e collaboratori hanno preparato SPIONs rivestite di chitosano dimostrando il loro uso come agente di contrasto nell'MRI su un modello di coniglio [Lee et al., 2005].

Tra i polimeri di sintesi il polietilenglicole (PEG) è stato usato come rivestimento per stabilizzare le SPIONs. La superficie ricoperta di PEG minimizza o elimina l'assorbimento di proteine sulla superficie delle nanoparticelle, permettendo loro di sfuggire al RES. Per immobilizzare il PEG sulla superficie delle SPIONs sono comunemente usati degli agenti silanici, come il 3-aminopropiltrimetossisilano [Kim et al., 2002].

Anche i copolimeri ottenuti a partire dall'ossido di polietilene (PEO), polimero biocompatibile e non biodegradabile, sono utilizzati come materiali di rivestimento per stabilizzare le SPIONs; questi hanno caratteristiche vantaggiose quali l'idrofilia e la resistenza all'assorbimento di proteine, aumentando la permanenza nel circolo ematico.

Anche il polivinil alcol (PVA) è un ottimo polimero di sintesi che previene la coagulazione e dà vita a nanoparticelle monodisperse [*Pardoe et al.*, 2001].

Il rivestimento delle SPIONs può essere effettuato anche con molecole inorganiche, come per esempio la silice [*Dormer et al.*, 2005].

Recentemente parecchi autori hanno riportato la preparazione di nanoparticelle di ossido di ferro rivestite d'oro. Il rivestimento con oro non solo offre alta stabilità e previene la corrosione e l'ossidazione del nucleo di ossido di ferro, ma mostra anche un'ottima biocompatibilità. Il principale vantaggio del rivestimento d'oro è che il guscio d'oro può reagire facilmente con molecole tiolo-terminanti formando legami covalenti e offrendo la possibilità di funzionalizzazione chimica [*Lyon et al.*, 2004].

Drug loading: L'incorporazione del farmaco all'interno delle SPIONs deve avvenire in modo tale da non alterare la loro funzionalità e da

garantire che al sito bersaglio giunga la corretta quantità di principio attivo necessaria ad esplicare l'effetto terapeutico desiderato.

Il farmaco può essere caricato in diversi modi: può essere fatto adsorbire sulla superficie delle SPIONs oppure lo si può aggiungere durante il processo di fabbricazione del core, prima ancora di creare il rivestimento delle nanoparticelle.

Quando si sceglie di adsorbire il farmaco sulla superficie delle SPIONs, si va incontro o alla formazione di legami chimici covalenti o a interazioni fisiche di diversa natura. Nel primo caso il farmaco reagisce con gruppi amminici o idrossilici esposti sulla superficie delle nanoparticelle; mentre, nel secondo caso il farmaco per adsorbirsi sulla superficie delle nanoparticelle sfrutta la sua affinità verso eventuali residui elettrostatici oppure crea interazioni in base alla sua natura idrofilica o idrofobica.

La formazione dei legami covalenti è particolarmente indicata per tutti quei farmaci di natura peptidica che risultano facilmente ossidabili.

Per quanto riguarda le interazioni fisiche, se ne possono formare di varia natura. Alcune SPIONs, per esempio, sono state rivestite con polietilenimina, ossia un polimero cationico che ha reso le nanoparticelle in grado di interagire con il DNA a livello dei suoi siti carichi negativamente; grazie a questo tipo di interazione, le SPIONs

possono essere sfruttate per la terapia genica [Steitz *et al.*, 2007]. Altre nanoparticelle superparamagnetiche sono state rivestite con polimeri idrofobici in modo tale da far adsorbire un farmaco idrofobico.

Nonostante gli svariati vantaggi offerti dalla coniugazione del farmaco alla superficie delle SPIONs esistono anche diversi limiti; uno dei più grandi è rappresentato dalla scarsa capacità delle SPIONs di intrappolare farmaci sulla loro superficie. Un secondo svantaggio deriva dalla formazione dei legami covalenti che, seppure stabilizzano il farmaco, potrebbero essere responsabili del suo mancato rilascio a livello del sito bersaglio. In più le procedure di adsorbimento vengono condotte in presenza di catalizzatori come il rame che, se non vengono opportunamente allontanati, possono causare citotossicità.

Recentemente, per ovviare al limite della scarsa quantità di farmaco caricabile sulla superficie delle nanoparticelle, è stato proposto di funzionalizzare la superficie stessa con appositi ligandi, che aumentino le capacità delle SPIONs di intrappolare principi attivi.

Un approccio di drug loading diverso è quello che prevede il caricamento del farmaco durante la formazione delle SPIONs, prima del loro rivestimento. Questo metodo pone rimedio sia al problema della scarsa capacità delle SPIONs di intrappolare farmaco, che a quello della stabilità del principio attivo.

Recentemente sono stati creati dei sistemi che prendono il nome di magneto-liposomi. Essi sono formati da un core di nanoparticelle ferromagnetiche avvolto da un doppio strato fosfolipidico; hanno dimensioni nanometriche, riescono ad accogliere discrete quantità di farmaco, risultano molto stabili e mantengono le proprietà magnetiche delle nanoparticelle nude [Skouras *et al.*, 2011]. La presenza del bilayer fosfolipidico offre numerosi vantaggi tra i quali:

- una maggiore biocompatibilità del sistema.
- una maggiore protezione del farmaco dalla possibile degradazione in vivo.
- la possibilità di apportare modifiche superficiali al fine di far raggiungere il sistema al tessuto bersaglio.
- la possibilità di avere un maggior numero di nanoparticelle magnetiche all'interno del sistema; ciò garantisce maggiori proprietà magnetiche pur mantenendo le dimensioni nanometriche [Mulder *et al.*, 2006].

Quando i magneto-liposomi vengono esposti a campi magnetici forti e costanti, si assiste ad un allineamento delle nanoparticelle magnetiche all'interno del doppio strato fosfolipidico. Ne consegue un'aggregazione dei magneto-liposomi, nonché una loro fusione con rilascio di farmaco in situ.

1.4.5 Strategie di targeting per le SPIONs

I sistemi superparamagnetici possono raggiungere il tessuto bersaglio sfruttando tre diversi meccanismi di targeting:

Passivo: Effetto EPR

Attivo: il sito bersaglio viene raggiunto conoscendo i recettori in esso sovraespressi ed ingegnerizzando la superficie delle nanoparticelle con delle strutture che abbiano elevata affinità per questi recettori.

Magnetico: le SPIONs si accumulano nel tessuto bersaglio grazie alla presenza di un gradiente magnetico intorno alla zona interessata. Il gradiente viene creato utilizzando un magnete esterno [Dobson, 2006]. Modulando la forza del campo magnetico applicato si può modulare il rilascio di farmaco dalle nanoparticelle.

1.4.6 Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione delle SPIONs

Affinché un sistema farmaceutico innovativo possa essere sfruttato a scopo diagnostico o terapeutico è necessario che abbia delle caratteristiche farmacocinetiche ottimali. Proprio per questo motivo, gli studi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione assumono importanza primaria quando si vuole passare dalla ricerca da banco alla sperimentazione clinica.

Uptake e biodistribuzione in differenti citotipi

In letteratura sono riportati svariati esempi di internalizzazione e biodistribuzione delle SPIONs in funzione di diversi sistemi cellulari. È noto che, quando somministrate per endovena, le nanoparticelle superparamagnetiche subiscono riconoscimento e fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticoloendoteliale presente nel fegato, nella milza e nel tessuto linfatico [Corot *et al.*, 2006; Barry, 2008]. Somministrando il sistema superparamagnetico in bolo, la prima barriera che si prospetta dinnanzi alle nanoparticelle è l'endotelio vascolare; affinché il sistema raggiunga il sito bersaglio, l'endotelio deve essere superato. Hanini *et al.*, utilizzando la microscopia confocale, hanno studiato l'interazione tra le nanoparticelle di Fe₃O₄ e le cellule dell'endotelio umano. In particolare, le cellule endoteliali della vena ombelicale umana sono state incubate insieme alle nanoparticelle superparamagnetiche (10 µg ml⁻¹); l'uptake è risultato soddisfacente e si è notato un aumento di fluorescenza a livello citoplasmatico. Questo esperimento ha dimostrato che le nanoparticelle superparamagnetiche possono essere internalizzate con un semplice meccanismo di micropinocitosi e non necessariamente attraverso processi che coinvolgano la formazione di vescicole proteiche [Hanini *et al.*, 2011].

Wang et al invece, hanno approfondito lo studio della biodistribuzione delle SPIONs servendosi della spettrofotometria ad assorbimento atomico. Questa tecnica d'indagine ha permesso loro di scoprire che le nanoparticelle riescono a distribuirsi in svariati organi bersaglio tra cui cuore, reni, polmoni, intestino e midollo osseo; la maggiore distribuzione si sviluppa però a carico di fegato e milza, il che rende le SPIONs particolarmente adatte per terapie dirette a questi organi [*Wang et al.*, 2010].

I fattori che più determinano le caratteristiche farmacocinetiche, nonché la tossicità delle SPIONs, sono le dimensioni, il tipo di rivestimento utilizzato e le cariche superficiali [*Chouly et al.*, 1996].

È stato visto che nanoparticelle con diametro minore di 50 nm riescono ad evitare il sistema di opsonizzazione, aumentando il loro tempo di permanenza nel torrente circolatorio. Queste nanoparticelle verranno fagocitate gradualmente dalle cellule del sistema reticoloendoteliale presenti nel fegato, nella milza e nel midollo osseo. Al contrario, i sistemi con dimensioni maggiori di 50 nm subiscono una rapida eliminazione da parte delle cellule di Kupffer presenti a livello epatico [*Barry*, 2008].

La degradazione dei sistemi superparamagnetici a carico del fegato dipende fortemente, oltre che dalle loro dimensioni, anche dal materiale

usato per il rivestimento. In generale, quando si usano materiali idrofobici, che limitano l'accesso dell'acqua al core magnetico, si ottiene una minore degradazione dei sistemi e quindi un aumento della loro emivita plasmatica.

Un altro parametro fondamentale è la carica espressa dalla superficie delle nanoparticelle. Quando la superficie è ricca di cariche positive, i sistemi interagiscono in maniera aspecifica con diversi citotipi; ciò dipende dal fatto che le membrane cellulari sono dotate di molti residui carichi negativamente. Quando, invece, le nanoparticelle espongono cariche negative le interazioni diventano più specifiche nei confronti delle cellule epatiche con un conseguente aumento della degradazione dei sistemi [Briley-Saebo *et al.*, 2004].

Eliminazione delle SPIONs dai sistemi biologici

Un drug delivery systems viene considerato ottimale quando, in seguito al rilascio del farmaco nel sito bersaglio, esso viene completamente eliminato dal sistema biologico senza che si sviluppino effetti dannosi per l'organismo. Affinché le nanoparticelle superparamagnetiche possano essere utilizzate in sicurezza è necessario un approfondimento sulle loro caratteristiche farmacocinetiche, soprattutto per ciò che

riguarda il loro metabolismo e la loro eliminazione, in modo tale da poter chiarire eventuali aspetti tossici.

L'uptake, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione del ferro introdotto con la dieta, sono fenomeni altamente regolati nel nostro sistema biologico. Si è visto che i meccanismi specializzati alla regolazione dei livelli di ferro nel nostro organismo sono anche coinvolti nei processi di degradazione delle nanoparticelle superparamagnetiche. In letteratura viene riportato che le SPIONs vengono principalmente degradate dai lisosomi [Arbab *et al.*, 2005, Levy *et al.*, 2010].

Gu *et al.* hanno proposto tre diversi meccanismi con cui le SPIONs vengono degradate dalle cellule macrofagiche. Come prima cosa notarono che durante la replicazione mitotica le SPIONs internalizzate venivano cedute alle cellule figlie. In un secondo momento notarono che le SPIONs internalizzate subivano degradazione ad opera del pH acido lisosomiale e lo ione ferro, liberato nel citoplasma, veniva conservato grazie all'aiuto di proteine specializzate come la ferritina e la emosiderina. Come terzo meccanismo questi studiosi proposero che le SPIONs venissero direttamente attaccate dai macrofagi, ma non riuscirono a supportare la loro tesi con evidenze sperimentali [Gu *et al.*, 2011].

Escrezione

La via ottimale per eliminare le SPIONs è la via renale; in questo modo, infatti, le nanoparticelle subiscono un minore metabolismo cellulare rispetto a quanto avverrebbe nel fegato, riducendo la probabilità di creare specie reattive dell'ossigeno che possano indurre tossicità. Per fare in modo che le SPIONs subiscano eliminazione renale, è necessario che la loro superficie, il raggio idrodinamico ed il rivestimento, siano appropriati.

1.4.7 Limiti dell'utilizzo delle SPIONs come Drug Delivery System

Creare un gradiente di campo magnetico

Affinché le nanoparticelle magnetiche si accumulino in un tessuto bersaglio e vengano internalizzate dalle cellule è necessario esporle ad un opportuno gradiente di campo magnetico. Il flusso sanguigno arterioso e venoso si oppone all'attuazione del gradiente; pertanto, per avere accumulo, è necessario che le forze applicate superino questa resistenza [*Mahmoudi et al.*, 2011].

I vasi sanguigni e gli organi più interni del nostro organismo non possono essere raggiunti applicando campi magnetici esterni. Infatti, all'aumentare della distanza tra il magnete ed il tessuto target la forza del

campo magnetico sul tessuto bersaglio diminuisce. Ciò comporta che soltanto le aree superficiali del nostro organismo possano essere raggiunte tramite targeting magnetico. Per superare questo limite, si è pensato di utilizzare dei magneti superconduttori che riescono ad esercitare una forza magnetica molto elevata. Attraverso questi potenti magneti si è riusciti ad ottenere una penetrazione dei sistemi attraverso la cute fino a 20 mm di profondità [*Takeda et al.*, 2007].

Ultimamente sono stati proposti anche degli impianti o stents magnetici che inseriti in loco possano aumentare l'accumulo delle nanoparticelle nel tessuto bersaglio [*Chen et al.*, 2005; *Yellen et al.*, 2005; *Rosengart et al.*, 2005]. Ciò che limita fortemente l'utilizzo di tali impianti è la ridotta compliance del paziente, in quanto sono necessari interventi chirurgici d'impianto ed espianto dei sistemi.

Burst effect

Un altro limite delle SPIONs è rappresentato dal rilascio massiccio di farmaco caricato sulla superficie delle nanoparticelle. Idealmente, le SPIONs dovrebbero rilasciare tutto il farmaco incorporato a livello del tessuto bersaglio. Purtroppo, quando la superficie dei sistemi non è opportunamente modificata, il prematuro rilascio del farmaco può indurre tossicità. Questo effetto, può essere limitato creando sulla superficie delle SPIONs dei legami crociati con opportuni polimeri. Si è

visto, infatti, che nanoparticelle rivestite con PEG-fumarato riescono a ridurre il rilascio massiccio di farmaco fino al 21%, rispetto alle nanoparticelle contenenti tamoxifene che non presentano legami crociati nel rivestimento [Mahmoudi et al., 2009b].

Mahmoudi et al [Mahmoudi et al., 2010], hanno utilizzato dell'amido per rivestire microsfele poliuretatiche contenenti SPIONs cariche di teofillina. Questi, hanno notato una considerevole riduzione del rilascio massiccio di farmaco, probabilmente dovuta al fatto che le catene di amido ad alto peso molecolare si intrecciano col il poliuretano, formando una barriera che si oppone alla libera diffusione del farmaco nei fluidi circostanti.

Bassa biodisponibilita'

La via di somministrazione scelta per le SPIONs è quella endovenosa. Sebbene attraverso tale via si raggiunge una biodisponibilità del 100%, l'uptake nelle cellule bersaglio risulta limitato a causa di un uptake non specifico da parte del sistema reticoloendoteliale e di un interazione non specifica con le proteine plasmatiche. Tuttavia, ingegnerizzando la superficie delle SPIONs con opportuni ligandi, è possibile aumentare l'uptake nel tessuto bersaglio [Mahmoudi et al., 2011; Gupta and Wells, 2004b; Veiseh et al., 2010]

1.4.8 Tossicità

Le SPIONs sono note per essere eliminate dal nostro organismo attraverso le vie metaboliche del ferro. Liu et al hanno valutato la tossicità di singole dosi e di dosi ripetute di SPIONs dopo somministrazione, attraverso iniezioni sottocutanee, a dei topi. I risultati ottenuti hanno confermato un basso potenziale di rischio associato alle nanoparticelle superparamagnetiche, nessuna citotossicità e nessun effetto clinico rilevante. Inoltre, gli studi istopatologici non hanno rivelato alcuna presenza di pigmenti riconducibili alle SPIONs, né nei macrofagi, né in organi maggiori quali fegato, milza, reni, polmoni, cervello o cuore. Nonostante tutte queste evidenze, alcuni studi riportano una certa tossicità dovuta all'uso delle SPIONs; la prima causa plausibile è quella dell'accumulo del ferro nel tessuto bersaglio. Quando il rivestimento delle nanoparticelle viene degradato, i livelli citoplasmatici di nanoparticelle di Fe_3O_4 aumentano a tal punto da alterare l'omeostasi cellulare. Tutto ciò può portare ad alterazioni della risposta da parte delle cellule con conseguente danno a carico del DNA, risposte infiammatorie, stress ossidativo, mutazioni geniche, disorganizzazione del citoscheletro e quindi morte cellulare. Inoltre, è noto che le nanoparticelle nude di Fe_3O_4 possono essere attaccate dai lisosomi e digerite ulteriormente fino a liberare il catione ferro. Questo, reagendo con perossidi o ossigeno,

può dar vita a specie radicaliche altamente reattive, responsabili di effetti genotossici [Veiseh *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008; Toyokuni, 1996]. E' stato anche evidenziato che le SPIONs sono in grado di far progredire il ciclo cellulare dalle fase G2 alla fase M [Mahmoudi *et al.*, 2009c].

1.4.9 Prospettive future

Il concetto di drug delivery per mezzo di nanoparticelle magnetiche, trae beneficio dal fatto che la nanotecnologia ha raggiunto uno sviluppo tale da rendere possibile, non solo la produzione di nanoparticelle magnetiche con proprietà superparamagnetiche in un range molto stretto di dimensioni, ma anche di strutturare la superficie di queste particelle, per riuscire a trasferire farmaci in siti specifici. La magnetite grazie alle sue forti proprietà magnetiche, è stata utilizzata prima in biologia, quindi in medicina, per la separazione magnetica di prodotti biologici e cellule, e quindi per l'orientamento dei sistemi particellari e per il trasporto di farmaci in siti specifici. La dimensione, la carica e la chimica superficiale delle particelle magnetiche sono in grado di influenzare la loro biodistribuzione.

Le SPIONs vengono considerate come dei sistemi promettenti per svariati motivi. Innanzitutto sono semplici da preparare ed il loro profilo tossicologico è molto buono; in secondo luogo permettono il targeting

magnetico senza per questo escludere la possibilità di avere al contempo anche il targeting passivo o attivo. In più risultano applicabili sia per scopi diagnostici che terapeutici, soprattutto per la cura di tumori molto vicini alla superficie corporea, per i quali si può utilizzare il gradiente di campo magnetico.

2. SCOPO DELLA TESI

Tenuto conto di quanto detto nella parte introduttiva sull'importanza dei carrier nanostrutturati quali vettori per il rilascio di molecole attive ai siti bersaglio, il presente lavoro di ricerca è stato rivolto alla preparazione e alla caratterizzazione di diversi sistemi colloidali polimerici potenzialmente applicabili in ambito biomedico per la veicolazione di farmaci. Tali sistemi sono stati preparati a partire da differenti derivati polimerici, ottenuti a partire dalla α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA), un polimero di sintesi a struttura poliamminoacidica, altamente solubile in acqua e nei più comuni solventi organici [*Giammona et al.*, 1987], e dall'inulina, polimero naturale a struttura polisaccaridica.

Il PHEA (Figura 15) è di norma sintetizzato attraverso una procedura standardizzata è messa a punto nel gruppo dove ho svolto il mio lavoro di ricerca. In breve, in seguito ad una reazione di policondensazione termica dell'acido aspartico, si ottiene una poli-succinimide (PSI), insolubile in acqua. Quest'ultima subisce una reazione di amminolisi totale con etanolammina.

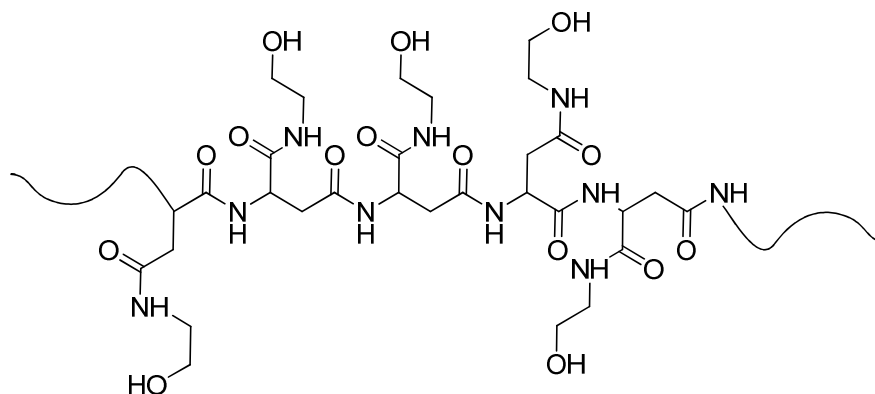


Figura 15. Struttura chimica dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA).

Caratteristica fondamentale del PHEA è la presenza di gruppi ossidrilici in catena laterale, mediante i quali è possibile legare covalentemente al *backbone* polimerico molecole di varia natura portanti opportuni gruppi funzionali e che possono, quindi, conferire al PHEA le caratteristiche desiderate. Inoltre, diversi studi farmacologici e tossicologici hanno dimostrato la biocompatibilità e l'assenza di tossicità acuta e sub-acuta di tale polimero che è stato già proposto in diversi lavori scientifici come macromolecola di partenza per ottenere innovativi *Drug Delivery Systems*, come: profarmaci macromolecolari [Cavallaro *et al.*, 2004a], idrogeli [Pitarresi *et al.*, 2007], nanoparticelle [Licciardi *et al.*, 2013] e micelle [Craparo *et al.*, 2008; Licciardi *et al.*, 2010; Ognibene *et al.*, 2011].

Viste le ottime caratteristiche di reattività chimica e di tollerabilità biologica del PHEA e l'enorme versatilità degli approcci di grafting

per la costruzione di copolimeri, obiettivo del mio lavoro di dottorato è stato quello di valutare la possibilità di ottenere nuovi copolimeri di tipo graft da usare come drug delivery system. I copolimeri di tipo graft sintetizzati sono stati ottenuti mediante due diversi approcci; in alcuni casi è stato utilizzato il grafting onto, ovvero l'attacco covalente di catene già precostituite al backbone polimerico; in altri casi il grafting from, mediante atom transfer radical polymerization (ATRP).

Come ampiamente descritto nella parte introduttiva, i sistemi di tipo micellare, che si ottengono dall'auto-aggregazioni di copolimeri anfifilici, mostrano una serie di caratteristiche peculiari (tra cui le nanodimensioni, la tipica struttura *core-shell*, la facilità di manipolazione chimica della superficie, la semplicità di produzione) che li rendono ottimali come carriers per il rilascio di farmaci. Numerosi studi riportati in letteratura, hanno evidenziato che un possibile direccionamento attivo al SNC può essere ottenuto funzionalizzando la superficie dei sistemi colloidali con tensioattivi idrofili come i Polisorbati 20, 40, 60 e 80, capaci di interagire con l'endotelio cerebrale [*Kreuter et al.*, 1997].

In considerazione di ciò, sono state preparate e caratterizzate micelle polimeriche direzionate al SNC grazie all'introduzione nel backbone polimerico del PHEA di residui di Polisorbato 80 (PS₈₀).

Allo scopo di sintetizzare i copolimeri necessari alla preparazione delle micelle polimeriche, il PHEA è stato fatto reagire inizialmente con etilendiammina (EDA), al fine di legare un derivato idrofobico aldeidico a struttura squalenoidica (Sq), ottenendo il copolimero anfifilico PHEA-EDA-Sq. Successivamente, il copolimero PHEA-EDA-Sq è stato fatto reagire con il PS₈₀ al fine di introdurre l'agente direzinante per il SNC, ottenendo il copolimero anfifilico PHEA-EDA-Sq-PS₈₀.

Il derivato squalenoidico è stato scelto, in questo lavoro, in quanto è un composto naturale, presenti in diversi oli alimentari (olio di squalo e olio di oliva) e precursori endogeni nella sintesi del colesterolo.

A causa dei numerosi benefici che apporta quando assunto attraverso l'alimentazione e grazie alla sua biocompatibilità, lo squalene è stato spesso usato come eccipiente in diverse formulazioni farmaceutiche.

Inoltre, lo squalene agisce da agente protettivo, riduce gli effetti collaterali causati dall'assunzione di farmaci chemioterapici ed inibisce la proliferazione delle cellule tumorali [*Shi et al.*, 2002; *Reddy et al.*, 2009].

Ad oggi il suo principale impiego è quello di adiuvante immunologico nei vaccini, in quanto stimola la risposta immunitaria [Wintsch *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 2009].

Inoltre, diversi autori, hanno sviluppato il concetto di “*squalenoylation*”, indicando una procedura sintetica che prevede, attraverso la formazione di legame chimici tra derivati dello squalene e analoghi nucleosidici, di migliorare le proprietà farmacologiche di quest’ultimi. Pertanto, la “*squalenoylation*” è stata proposta come una nuova tecnologia per produrre sistemi farmaceutici nanostrutturati con migliori potenzialità [Reddy *et al.*, 2009].

Il copolimero ottenuto, PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ è stato caratterizzato mediante analisi ¹H-NMR. La formazione delle micelle è stata studiata attraverso l’analisi spettroscopica a fluorescenza e analisi 2D ¹H NMR NOESY.

Per confermare la formazione di nanostrutture colloidali in mezzo acquoso, sono state eseguite misure di Dynamic Light Scattering (DLS) al fine di valutare le dimensioni medie, il PDI e il potenziale zeta delle micelle ottenute.

Inoltre, sono stati effettuati studi di rilascio in condizioni fisiologiche simulate a pH 7,4 e studi di stabilità in plasma. Infine, è stata valutata la biocompatibilità in vitro delle micelle su cellule di neuroblastoma

murino (Neuro2a) e la capacità delle micelle cariche di farmaco di penetrare all'interno delle Neuro2a.

Negli ultimi decenni, la moderna tecnologia farmaceutica ha rivolto notevole interesse verso l'impiego di nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIONs) come drug delivery system.

Questi sistemi, come ampiamente descritto nella parte introduttiva, sono utili strumenti versatili nella diagnostica precoce [*Gupta and Gupta, 2004b*], nel trattamento dei tumori attraverso ipertemia [*Gao et al., 2012*] e possono agire come veicolo di distribuzione di farmaci, al fine di direzionarli, tramite applicazione di un campo magnetico esterno, ad organi o specifiche cellule, minimizzandone in tal modo gli effetti secondari sistemici negativi [*Pankhurst et al., 2009*].

Caratteristica dei sistemi superparamagnetici è il loro comportamento magnetico: questi si magnetizzano fino a saturazione, in presenza di un campo magnetico applicato dall'esterno e al contempo quando il campo verrà rimosso le nanoparticelle non presenteranno alcuna magnetizzazione residua. Ciò rende meno probabile la formazione di aggregati, che potrebbero costituire un limite al tempo di emivita del sistema in quanto esso verrebbe più facilmente fagocitato ed eliminato se si trovasse sotto forma di aggregati. Inoltre, escludere la formazione

di aggregati, permette di escludere anche la formazione di eventuali trombi.

In virtù delle grandi potenzialità offerte da tali sistemi, sono state preparate e caratterizzate nanoparticelle superparamagnetiche rivestite con differenti copolimeri anfifilici, come sistemi potenzialmente utilizzabili per la diagnosi e il trattamento di tumori.

In particolare, una parte del lavoro sperimentale è pertanto consistita nella preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle magnetiche, costituite da una matrice polimerica biocompatibile contenente un certo numero di domini superparamagnetici di ossido di ferro di 10 nm, potenzialmente sfruttabili per il *Magnetic Targeting* e il *Drug Delivery*. A tale scopo tali nanoparticelle sono state caricate con la Flutamide, un farmaco antitumorale la cui azione consiste nell'inibire e prevenire il legame tra il testosterone e i recettori che si trovano sulla superficie delle cellule tumorali. Il polimero utilizzato per la produzione di queste nanoparticelle è il copolimero graft idrofobico PHEA-IB-poly(ButMA), ottenuto mediante tecniche di polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico (ATRP) e, il metodo utilizzato per la produzione delle stesse è stato quello dell'omogeneizzazione e successiva evaporazione del solvente. L'ATRP è una tecnica che presenta molteplici vantaggi, tanto per le

blande condizioni di reazione che la rendono facilmente eseguibile, quanto per la versatilità che la caratterizza, dal momento che essa permette di polimerizzare una grande varietà di monomeri per ottenere copolimeri con composizioni differenti e dalle più svariate topologie [Coessens *et al.*, 2001]. Essa inoltre fornisce un controllo sulla reazione, non attuabile tramite la polimerizzazione radicalica convenzionale, che consente la realizzazione di copolimeri con strutture ben definite cui sono associate proprietà chimico-fisiche e meccaniche particolari. Può essere condotta in una varietà di solventi e condizioni, compresi acqua e temperatura ambiente, e tollera vari gruppi funzionali. Le condizioni di polimerizzazione e i parametri possono essere variati per migliorare il controllo sulla cinetica di reazione.

Sono state realizzate tre differenti tipi di nanoparticelle: nanoparticelle superparamagnetiche (MNPs), nanoparticelle superparamagnetiche caricate con flutamide (FLU-MNPs) e nanoparticelle caricate con flutamide non magnetiche (FLU-NPs).

Le nanoparticelle superparamagnetiche così preparate sono state ampiamente caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico. Le dimensioni medie delle nanoparticelle, l'indice di polidispersità (PDI) e il potenziale zeta sono state determinate mediante DLS. Al fine di

confermare le dimensioni e valutare la forma delle nanoparticelle ottenute, sono state condotte anche analisi TEM. Il comportamento magnetico delle nanoparticelle è stato confermato mediante misure di magnetizzazione in presenza di un campo magnetico esterno. Le nanoparticelle superparamagnetiche hanno mostrato dimensioni di circa 300 nm con una limitata distribuzione di dimensioni, un caratteristico comportamento superparamagnetico e un'elevata suscettività di attrazione rispetto a un campo magnetico esterno.

Sono state valutate, inoltre, la quantità di flutamide e di Fe_3O_4 incorporata all'interno delle nanoparticelle.

Il profilo di rilascio del farmaco è stato determinato in tampone fosfato a pH 7,4.

Attraverso studi in vitro sulle cellule di carcinoma prostatico (LNCaP) è stata valutata sia l'attività antitumorale della flutamide caricata all'interno delle nanoparticelle rispetto alla forma libera, che la capacità delle nanoparticelle di essere internalizzate.

Infine, allo scopo di valutare la potenzialità di tali nanoparticelle di agire come "*Magnetic Drug Delivery System*" per il "*Magnetic targeting*" sono stati condotti studi di biodistribuzione in vivo su ratti, dopo l'applicazione di un campo magnetico esterno.

Un'ulteriore parte del lavoro sperimentale è consistita nella preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle superparamagnetiche rivestite con un copolimero anfifilico contenente residui di acido folico, potenzialmente sfruttabili come *dual targeted delivery system* per la diagnosi o il trattamento dei tumori attraverso ipertermia.

Le matrici polimeriche utilizzate per la preparazione delle nanoparticelle superparamagnetiche sono state ottenute legando al PHEA catene di acido polilattico (PLA) e catene di NH₂-PEG-FA o di PEG-NH₂.

I copolimeri ottenuti PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG sono stati opportunamente caratterizzati mediante analisi ¹H-NMR, FT-IR e SEC.

I domini di magnetite (Fe₃O₄) sono stati rivestiti con PHEA-PLA-PEG-FA, ottenendo le nanoparticelle MNPs-FA, e con PHEA-PLA-PEG, ottenendo le nanoparticelle MNPs, attraverso il metodo della nanoprecipitazione in solvente organico.

Le nanoparticelle così preparate sono state ampiamente caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico. Le dimensioni medie delle nanoparticelle, l'indice di polidispersità (PDI) e il potenziale zeta sono state determinate mediante Dynamic Light Scattering (DLS); inoltre,

al fine di confermare le dimensioni e valutare la forma delle nanoparticelle ottenute, è stata condotta una microscopia elettronica a scansione (SEM). È stata anche determinata la quantità di Fe_3O_4 incorporato, mentre il comportamento magnetico delle nanoparticelle è stato confermato mediante misure di magnetizzazione in presenza di un campo magnetico esterno.

La citocompatibilità, sia delle nanoparticelle magnetiche rivestite con il copolimero contenente l' FA (MNPs-FA), che delle nanoparticelle magnetiche senza acido folico (MNPs) è stata valutata in vitro su cellule di carcinoma mammario umano (MCF7) e cellule dell' epitelio bronchiale umano (16HBE).

Inoltre, per valutare la potenzialità di tali nanoparticelle di discriminare cellule cancerose da cellule non tumorali, è stata valutata la capacità delle nanoparticelle di essere internalizzate dalle linee cellulari MCF7 e 16HBE attraverso studi di uptake.

È stato anche visualizzato al microscopio ottico l'uptake intracellulare delle MNPs-FA nelle cellule MCF7, utilizzando un magnete posto esternamente al pozzetto, al di sotto della coltura.

Infine, sono stati condotti esperimenti di microscopia confocale, marcando i copolimeri con la sonda fluorescente Alexa. Tali studi

hanno confermato ulteriormente che il ligando FA migliora l'accumulo delle MNPs-FA nel citoplasma cellulare.

Infine, sono state preparate e caratterizzate nanoparticelle superparamagnetiche rivestite con un copolimero anfifilico a struttura polisaccaridica, potenzialmente utilizzabili per la veicolazione di farmaci tumorali attraverso il "*Magnetic Targeting*".

Il nuovo copolimero è stato ottenuto derivatizzando l'inulina, polisaccaride naturale, biocompatibile, non tossico ed economico, con un derivato dello squalene e polietilenglicole. Tale copolimero è stato utilizzato per rivestire nanoparticelle superparamagnetiche di Fe_3O_4 . Sono state preparate nanoparticelle superparamagnetiche (MNPs) e nanoparticelle superparamagnetiche cariche di Doxorubicina base libera (MNPs-Doxo). I sistemi ottenuti sono stati ampiamente caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico. Le dimensioni medie delle nanoparticelle, l'indice di polidispersità (PDI) e il potenziale zeta sono state determinate mediante DLS. Al fine di confermare le dimensioni e valutare la forma delle nanoparticelle ottenute, sono state condotte anche analisi SEM. Il comportamento magnetico delle nanoparticelle è stato valutato qualitativamente, applicando un campo magnetico esterno ad una dispersione di nanoparticelle. Le

nanoparticelle magnetiche, oggetto di tale lavoro, hanno mostrato dimensioni di circa 50 nm con una limitata distribuzione dimensionale. Sono state valutate, inoltre, la quantità di doxorubicina e di Fe_3O_4 incorporata all'interno delle nanoparticelle.

Il profilo di rilascio del farmaco è stato determinato in tampone fosfato a pH 7,4 e a pH 5,5.

Attraverso studi in vitro sulle cellule di carcinoma al colon umano (HCT116) è stata valutata sia l'attività antitumorale della doxorubicina caricata all'interno delle nanoparticelle rispetto alla forma libera, che la capacità delle nanoparticelle di essere internalizzate. Inoltre, allo scopo di valutare la potenzialità di tali nanoparticelle di agire come DDS per il "*Magnetic targeting*" è stato valutato l'uptake cellulare delle MNPs-Doxo in presenza di un campo magnetico esterno.

RISULTATI E DISCUSSIONE**3. SISTEMI NANOSTRUTTURATI CONTENENTI DERIVATI SQUALENICI PER IL DIREZIONAMENTO DI FARMACI AL SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

Allo scopo di creare dei sistemi in grado di direzionare in maniera attiva farmaci al SNC, si è sintetizzato e caratterizzato un nuovo copolimero anfifilico a partire dal PHEA, funzionalizzato con PS₈₀, utilizzabile per la preparazione di micelle polimeriche potenzialmente sfruttabili come “*Drug Delivery Systems*”. Infatti, come descritto nella parte introduttiva, si è visto che un possibile direzionamento attivo al SNC può essere ottenuto funzionalizzando la superficie dei sistemi colloidali con tensioattivi idrofili come il PS₈₀, capace di interagire con l’endotelio cerebrale [Kreuter *et al.*, 1997].

3.1 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀

Allo scopo di sintetizzare un nuovo derivato anfifilico, il PHEA-EDA-Sq-PS₈₀, potenzialmente in grado di aggregarsi in mezzo acquoso per formare sistemi micellari, il PHEA è stato, inizialmente, parzialmente funzionalizzato con l’EDA, ottenendo il PHEA-EDA [Licciardi *et al.*; 2006], con un DD_{EDA} di $30,0 \pm 0,5$ mol%. Questa reazione di

funzionalizzazione permette di inserire in catena laterale al PHEA dei gruppi amminici disponibili per un'ulteriore derivatizzazione.

Il PHEA-EDA è stato infatti, successivamente, funzionalizzato con il derivato squalenoilico SqCHO, al fine di introdurre un'opportuna quantità di porzioni idrofobiche al copolimero idrofilo PHEA-EDA. Tale reazione è stata eseguita in miscela organica in presenza di un componente acido al fine di catalizzare la reazione tra il derivato aldeidico dello squalene e il gruppo amminico della catena polimerica e, pertanto, la formazione del legame imminico. Il grado di derivatizzazione in SqCHO(DD_{Sq}) è stato determinato in accordo con quanto riportato in letteratura [Ognibene *et al.*; 2011]. In particolare, è stato calcolato comparando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 1,40-1,61 e 1,94-2,35, attribuibili rispettivamente ai CH₃ e ai CH₂ allilici dello squalene e i segnali a δ 2,79 e 4,55 assegnati ai protoni del backbone del PHEA; ed è risultato essere pari a $3,0 \pm 0,5$ mol%.

Infine, il copolimero PHEA-EDA-Sq è stato funzionalizzato con PS₈₀, utilizzando BNPC per attivare i gruppi idrossilici del PS₈₀. Questo tensioattivo è stato scelto per la sua ben nota abilità, attribuita a nanoparticelle ricoperte in superficie con polisorbato, di trasportare il farmaco caricato attraverso la BEE [Kreuter, 2001; Schroeder *et al.*; 1998].

Il copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ opportunamente purificato è stato caratterizzato attraverso analisi spettroscopica ¹H-NMR, la quale ha confermato l'introduzione di catene di PS₈₀ sul backbone polimerico di PHEA, e ha permesso di calcolare il grado di derivatizzazione in PS₈₀ (DD_{PS80}). Il grado di derivatizzazione in PS₈₀ (DD_{PS80}) è stato calcolato comparando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 1,24 e 3,50 attribuibili rispettivamente ai CH₂-CH₂- e CH₂-CH₂-O- del PS₈₀, e i segnali a δ 2,79 assegnati ai protoni del backbone del PHEA; ed è risultato essere pari a $1,2 \pm 0,03$ mol% rispetto alle unità ripetitive di PHEA. Come esempio, la struttura chimica del PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ è mostrata in figura 16.

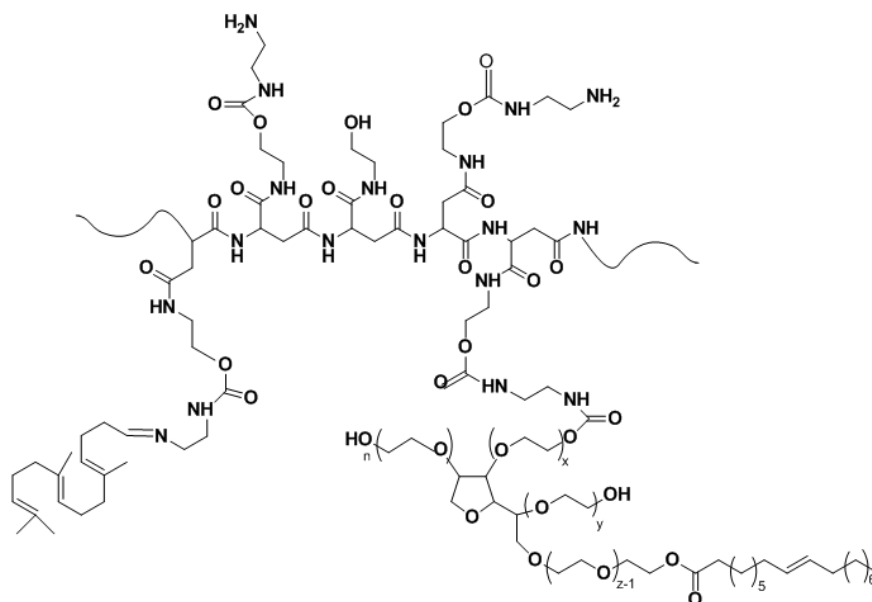


Figura16. Struttura chimica del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ ($x+y+z+n=20$).

3.2 Preparazione e caratterizzazione delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ contenenti Rivastigmia

Data la sua peculiare natura anfifilica, il copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ a contatto con un mezzo acquoso è in grado di formare micelle. Esse, dunque, avranno un “*core*” costituito dalle catene idrofobiche dei derivati squalenici e catene di polietilenglicole del PS₈₀-aspartamide sulla superficie esterna, a contatto con il mezzo acquoso, formanti lo “*shell*” idrofilo.

La formazione delle micelle è stata studiata mediante spettroscopia a fluorescenza utilizzando il pirene come sonda fluorescente idrofobica. Il pirene, trasferendosi dalla soluzione acquosa al nucleo interno idrofobico meno polare delle micelle, cambia le sue proprietà fotofisiche, infatti il rapporto di intensità I_1/I_3 del pirene cambia da ≈ 1.8 in acqua a ≈ 0.6 in solventi non polari come l'esano [Chen *et al.*; 1999].

In figura 17 sono riportate due curve, attribuibili ai rapporti I_{338}/I_{332} e I_1/I_2 , ottenute rispettivamente dallo spettro di eccitazione e di emissione del pirene, registrati a 25°C, contro il logaritmo della concentrazione del copolimero.

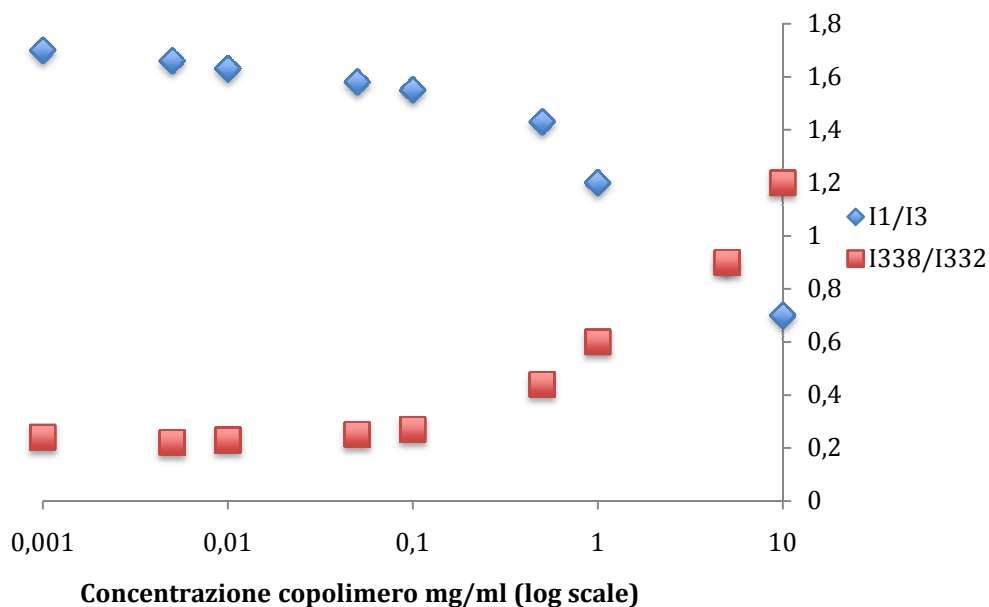


Figura 17. Grafico del rapporto tra le intensità dei picchi I_{338}/I_{332} e I_1/I_3 , calcolate rispettivamente dallo spettro di eccitazione e di emissione del pirene, in funzione della concentrazione del copolimero.

Il valore della concentrazione critica di aggregazione (CAC) delle micelle è stato determinato dall'intersezione della tangente alla curva nel punto di flesso con la tangente orizzontale che interpola la parte piana inferiore della curva, ed è risultato essere pari a $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$.

Un ulteriore approccio utilizzato per studiare la formazione delle micelle è stata l'analisi 2D ^1H NMR Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY). Tale tecnica permette di identificare le interazioni e le relative correlazioni spaziali tra i protoni delle porzioni del copolimero implicati nella formazione delle micelle [Licciardi M.

et al.; 2010]. In figura 18 è riportato il contour plot relativo all'analisi NOESY delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀.

Dallo spettro 2D si possono distinguere diversi *cross-peaks* relativi alle interazioni intermolecolari e intramolecolari. In particolare, è possibile evidenziare i *cross-peaks* (a) tra i protoni metilici (0,9 ppm) e il metilenici (1,2-1,5 ppm) dello Sq, attribuibili a interazioni sia di tipo intramolecolari che di tipo intermolecolari tra le porzioni della catena squalenoilica, implicate nella formazione del core micellare. Inoltre, particolarmente importanti sono i *cross-peaks* tra i protoni delle catene di polietilenglicole del PS₈₀ a 3.6 ppm e i protoni metilenici dello Sq a 1,2-1,5 ppm (b), probabilmente, attribuibili all'instaurarsi di interazioni intermolecolari tra le porzioni squalenoiliche, formanti il core micellare, e le porzioni di PS₈₀ in catena laterale del copolimero. Ciò implica che il processo di self-assembly del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀, responsabile della formazione di micelle polimeriche, riduce fortemente lo spessore interfacciale tra il core idrofobico, presumibilmente formato dalle porzioni squalenoiliche idrofobiche, e il backbone polimerico. Infine, come ci si aspettava, sono presenti i *cross-peaks* attribuibili a interazioni di tipo intramolecolari tra i due differenti protoni del PHEA (2,8 e 4,6 ppm) (c).

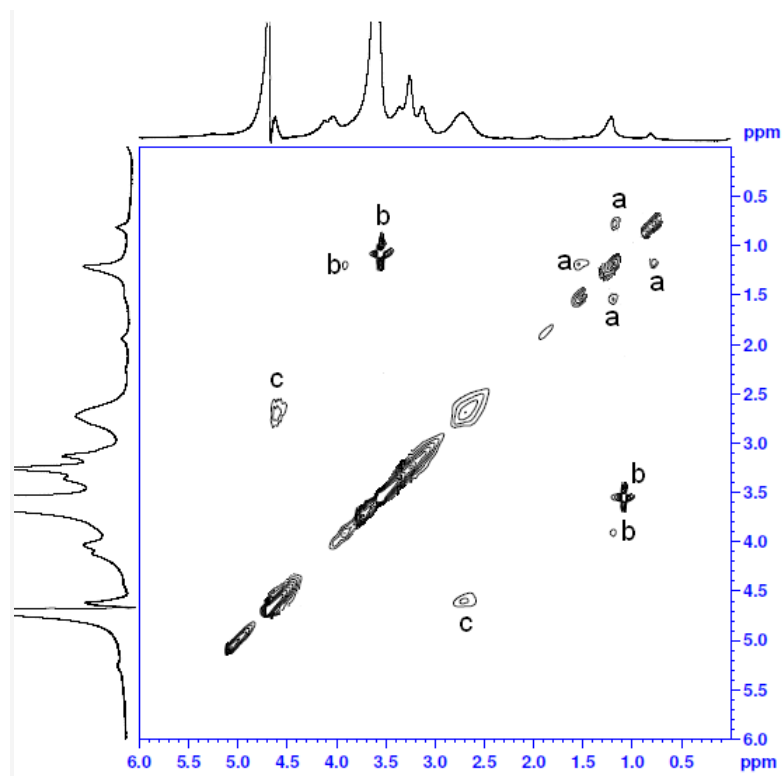


Figure 18. Contour plot dello spettro 2 D ^1H NMR NOESY delle micelle polimeriche di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ registrato ad un valore di with mixing time di 350 ms.

In accordo con la tecnica del NOESY, i *cross-peaks* intermolecolari osservati nello spettro del PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ (figura 18) indicano che la distanza tra i protoni associati ad ogni *cross-peaks* è inferiore a 5 Å. Ciò significa che i protoni associati ad ogni *cross-peaks* sono sufficientemente vicini da giustificare la formazione di cluster molecolari, quali le micelle polimeriche.

Infine, per confermare la formazione di nanostrutture colloidali in mezzo acquoso, sono state eseguite misure di Dynamic Light Scattering (DLS) sulle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀, andandone a

valutare le dimensioni medie, il PDI e il potenziale zeta. Come riportato in tabella 2, il diametro medio delle micelle PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ è risultato inferiore a 30 nm, con una stretta distribuzione dimensionale dimostrata dai bassi valori del PDI.

Inoltre, al fine di valutare la capacità delle micelle polimeriche di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ di solubilizzare molecole con bassa solubilità in acqua, la rivastigmina base libera è stata scelta come farmaco modello attivo a livello del SNC. La rivastigmina, utilizzata per il trattamento dell'Alzheimer, essendo scarsamente solubile in acqua, viene somministrata come rivastigmina idrogeno tartarato. Essa, dopo somministrazione orale, viene rapidamente e completamente assorbita, ma la sua biodisponibilità è molto bassa ($\approx 36\%$), con un elevato effetto di primo passaggio epatico [Williams *et al.*, 2003]

Il farmaco è stato caricato all'interno nelle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ secondo il metodo riportato nella parte sperimentale. Brevemente, quantità note di copolimero e farmaco sono state miscelate, ottenendo una miscela solida, e solubilizzate in DMF, solvente in cui sia il copolimero che il farmaco sono solubili. La miscela è stata seccata a pressione ridotta al fine di ottenere un residuo solido. La progressiva aggiunta di aliquote di acqua porta al self-assembling del copolimero in aggregati micellari, e successivamente all'incorporazione delle

molecole di farmaco all'interno del core idrofobico. La dispersione è stata mantenuta tutta la notte sotto agitazione e l'eccesso di farmaco è stato rimosso dal sistema attraverso filtrazione, utilizzando filtri in cellulosa di 0,45 μm . La procedura di incorporazione del farmaco ha permesso di ottenere un buon grado di incapsulazione; infatti, la quantità di farmaco incorporato all'interno delle micelle polimeriche, determinata attraverso analisi HPLC, è risultata essere pari al $20 \pm 0,3\%$ (p/p) rispetto alla quantità di copolimero iniziale.

In tabella 2 è possibile notare come le micelle cariche di farmaco presentano un diametro leggermente maggiore rispetto alle micelle vuote, ciò è probabilmente dovuto alla presenza di molecole di farmaco all'interno del core micellare. Tuttavia, in entrambi i casi le particelle hanno dimensioni abbastanza piccole, tali da poter essere utilizzate per tutte le vie di somministrazione, inclusa la via parenterale. Inoltre, le dimensioni nanometriche sono una caratteristica positiva per tali sistemi, in quanto permettono il prolungamento della loro permanenza nel torrente circolatorio, sfuggendo al processo di fagocitosi da parte degli organi del RES, e l'accumulo in organi o tessuti irrorati da vasi che presentano endoteli con ampie fenestrature, come per esempio a livello dei tumori solidi (effetto EPR).

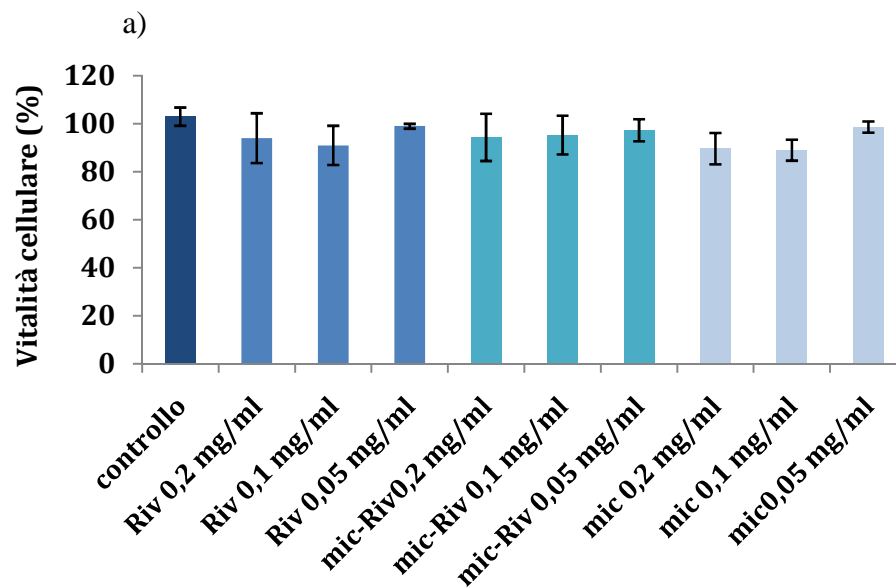
Tabella 2. Diametro medio, indice di polidispersità (PDI) e potenziale zeta delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀.

Campione	Diametro medio (nm)	PDI	Potenziale ζ (mV \pm S.D.)
Micelle vuote	28,7	0,26	-18,2 \pm 6,35
Micelle cariche di rivastigmine	34,05	0,35	-18,1 \pm 5,5

3.3 Saggi biologici in vitro

Al fine di valutare la citotossicità delle micelle polimeriche di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀, sia vuote che cariche di farmaco, sono stati condotti studi di citotossicità in vitro mediante il saggio MTS su cellule di neuroblastoma murino, linea cellulare ampiamente utilizzata per testare eventuali proprietà neurotossiche di nuovi composti. Le cellule sono state incubate con dispersioni acquose di micelle polimeriche vuote e cariche di farmaco a tre differenti concentrazioni, pari a 1, 0,5 e 0,25 mg ml⁻¹, per 6, 24 e 48 ore. Le cellule incubate con il farmaco libero a concentrazione pari a 0,2, 0,1 e 0,05 mg ml⁻¹ (concentrazioni pari alla quantità di farmaco incorporato all'interno delle micelle) sono state utilizzate come controllo positivo. I risultati sperimentali, espressi in termini di vitalità cellulare %, sono riportati in figura 19, e dimostrano l'assenza di effetti citotossici sia delle micelle di PHEA-

EDA-Sq-PS₈₀ che delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ cariche di farmaco; infatti, la vitalità cellulare si mantiene sempre superiore all'85%.



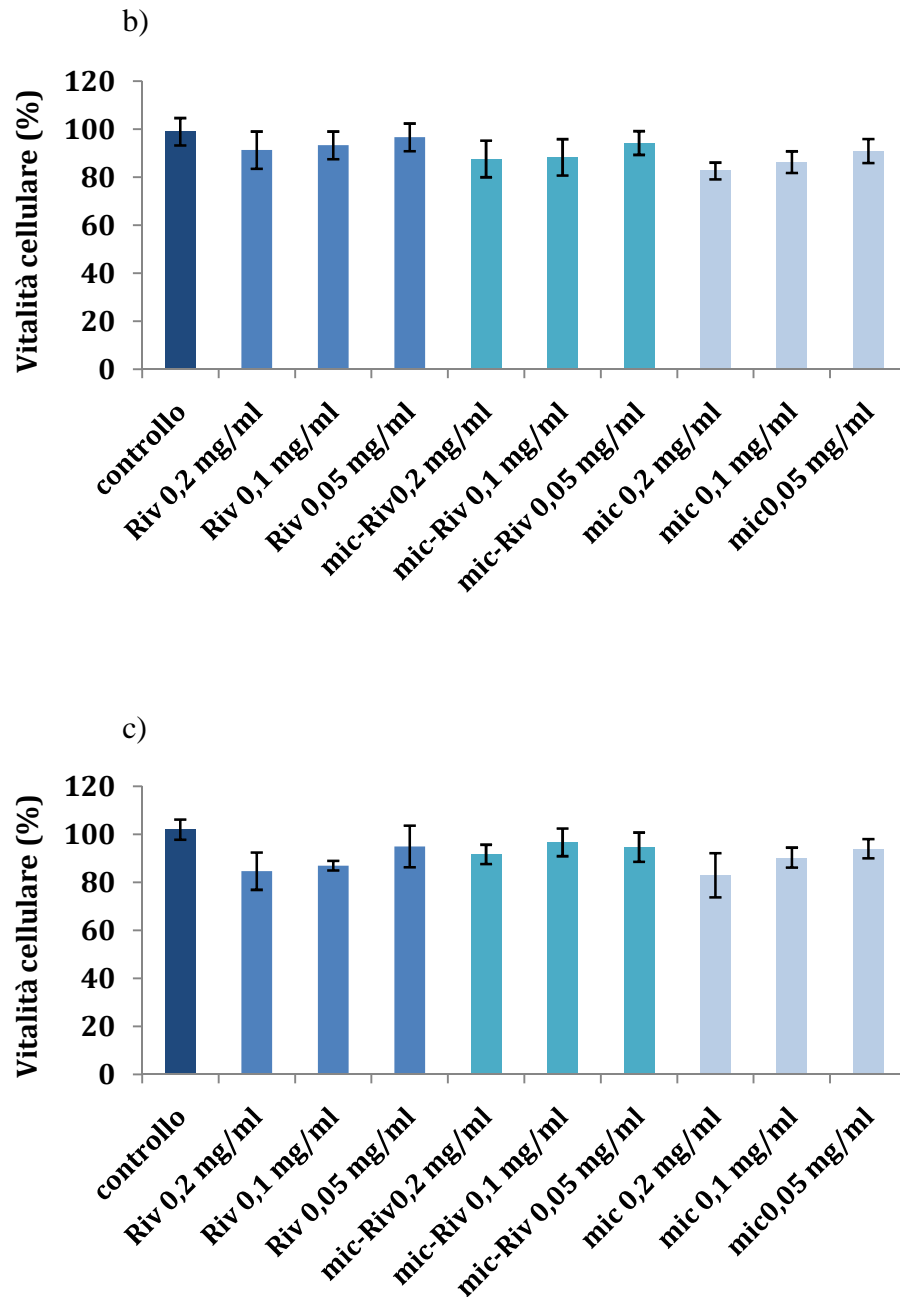


Figura 19. Vitalità cellulare delle cellule Neuro2a dopo 6 ore (a), 24 ore (b) e 48 ore (c) di incubazione in presenza di rivastigmina libera (Riv), di micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ (mic) e di micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ cariche di rivastigmina (mic-Riv).

Poiché i sistemi testati non hanno mostrato nessun effetto citotossico, si è deciso di valutare la capacità di tali sistemi micellari ad attraversare le membrane neuronali; pertanto sono stati condotti studi di uptake in vitro sulla linea cellulare Neuro2a. A tal proposito, le cellule Neuro2a sono state incubate per 6 ore con le micelle polimeriche cariche di rivastigmina, alle stesse concentrazioni di farmaco utilizzata per gli esperimenti di citotossicità. In figura 20 è riportato il grafico in termini di ng di rivastigmina per cellula (libera o caricata all'interno delle micelle), in funzione della concentrazione di farmaco.

La quantità di rivastigmina internalizzata dalle cellule è stata valutata mediante analisi HPLC; in particolare, come è possibile vedere dal grafico, la quantità di farmaco presente nel lisato cellulare ottenuto dopo incubazione con le micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ cariche di farmaco è maggiore (circa il doppio) rispetto alla quantità di farmaco trovato nel lisato cellulare ottenuto dopo incubazione con il farmaco libero; inoltre, come ci si aspettava, l'uptake del farmaco è direttamente proporzionale alla concentrazione delle micelle nel mezzo d'incubazione. Tale dato suggerisce che le micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ facilitano l'uptake delle rivastigmina da parte delle cellule neuronali, rispetto alla rivastigmina libera. Probabilmente ciò è

da attribuire alla presenza del PS₈₀ sulla superficie delle micelle polimeriche, infatti come descritto nella parte introduttiva è ben nota capacità di trasportare carriers attraverso le membrane delle cellule neuronali. Sfortunatamente, non è stato possibile paragonare la formulazione con micelle prive del rivestimento di PS₈₀ (PHEA-EDA-Sq), in quanto il copolimero PHEA-EDA-Sq non ha la capacità di auto-aggregarsi per dar luogo a strutture di tipo micellare.

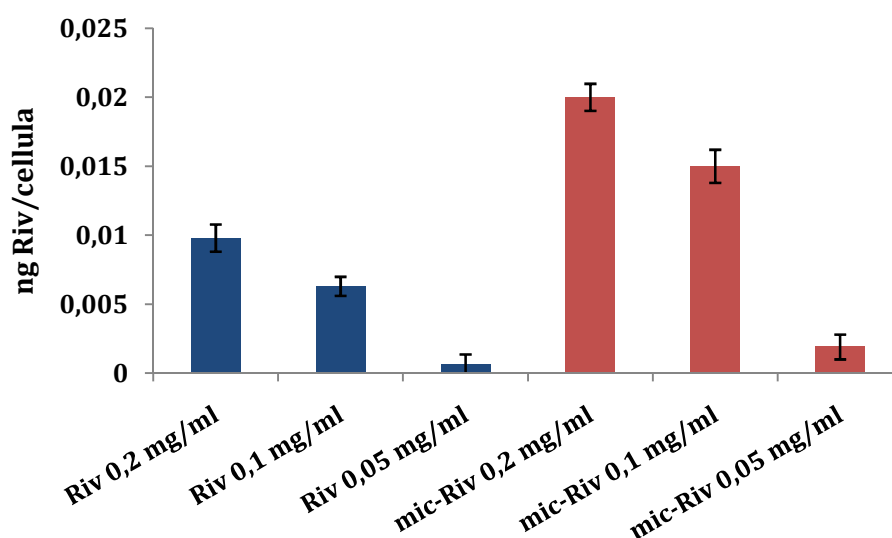


Figura 20. Uptake della rivastigmina libera (Riv) e della rivastigmina caricata all'interno delle micelle polimeriche di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ (mic-Riv) dopo 6 ore di incubazione con le Neuro2a.

Inoltre, al fine di valutare la stabilità della rivastigmina in condizioni mimanti l'ambiente fisiologico, sono stati condotti studi di stabilità in plasma umano. Dopo incubazione dei sistemi in plasma umano, la

stabilità del farmaco è stata valutata mediante analisi HPLC, analizzando la quantità di farmaco intatto o la presenza di suoi metaboliti. I risultati sperimentali espressi in termini di % di rivastigmina rispetto al tempo d'incubazione sono riportati in figura 21 e mostrano che la concentrazione plasmatica di rivastigmina diminuisce quando incubata in forma libera; infatti circa l'80% (p/p) di rivastigmina è stata degradata dopo 48 ore di incubazione. Mentre, la rivastigmina rimane intatta, per tutto il tempo di incubazione, quando è caricata all'interno delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀.

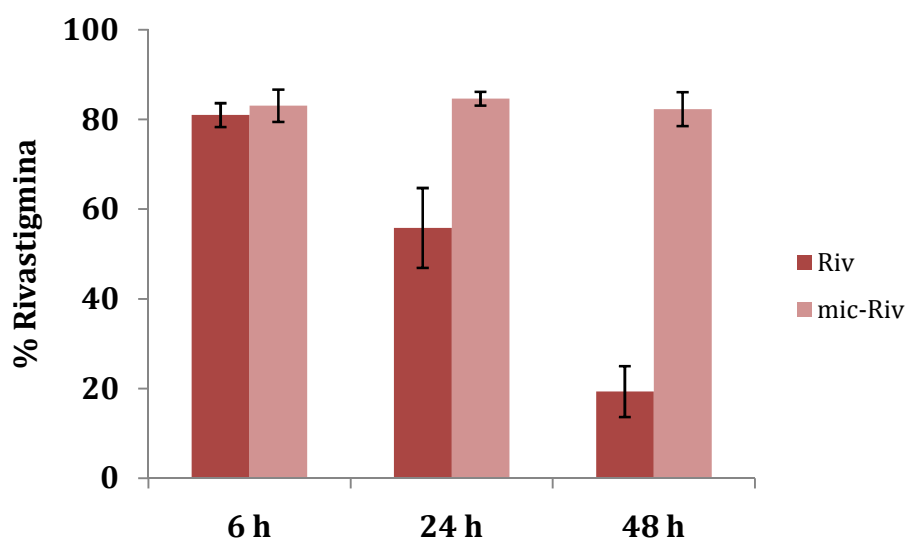


Figura 21. Profilo di stabilità della rivastigmina caricata all'interno delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀, dopo 6, 24 e 48 ore incubazione in plasma umano, rispetto alla rivastigmina libera.

Tale risultato suggerisce che i nuovi sistemi micellari sono in grado di rallentare la degradazione del farmaco ed evitare che il farmaco caricato, presumibilmente localizzato all'interno del core idrofobico micellare, possa legarsi alle proteine plasmatiche.

4. CONCLUSIONI

Negli ultimi anni la ricerca farmaceutica, grazie ai recenti sviluppi tecnologici, ha mostrato notevoli interessi verso l'utilizzo di materiali polimerici come *carrier* di farmaci, in grado di migliorare la biodisponibilità. Tra tali *carrier*, le micelle polimeriche presentano grandi potenzialità e risultano essere dei sistemi in grado di ottenere un potenziale direccionamento al SNC. Per tale ragione oggetto di tale lavoro è stata la sintesi e la caratterizzazione di materiali polimerici biocompatibili, potenzialmente utilizzabili come substrati di partenza per la preparazione di sistemi colloidali per il *drug delivery*.

In particolare, in questo lavoro, è stato sintetizzato, con successo, un nuovo copolimero anfifilico a partire dall' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA), legando al backbone polimerico sia catene di polisorbato che catene squalenoiliche, al fine di ottenere un nuovo copolimero chiamato PHEA-EDA-Sq-PS₈₀. La capacità di auto-aggregarsi spontaneamente, in mezzo acquosi, è stata studiata attraverso l'analisi 2D ¹H NMR NOESY. Tale tecnica ha dimostrato che, in mezzo acquoso, il copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ è in grado di auto-assemblarsi in strutture di tipo micellare, e che al fine di formare il core micellare è necessario che si vengano ad instaurare interazioni di tipo idrofobico tra le catene alchiliche della porzione

squalenoilica. Studi di spettroscopia a fluorescenza, utilizzando il pirene come sonda fluorescente idrofobica, hanno permesso di calcolare il valore di CAC delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀.

I sistemi micellari ottenuti, caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico in termini di dimensioni medie, PDI e potenziale zeta, mostrano dimensioni medie nell'ordine di poche decine di nanometri, una stretta distribuzione dimensionale e carica superficiale negativa.

Le micelle hanno mostrato una buona capacità ad incorporare farmaci idrofobici, in particolar modo la rivastigmina base libera; ed il sistema ottenuto è in grado di mantenere stabile il farmaco incorporato dopo incubazione con plasma umano. Infine, le micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ vuote e cariche di farmaco sono state caratterizzate anche dal punto di vista biologico mediante test di citotossicità e studi di uptake; nelle condizioni sperimentali scelte, i dati ottenuti evidenziano l'assenza di effetti citotossici ed inoltre, le micelle cariche di farmaco vengono internalizzate da cellule neuronali, con un uptake del farmaco dipendente dalla concentrazione micellare.

Alla luce di tutte queste osservazioni, i risultati ottenuti in questo lavoro di ricerca incoraggiano l'impiego delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ come possibili "*Colloidal Drug Delivery Systems*" per il direccionamento di farmaci al Sistema Nervoso Centrale.

5. NANOPARTICELLE SUPERPARAMAGNETICHE PER IL DIREZIONAMENTO DI FARMACI ANTITUMORALI

Una delle maggiori sfide nella moderna terapia è la progettazione di più efficaci *Drug Delivery System (DDS)*. Negli ultimi anni, sempre di più l'interesse è stato rivolto verso lo studio di nanosistemi superparamagnetici potenzialmente sfruttabili per il *Magnetic Drug Delivery System*. Pertanto, allo scopo di realizzare dei sistemi superparamagnetici in grado di veicolare un farmaco antitumorale, verso un organo bersaglio, in presenza di un campo magnetico esterno, sono state preparate e caratterizzate nanoparticelle magnetiche, costituite da una matrice polimerica biocompatibile, contenente un certo numero di domini superparamagnetici di ossido di ferro di 10 nm, potenzialmente sfruttabili per il magnetic targeting e il drug delivery. A tale scopo tali nanoparticelle sono state caricate con la Flutamide, un farmaco antitumorale la cui azione consiste nell'inibire e prevenire il legame tra il testosterone e i recettori che si trovano sulla superficie delle cellule tumorali.

5.1 Preparazione e caratterizzazione delle SPIONs rivestite di PHEA-IB-p(BMA)

Il PHEA-IB-p(BMA) è un copolimero con caratteristiche strutturali e idrofobiche tali da renderlo idoneo per la preparazione di DDS. Alcune di queste caratteristiche, come per esempio la capacità in ambiente acquoso di auto-assemblarsi in strutture microfibrillari, sono state già studiate [*Cavallaro et al.*, 2009].

In realtà, molte caratteristiche di questo copolimero dipendono dalla sua struttura chimica e dalla sua idrofobicità; pertanto anche minime variazioni di queste caratteristiche, potrebbero modificare la capacità di auto-assemblaggio; per esempio, un aumento di idrofobicità, potrebbe portare preferenzialmente alla formazione di aggregati nanoparticellari in un mezzo acquoso.

A tal proposito le condizioni sperimentali adottate in questo lavoro, per la sintesi del copolimero PHEA-IB-p(BMA), sono state modificate al fine di ottenere un significativo incremento di idrofobicità del copolimero graft finale PHEA-IB-p(BMA) e quindi per ottenere un copolimero insolubile in acqua [*Licciardi et al.*, 2012].

Infatti, un numero medio di sette monomeri di BMA per ogni catena di poli(BMA), sembra essere sufficiente per rendere il PHEA-IB-p(BMA) facilmente solubile in solventi non polari, come il

cloroformio. Ciò rende possibile la formazione di aggregati nanoparticellari in mezzi acquosi.

Le condizioni di reazione utilizzate per la sintesi del copolimero PHEA-IB-p(BMA) sono riportati in tabella 3.

Tabella 3: $DD_{\text{BIB}}\%{}^a = (\text{residui BIB legati/ unità ripetitive PHEA}) \times 100$ (mol/mol).

Il grado di derivatizzazione (DD) dei copolimeri PHEA-BIB ottenuti, è stato determinato attraverso analisi $^1\text{H-NMR}$ in $\text{DMSO-}d_6$, paragonando l'integrale del picco corrispondente ai protoni a 1,88 ppm, assegnato ai gruppi metilici appartenenti al BIB legato, con l'integrale del picco relativo ai protoni a 2,7 ppm, assegnato al CH_2 , appartenente al PHEA.

n^b = numero medio di monomeri per ogni catena di p(BMA).

Temperatura di reazione [°C]	Tempo di reazione (h)	DD BIB [mol%] ^a	n^b	Mw [kDa] ^c
50	20	30	7	380

La struttura chimica del PHEA-IB-p(BMA) è riportata in figura 22.

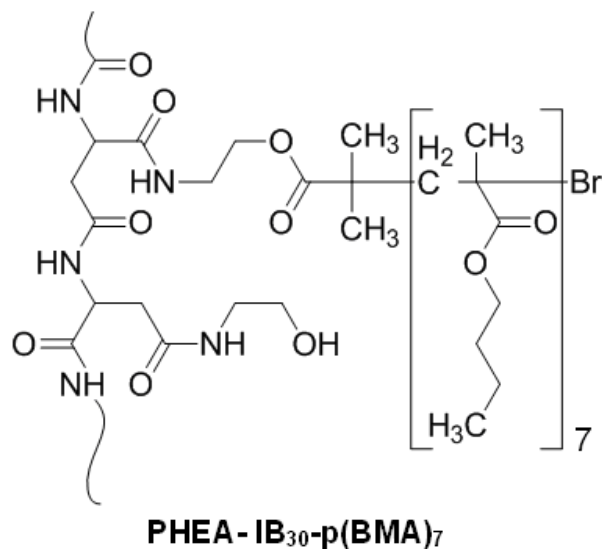


Figura 22. Struttura chimica del copolimero graft PHEA-IB-p(BMA).

Il copolimero sintetizzato è stato utilizzato per la preparazione di tre differenti nanoparticelle: nanoparticelle magnetiche (MNPs), nanoparticelle magnetiche caricate con flutamide (FLU-MNPs) e nanoparticelle caricate con flutamide (FLU-NPs).

La preparazione delle nanoparticelle è stata eseguita emulsionando una fase organica costituita dal copolimero graft PHEA-IB-p(BMA), dalle nanoparticelle di Fe₃O₄ e/o dalla flutamide, dispersi in cloroformio, attraverso l'omogeneizzazione in una fase acquosa contenente polivinilpirrolidone (PVP) come stabilizzante e Pluronic F68 come tensioattivo. L'evaporazione del solvente, sotto pressione ridotta, determina la formazione delle nanoparticelle, le cui

dimensioni dipendono dalle dimensioni dell'emulsione primaria o/w ottenuta.

Le immagini TEM delle nanoparticelle liofilizzate sono mostrate in figura 23. Nessuna differenza significativa è stata osservata nella forma e nelle dimensioni tra i campioni di nanoparticelle MNPs (a) e FLU-MNPs (b). La maggior parte delle nanoparticelle, osservate in questi due campioni, mostrano una forma sferica e un diametro medio di 300 nm. Invece le nanoparticelle di FLU-NPs (c) mostrano mediamente una forma sferica e valori di dimensioni compresi tra 250 e 300 nm.

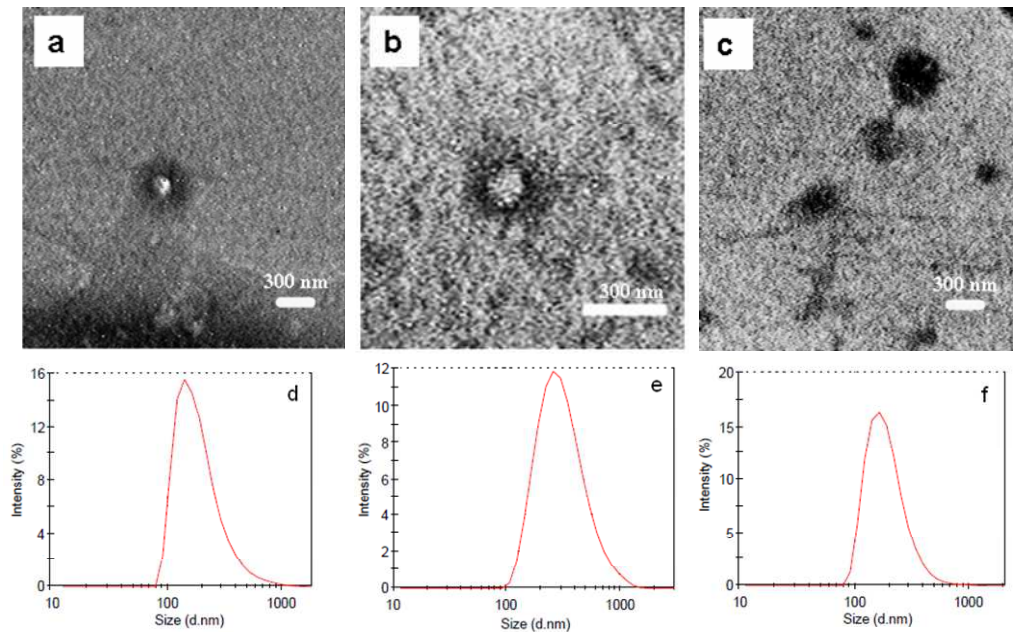


Figura 23. Immagini TEM (a, b, c) e caratterizzazione DLS (d, e, f): delle MNPs (a, d), FLU-MNPs (b, e) e FLU-NPs (c, f).

Le misure di Dynamic Light Scattering (DLS), ottenute disperdendo le nanoparticelle in acqua, mostrano valori di dimensioni del diametro idrodinamiche in accordo con le dimensioni osservate attraverso l'analisi TEM, in particolare, il diametro idrodinamico medio è risultato essere pari a 290 nm (PDI 0,21) per le MNPs, 320 nm (PDI 0,32) per le FLU-MNPs e 300 nm (PDI 0,35) per le FLU-NPs. Tutte le dispersioni acquose di nanoparticelle hanno un potenziale zeta negativo, ed in particolare con valori compresi tra -15,8 mV per le MNPs e -8,5 mV per FLU-MNPs e FLU-NPs (tabella 4).

La diminuzione dei valori del potenziale zeta negli ultimi casi potrebbe essere dovuto alla presenza di molecole di flutamide parzialmente esposte sulla superficie delle nanoparticelle, che determinano uno schermaggio della superficie carica.

Tabella 4: Valori di diametro medio, PDI e potenziale zeta delle MNPs, FLU-MNPs e FLU-NPs.

Campione	Diametro medio (nm)	PDI	Potenziale Zeta (mV)
MNPs	290	0,21	-15,8 ± 4,7
FLU-MNPs	320	0,32	- 8,5 ± 2,8
FLU-NPs	300	0,38	- 8,6 ± 3,3

Allo scopo di verificare l'avvenuto rivestimento delle nanoparticelle superparamagnetiche di Fe_3O_4 con il copolimero PHEA-IB-p(BMA), è stato effettuato un'analisi FT-IR; in particolare, sono stati confrontati gli spetti FT-IR della magnetite del copolimero e delle MNPs. Gli spettri sono riportati in figura 24.

Lo spettro FT-IR del campione solido di MNPs mostra un'ampia banda caratteristica dello stretching Fe-O a 579 cm^{-1} , che è assente nello spettro del copolimero PHEA-IB-p(BMA).

Questo dato evidenzia la presenza di magnetite nel campione di nanoparticelle MNPs. Inoltre, confrontando lo spettro FT-IR delle nanoparticelle di ossido di ferro (magnetite) con quello del polimero di rivestimento, sono anche chiaramente visibili le bande vibrazionali attribuibili agli stretching C=O (1651 e 1727 cm^{-1}) del polimero. Tutto ciò è coerente con l'esistenza di domini di magnetite rivestiti da matrice polimerica.

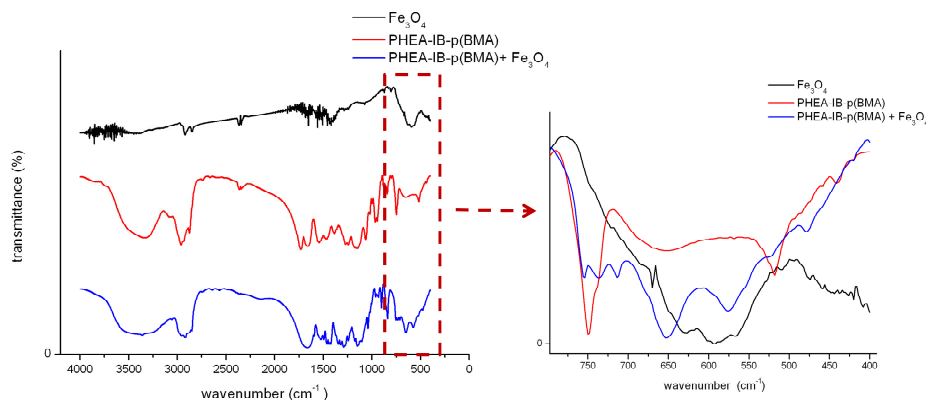


Figura 24. Spettro FT-IR della magnetite, MNPs, copolimero PHEA-IB-p(BMA) e ingrandimento della banda vibrazionale compresa tra 800 e 400 cm^{-1} .

5.2 Determinazione del contenuto di magnetite e valutazione del comportamento magnetico delle MNPs rivestite con PHEA-IB-p(BMA)

Il numero dei domini magnetici (10 nm), incorporati all'interno della matrice polimerica di PHEA-IB-p(BMA) delle MNPs e delle FLU-MNPs, è stato calcolato indirettamente attraverso la determinazione della quantità totale di ossido di ferro per unità di massa di nanoparticelle. A tal proposito, le nanoparticelle sono state disperse in una soluzione di HCl e riscaldate a 60°C per 2 ore, al fine di disaggregare le nanoparticelle e solubilizzare gli ioni ferro. In seguito, gli ioni ferrosi presenti nella soluzione sono stati ossidati a ioni ferrici con perossido d'idrogeno; la soluzione ottenuta è stata trattata con il sale di tiocianato per formare il complesso ferro-tiocianato di colore rosso porpora. La concentrazione del complesso e, dunque, il

contenuto di ferro nelle nanoparticelle è stato determinato attraverso analisi spettrofotometrica. Il contenuto di ossido di ferro nelle nanoparticelle è risultato essere pari a 1,5 % p/p nelle MNPs e 3,4 % p/p nelle FLU-MNPs. È stato calcolato che un grammo di MNPs contiene $3,37 \cdot 10^{15}$ domini magnetici di ossido di ferro e pertanto ogni nanoparticella polimerica contiene circa 30 domini magnetici. Questi dati sono stati ulteriormente confermati dalle misure di magnetizzazione.

Il comportamento magnetico delle MNPs è già evidenziato dall'effetto macroscopico di un campo magnetico esterno applicato ad una dispersione acquosa di MNPs. Nella figura 25 (a) e (b) si possono osservare le fotografie della dispersione di MNPs e la dislocazione delle nanoparticelle dopo applicazione di un magnete esterno. Come si può notare, inizialmente le MNPs sono disperse in maniera omogenea, mentre tendono a concentrarsi in prossimità del magnete nel momento in cui la dispersione di MNPs viene posta per tutta la notte sotto l'applicazione di un campo magnetico esterno. Questo risultato dimostra che le MNPs preparate contengono domini nanometrici di Fe_3O_4 .

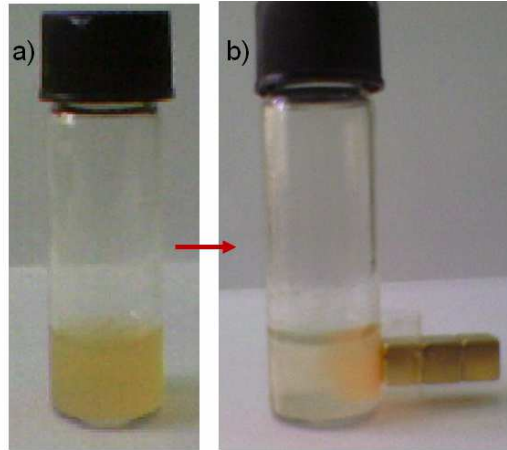


Figura 25. Fotografie della dispersione acquosa di MNPs prima (a) e dopo l'applicazione di un campo magnetico esterno per tutta la notte (b).

5.3 Misure magnetiche

Le proprietà magnetiche delle MNPs e delle FLU-MNPs sono state studiate in funzione del campo magnetico a 300 e a 5 K. Le misure sono state eseguite sia sulle dispersioni acquose di nanoparticelle che sui campioni liofilizzati, e non è stata osservata nessuna differenza significativa. Ciò ha suggerito che le proprietà magnetiche delle nanoparticelle non sono influenzate dall'ambiente e dalle interazioni fisiche con le molecole di farmaco. Le curve M contro H a temperatura ambiente (figura 26a) delle MNPs e delle FLU-MNPs sono perfettamente sovrapponibili e non mostrano coercitività, confermando che le nanoparticelle hanno un comportamento superparamagnetico. Il valore di magnetizzazione di saturazione (M_s),

dato dalla legge empirica $M = M_s + \frac{a}{H} + \frac{b}{H^2}$, è risultato essere 0,9 Am²/kg [Gittlemann et al. 1974].

Il valore di M_s ottenuto, è più basso di quello osservato per la magnetite in bulk (~60 Am²/kg; figura 26c) [Schieber, 1967]: questa riduzione è comunemente osservata nelle nanoparticelle magnetiche ed è attribuita alla presenza di uno strato di spin disordinato sulla superficie [Millan et al., 2007], dovuto ad un aumento del rapporto superficie/volume. Le curve M contro H registrate a bassa temperatura (5 K), riportate in figura 26b, mostrano un ciclo di isteresi con un basso campo coercitivo $\mu_0 H_C = 7$ mT, mentre il valore di M_s è pari a 1,1 Am²/kg.

La magnetizzazione residua, $M_R = \frac{M_{0T}}{M_{5T}}$, calcolata come rapporto tra il valore di magnetizzazione a 0 e 5 T, è risultata essere pari a 0,23. Questo valore è leggermente più basso del valore 0,5 attribuito a nanoparticelle uniassiali, dove gli assi sono orientati isotropicamente, confermando la presenza di nanoparticelle molto piccole che si rilassano più velocemente delle altre. Questa osservazione è congrua con la presenza di un film polimerico tra i domini di magnetite, che aumenta la distanza media tra le nanoparticelle, con una conseguente riduzione significativa delle interazioni dipolari. Questa ipotesi è

anche in accordo con la riduzione della temperatura di bloccaggio osservata negli esperimenti a *zero field cooling* (ZFC) e a *field cooling* (FC).

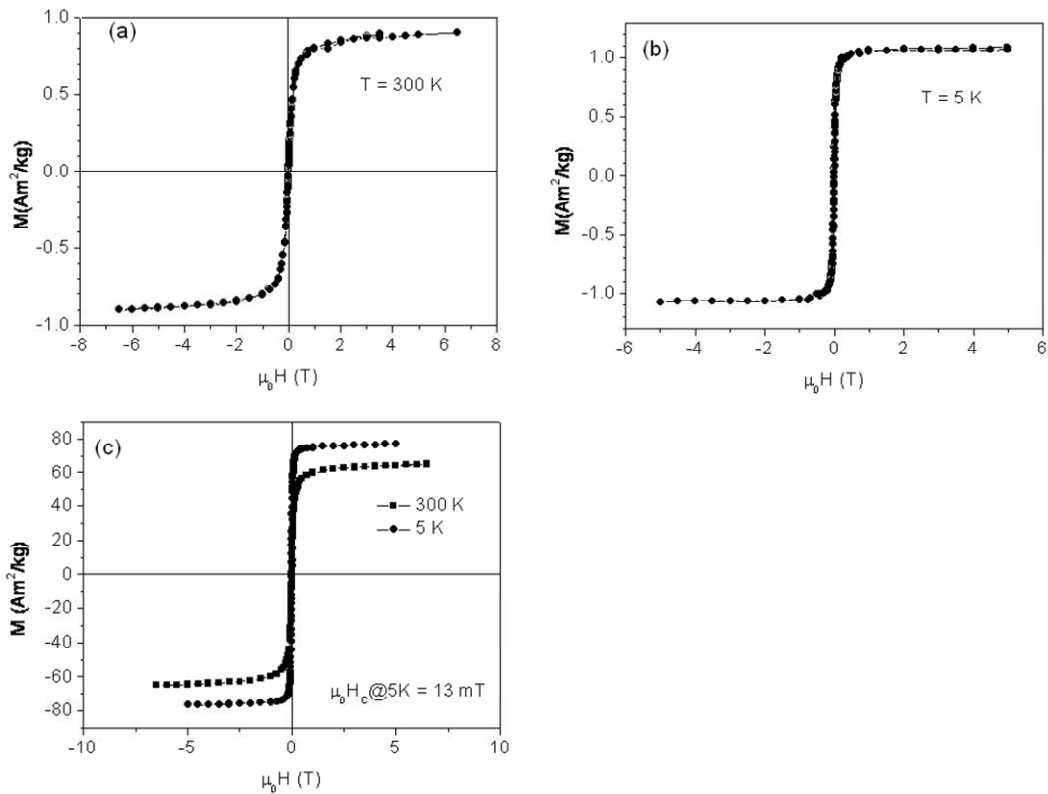


Figura 26. Curve di magnetizzazione delle MNPs a 300 K (a) e 5 K (b), e della magnetite in bulk (c).

Anche nel caso delle curve di magnetizzazione a ZFC e a FC, non è stata evidenziata nessuna differenza tra i modelli di MNPs e FLU-MNPs.

Le curve di magnetizzazione (M) in funzione della temperatura (T) delle MNPs e dei campioni di magnetite, in dispersione acquosa, a

ZFC e a FC, sono riportate, rispettivamente, in figura 27a e 27b. La curva delle MNPs a ZFC (figura 27a) è stata acquisita fino a 250 K per evitare la fusione del solvente. Il campione mostra il tipico comportamento di irreversibilità termica, caratteristico di un insieme di nanoparticelle a singoli domini che interagiscono debolmente; ciò può essere descritta dal modello di Néel [Néel, 1949], dove il tempo di rilassamento del momento magnetico delle nanoparticelle, τ , è dato da $\tau = \tau_0 \cdot e^{KV/k_B T}$, dove K è la costante di anisotropia, V è il volume della particella, τ_0 è il tempo di prova e k_B è la costante di Boltzmann. La temperatura alla quale il tempo di misura è uguale a al tempo di rilassamento, τ , è definita temperatura di bloccaggio (T_B); tale temperatura, supponendo che τ sia costante, risulterà direttamente proporzionale alla barriera di anisotropia KV e corrisponderà alla temperatura alla quale la maggior parte delle nanoparticelle si rilassano. Nei sistemi reali, T_B è comunemente identificata con la temperatura corrispondente al massimo della curva ZFC, mentre la differenza tra T_B e la temperatura alla quale ZFC e FC collassano dà una stima della distribuzione della barriera energetica. La T_B media della magnetite (figura 27b) è risultata essere pari a 50 K, tale risultato è in accordo con la presenza di nanoparticelle superparamagnetiche di

maghemite/magnetite, con una dimensione media di 10-20 nm [Zhang *et al.*, 2006]. Al contrario, le MNPs mostrano un T_B di 15 K che è coerente con la dimensione media delle nanoparticelle ben al di sopra di 20 nm e quindi in accordo con la presenza del rivestimento polimerico.

Tuttavia, un T_B di 15 K è ben al di sotto della temperatura ambiente, indicando che il campione è sempre in regime superparamagnetico alla temperatura fisiologica, come richiesto per le applicazioni in vivo.

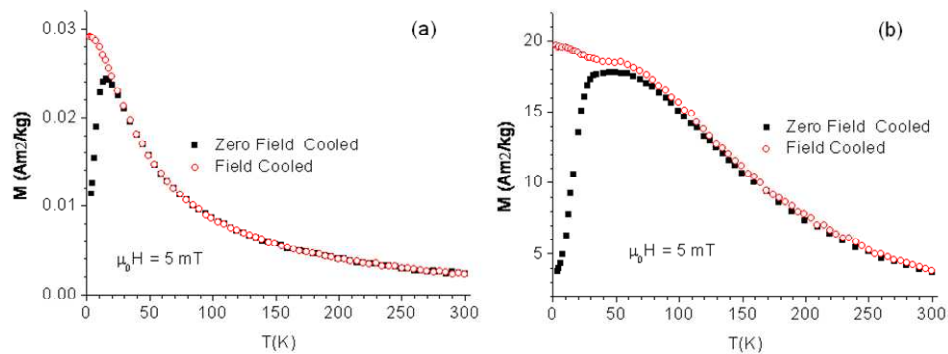


Figura 27. Curve relative alla dispersione di MNPs (a) e della magnetite (b) a Zero-field cooled (ZFC) e field-cooled (FC).

5.4. Valutazione biologica in vitro di nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-IB-p(BMA)

L'effetto antiproliferativo delle nanoparticelle magnetiche preparate è stato studiato attraverso il saggio MTS, su cellule di adenocarcinoma prostatico umane (LNCaP). Inoltre, è stato anche valutato su questa linea cellulare l'effetto del diidrotestosterone (DHT), agente proliferativo per le cellule del cancro alla prostata [*Horoszewicz et al.*, 1983]. In questo caso le LNCaP sono state incubate per 72 ore con il DHT (a due concentrazioni: 10^{-8} e 10^{-7} M) e con una quantità di FLU-MNPs corrispondente ad una concentrazione di farmaco caricato di 34 μ M (a-a') e 100 μ M (b-b'); la FLU libera è stata utilizzata come controllo positivo alla concentrazione di 10 μ M (c-c'), che corrisponde alla sua massima solubilità in acqua.

In figura 28 sono mostrati i risultati in termini di vitalità cellulare (%) in funzione della concentrazione dei campioni.

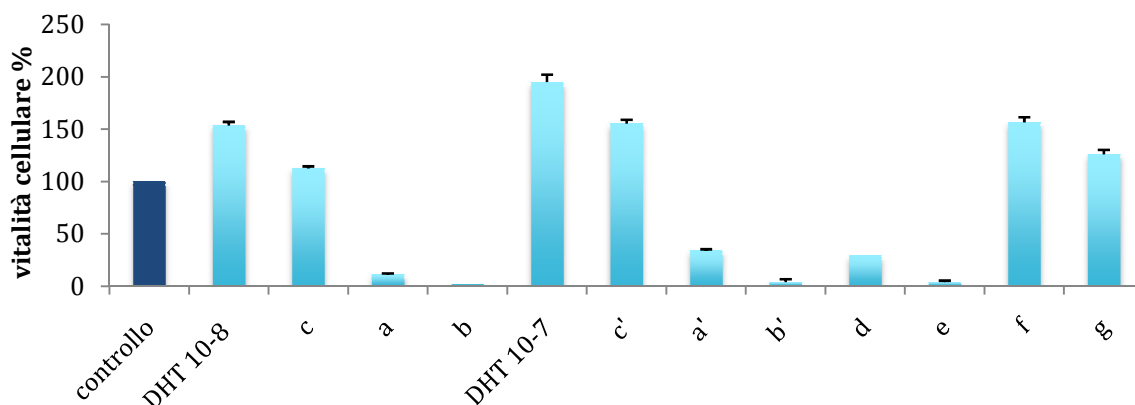


Figura 28. Vitalità cellulare delle LNCaP dopo 72 ore di incubazione con: DHT 10⁻⁸ e 10⁻⁷ M; FLU-MNPs 34 µM (a) e 100 µM (b) in presenza del DHT 10⁻⁸; FLU-MNPs 34 µM (a') e 100 µM (b') in presenza del DHT 10⁻⁷ M; FLU libera in presenza del DHT 10⁻⁸ (c) e 10⁻⁷ (c'); FLU-MNPs corrispondenti alla concentrazione di farmaco pari a 34 µM (d) e 100 µM (e); MNPs alla concentrazione corrispondente a d (9,4 µg/ml) (f) ed e (27,6 µg/ml) (g) in assenza di DHT.

La proliferazione cellulare è stata determinata mediante saggio colorimetrico MTS ed i valori di deviazione standard (\pm SD) sono stati calcolati sulla base di tre esperimenti condotti in multipli di sei.

Come previsto, l'incubazione delle LNCaP con DHT ha determinato un significativo incremento della vitalità cellulare, che dipende dalla concentrazione di DHT (DHT 10⁻⁸ e DHT 10⁻⁷ M); invece questo effetto diminuisce (~ 20% di inibizione) quando le cellule sono trattate con la FLU, alla concentrazione di 10 µM (c-c'), confermando l'azione anti-androgena della FLU. Al contrario, le FLU-MNPs,

contenenti una quantità di farmaco pari a 34 μM (a-a'), hanno mostrato una drastica inibizione (~ 80% di inibizione) dell'effetto proliferativo del DHT e quasi un'inibizione completa della vitalità cellulare, quando incubate ad una concentrazione corrispondente a 100 μM di FLU (b-b'). In questi due casi bisogna considerare che la concentrazione finale della FLU è circa tre volte (34 μM) e dieci volte (100 μM) superiore a quella utilizzata su cellule trattate con FLU da sola (10 μM), e che l'effetto antiproliferativo maggiore deve essere attribuito alla più elevata concentrazione finale di farmaco. Tuttavia, l'effetto antiproliferativo delle FLU-MNPs si ha anche in assenza di DHT (d-e).

In realtà, i dati ottenuti suggeriscono che la FLU caricata all'interno delle nanoparticelle non perde la sua attività farmacologica; piuttosto, le FLU-MNPs sembrano essere in grado di aumentare l'attività del farmaco incrementando l'uptake all'interno delle cellule. Tali risultati suggeriscono l'ipotesi che il copolimero PHEA-IB-p(BMA), utilizzato per la preparazione delle nanoparticelle, sia in grado di interagire con le membrane cellulari e promuovere l'uptake del farmaco caricato, in seguito all'endocitosi delle nanoparticelle e successiva diffusione del farmaco. Inoltre, a causa dell'idrofobicità del copolimero PHEA-IB-p(BMA), si potrebbe supporre che l'aumentato uptake del farmaco

potrebbe essere, anche, attribuito all'adesione delle nanoparticelle sulla membrana cellulare. Tale effetto è stato già dimostrato in un precedente studio su microparticelle di PHEA-IB-p(BMA) [Cavallaro *et al.*, 2009].

Affinché la FLU possa esplicare la propria azione farmacologica, è necessario che le nanoparticelle veicolino il farmaco all'interno delle cellule, in quanto il farmaco antitumorale FLU agisce nel citoplasma cellulare [Kumar and Tindall, 1998]. Pertanto, al fine di valutare l'uptake cellulare della FLU e di Fe₃O₄ caricati nelle nanoparticelle magnetiche, la linea cellulare di LNCaP sono state incubate con FLU-MNPs per 4, 24 e 48 ore. In figura 29 sono mostrati tali risultati, in termini di ng di FLU (figura 29a) e Fe₃O₄ (figura 29b) per cellula, in funzione della concentrazione di FLU-MNPs. La quantità di FLU e Fe₃O₄ nei lisati cellulari, rilevata rispettivamente attraverso HPLC e analisi UV, è risultata essere dipendente dalla concentrazione delle nanoparticelle e dal tempo di incubazione. Tuttavia, non è stata osservata nessuna differenza significativa nei valori di uptake di FLU e Fe₃O₄ tra 24 e 48 ore. Sembra che la massima incorporazione cellulare sia stata raggiunta dopo un tempo di incubazione compreso tra 24 e 48 ore.

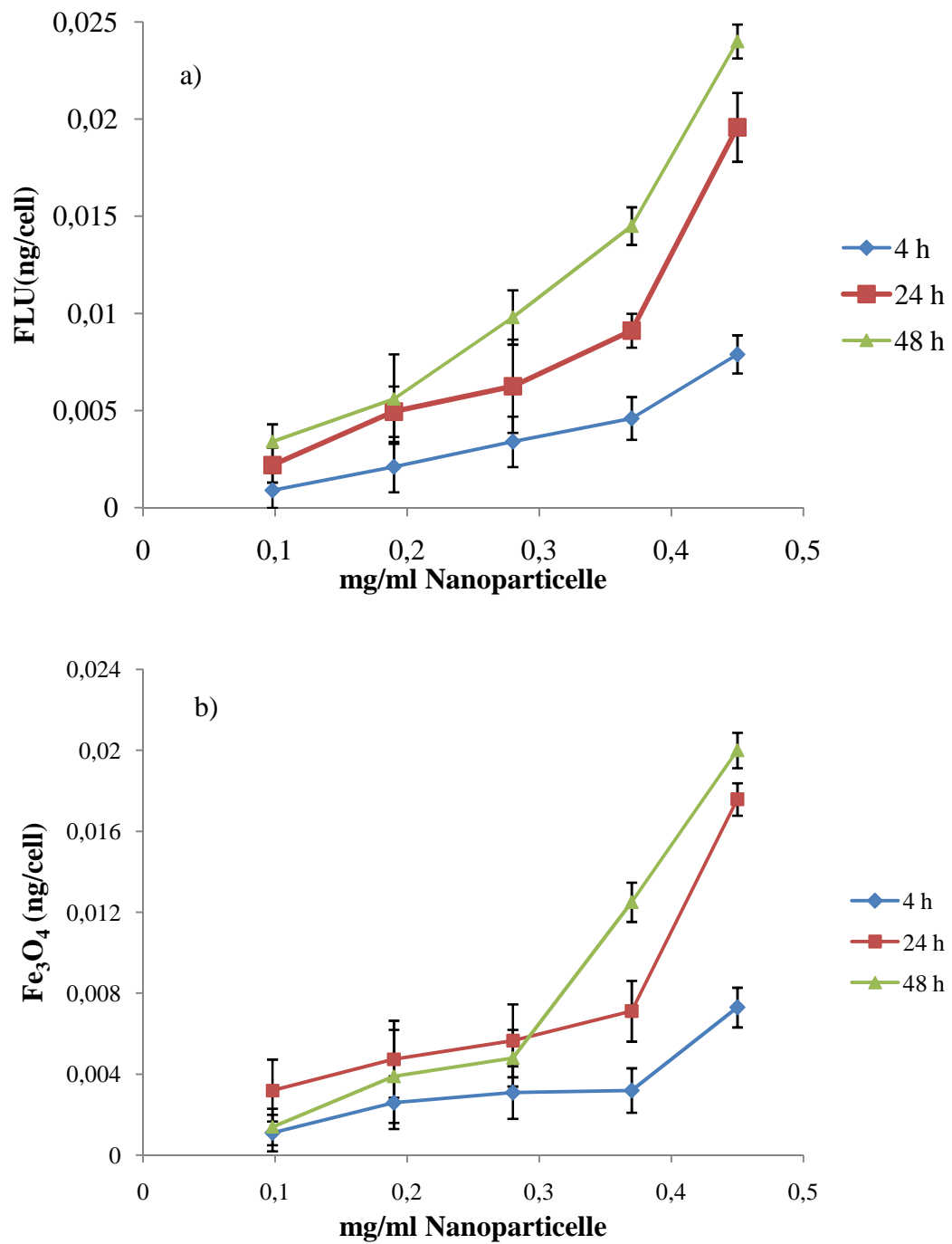


Figure 29. Uptake di FLU (a) e Fe₃O₄ (b) nella linea cellulare di LNCaP dopo 4, 24 e 48 ore di incubazione con FLU-MNPs. I valori di deviazione standard (±SD) sono stati calcolati sulla base di tre esperimenti condotti in multipli di sei.

Inoltre, al fine di valutare la capacità delle FLU-MNPs di rilasciare il farmaco caricato, sono stati condotti studi di rilascio in vitro, in condizioni mimanti l'ambiente fisiologico. In figura 30 viene mostrata la percentuale di FLU rilasciata dalle FLU-MNPs confrontata con la curva di dissoluzione della FLU libera nelle stesse condizioni sperimentali. Come è possibile osservare dal grafico, dopo un giorno di incubazione il 70% del farmaco caricato viene rilasciato; mentre, il profilo di rilascio cambia (la velocità di rilascio diventa costante e più lenta) nell'intervallo di tempo compreso tra 24 e 48 ore. Dopo 48 ore di incubazione le nanoparticelle rilasciano circa l'85% di farmaco caricato. Infine, confrontando il profilo di rilascio del farmaco dalle nanoparticelle con il profilo di dissoluzione della FLU libera si può dedurre che l'inclusione della FLU all'interno delle nanoparticelle influenza la velocità di rilascio.

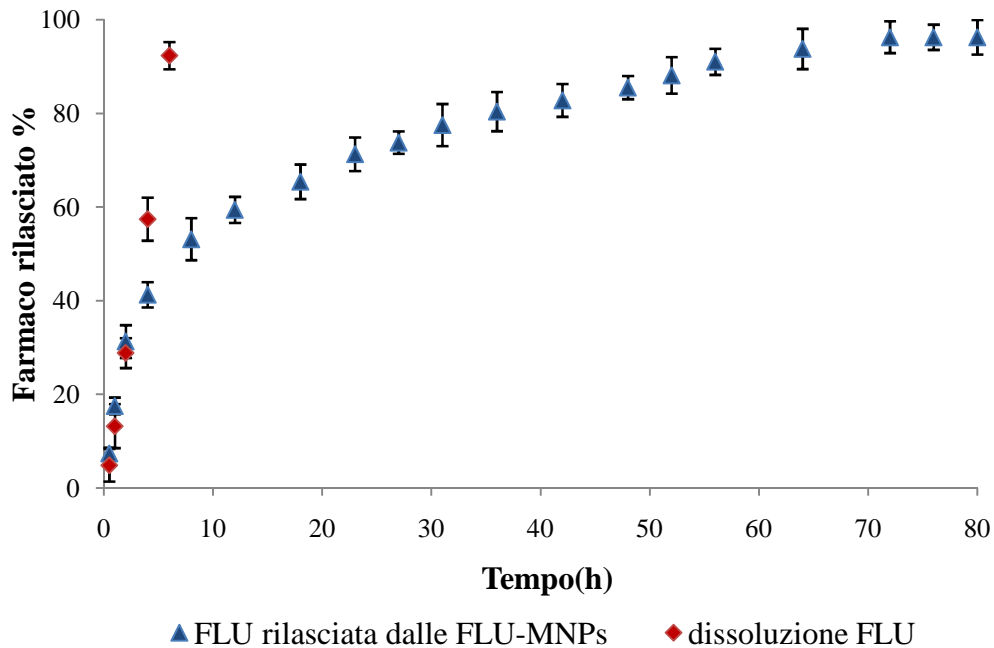


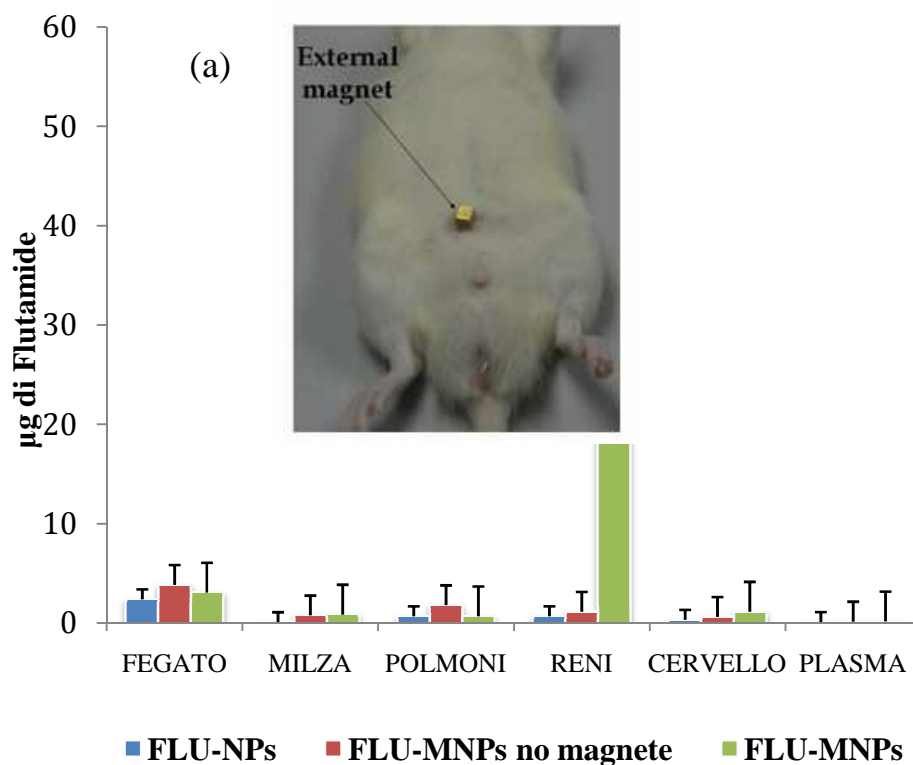
Figura 30. Percentuale di FLU rilasciata dalle FLU-MNPs in confronto con la curva di dissoluzione della FLU libera nelle stesse condizioni sperimentali (PBS pH 7.4, 37° C). I valori di deviazione standard (\pm SD) sono stati calcolati sulla base di tre esperimenti.

5.5 Studi in vivo

Al fine di valutare come l'applicazione di un campo magnetico esterno possa influire sulla biodistribuzione delle nanoparticelle, sono stati effettuati studi in vivo su ratti sottoposti ad un campo magnetico esterno; a tali animali, sono state somministrate sospensioni di nanoparticelle magnetiche (FLU-MNPs) e non magnetiche (FLU-NPs), come controllo negativo. Per escludere effetti sulla biodistribuzione non imputabili al campo magnetico esterno, le FLU-MNPs sono state, anche, somministrate ad un gruppo di animali controllo, senza

applicazione di un campo magnetico esterno (dati non riportati). Gli animali sono stati sacrificati dopo 24 e 48 ore dalla somministrazione dei sistemi, e dai principali organi espianati (fegato, milza, polmone, rene, cervello e plasma) sono state determinate le quantità di Fe_3O_4 , FLU e del suo metabolita FLU-OH. I dati di biodistribuzione raccolti 24 ore dopo la somministrazione sono mostrati nelle figure 31 (a) e (b) e 32. In generale, la biodistribuzione delle FLU-MNPs dopo 24 ore dalla somministrazione nei ratti sottoposti ad un campo magnetico esterno è risultata differente da quella trovata nei ratti trattati con FLU-NPs e nei ratti controllo (in assenza di un campo magnetico esterno). Infatti, un'elevata concentrazione di FLU è stata trovata in quegli organi, come il rene, fisiologicamente più vicini al magnete (foto interna della figura 31a), piuttosto che in altri organi. Pertanto, possiamo supporre che la presenza del magnete esterno abbia forzato le nanoparticelle magnetiche a rimanere in prossimità del sito di somministrazione e ritardarne la loro eliminazione dal corpo dell'animale (solo a 48 h dopo la somministrazione la quantità di FLU nei reni è risultata analoga a quella trovata negli altri organi). Diversamente, una biodistribuzione di farmaco non alterata è stata osservata negli animali a cui sono state somministrate FLU-NPs o le FLU-MNPs in assenza del magnete esterno.

D'altra parte, l'assenza di un'elevata quantità del metabolita FLU-OH nei reni dei ratti trattati con FLU-MNPs in presenza del campo magnetico (figura 31b) indica che il magnete ha impedito il passaggio delle nanoparticelle attraverso il fegato, dove la FLU è rapidamente metabolizzata a FLU-OH [Tevell *et al.*; 2006]. Questo dato conferma ulteriormente l'ipotesi che la presenza del magnete esterno ha trattenuto le nanoparticelle magnetiche somministrate in prossimità della zona di applicazione del magnete e di conseguenza ha ridotto la cattura di tali nanocarriers, da parte di fegato, milza e polmoni, organi responsabili della rimozione di nanoparticolati dalla circolazione.



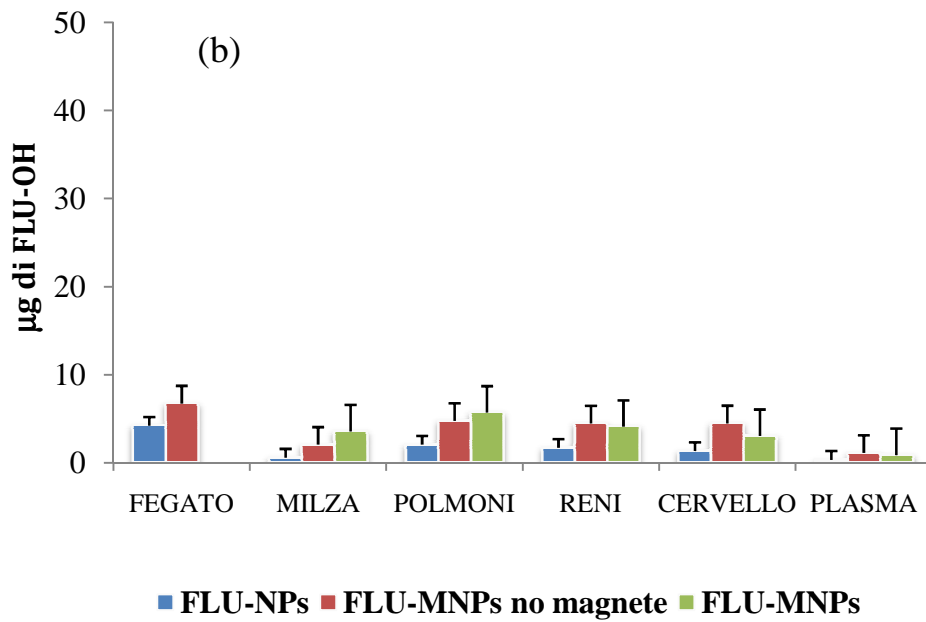


Figura 31. Biodistribuzione di FLU (a) e del suo metabolita FLU-OH (b), 24 ore dopo la somministrazione negli organi dei ratti soggetti a un campo magnetico esterno (FLU-NPs e FLU-MNPs) e nei ratti controllo (FLU-MNPs senza campo magnetico esterno). La foto interna (a) indica la posizione del magnete e il sito di somministrazione.

Come controprova, è stata anche determinata la quantità di magnetite (fig. 32), accumulata negli stessi organi, 24 ore dopo la somministrazione e i risultati sono riportati in figura 32. Come previsto, anche in questo caso è stata trovata una quantità elevata di magnetite nei reni, corrispondente alla presenza delle nanoparticelle magnetiche lì accumulate. Diversamente dalla FLU, la magnetite non viene rapidamente metabolizzata nel fegato, quindi è stato possibile determinare anche la quantità di nanoparticelle magnetiche accumulate in questo organo. Ma in questo caso, un accumulo

massiccio di nanoparticelle magnetiche è stato trovato solo in quei ratti non soggetti al campo magnetico esterno.

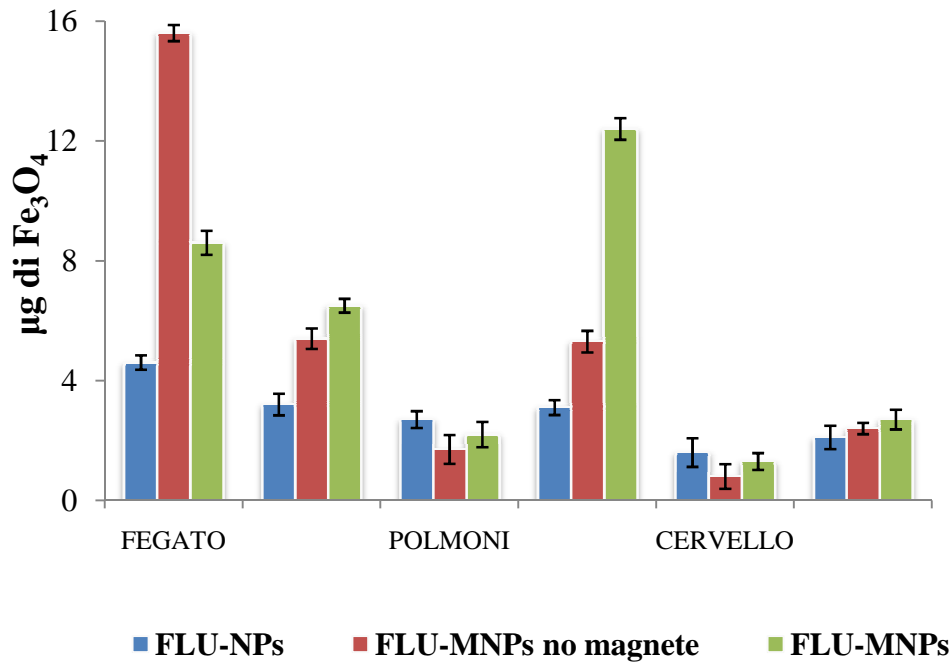


Figura 32. Biodistribuzione della magnetite (Fe_3O_4) 24 ore dopo la somministrazione negli organi dei ratti soggetti a un campo magnetico esterno (FLU-NPs e FLU-MNPs) e nei ratti controllo (FLU-MNPs senza campo magnetico esterno).

6. CONCLUSIONI

Attualmente, le nanoparticelle superparamagnetiche (SPIONs) occupano un ruolo importante nel campo del *drug delivery* per svariati motivi. Innanzitutto sono semplici da preparare ed il loro profilo tossicologico è molto buono; in secondo luogo permettono il targeting magnetico senza per questo escludere la possibilità di avere al contempo anche il targeting passivo o attivo. In più risultano applicabili sia per scopi diagnostici che terapeutici, soprattutto per la cura di tumori molto vicini alla superficie corporea, per i quali si può utilizzare il gradiente di campo magnetico.

Per tale ragione, nel presente lavoro sono state preparate, attraverso il metodo dell'omogeneizzazione ed evaporazione del solvente, nanoparticelle magnetiche rivestite con il copolimero graft PHEA-IB-p(BMA), contenenti un certo numero di domini superparamagnetici di ossido di ferro di 10 nm, al fine di ottenere sistemi potenzialmente utilizzabili per il "*Magnetic Targeting*" di farmaci antitumorali.

Le nanoparticelle magnetiche sono state preparate anche in presenza del farmaco antitumorale flutamide (FLU), ottenendo una drug loading pari al 20% p/p. Le nanoparticelle preparate (MNPs, FLU-MNPs e FLU-NPs) sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico attraverso DLS, TEM, misure magnetiche e studi di

rilascio del contenuto di FLU; queste hanno dimensioni media di circa 300 nm con una ristretta distribuzione granulometrica, hanno evidenziato un comportamento superparamagnetico e sono risultate in grado di rispondere ad un campo magnetico esterno, essendo attratte da quest'ultimo.

Studi in vitro su cellule di adenocarcinoma prostatico umane (LNCaP) hanno mostrato che le nanoparticelle magnetiche di PHEA-IB-p(BMA) non sono tossiche quando incubate sottoforma di nanoparticelle magnetiche vuote (MNPs), ma, quando caricate con FLU, sono citotossiche sulla linea cellulare testata. Ciò è stato attribuito al fatto che la modificazione superficiale polimerica delle nanoparticelle ha incrementato l'uptake cellulare.

Gli studi di biodistribuzione in vivo hanno dimostrato che l'applicazione di un campo magnetico esterno sulla regione addominale dei ratti ha drasticamente modificato la biodistribuzione delle FLU-MNPs. Le nanoparticelle, 24 ore dopo la somministrazione, si accumulano prevalentemente agli organi vascolarizzati in prossimità della calamita, cioè i reni. Al contrario, l'uptake da parte del sistema reticoloendoteliale del fegato, milza e polmone è risultato significativamente ridotto. Alla luce di tutte queste osservazioni, la combinazione del targeting magnetico con l'efficiente vettore

polimerico nanoparticellare ha consentito di realizzare un valido *Drug Delivery System* potenzialmente utilizzabile nella terapia antitumorale.

7. NANOPARTICELLE SUPERPARAMAGNETICHE PER IL “*DUAL TARGETING*” AL TUMORE

Al fine di ottenere sistemi potenzialmente sfruttabili nel trattamento dei tumori tramite l'ipertermia magnetica o come agenti di contrasto per la risonanza magnetica nucleare, sono state preparate e caratterizzate nanoparticelle superparamagnetiche, costituite da una matrice polimerica biocompatibile contenente domini superparamagnetici di ossido di ferro di 10 nm.

Le nanoparticelle superparamagnetiche ottenute presentano un core magnetico e un rivestimento (*shell*) polimerico che ne controlla la stabilità e l'interazione cellulare. Il core magnetico, costituito da particelle di ossido di ferro, è responsabile delle proprietà magnetiche ed è in grado di direzionare il sistema ad un sito specifico, attraverso l'azione di un campo magnetico esterno. Tale fenomeno è incrementato in modo sinergico dal direzionamento attivo dovuto alla presenza di acido folico sullo shell polimerico delle nanoparticelle.

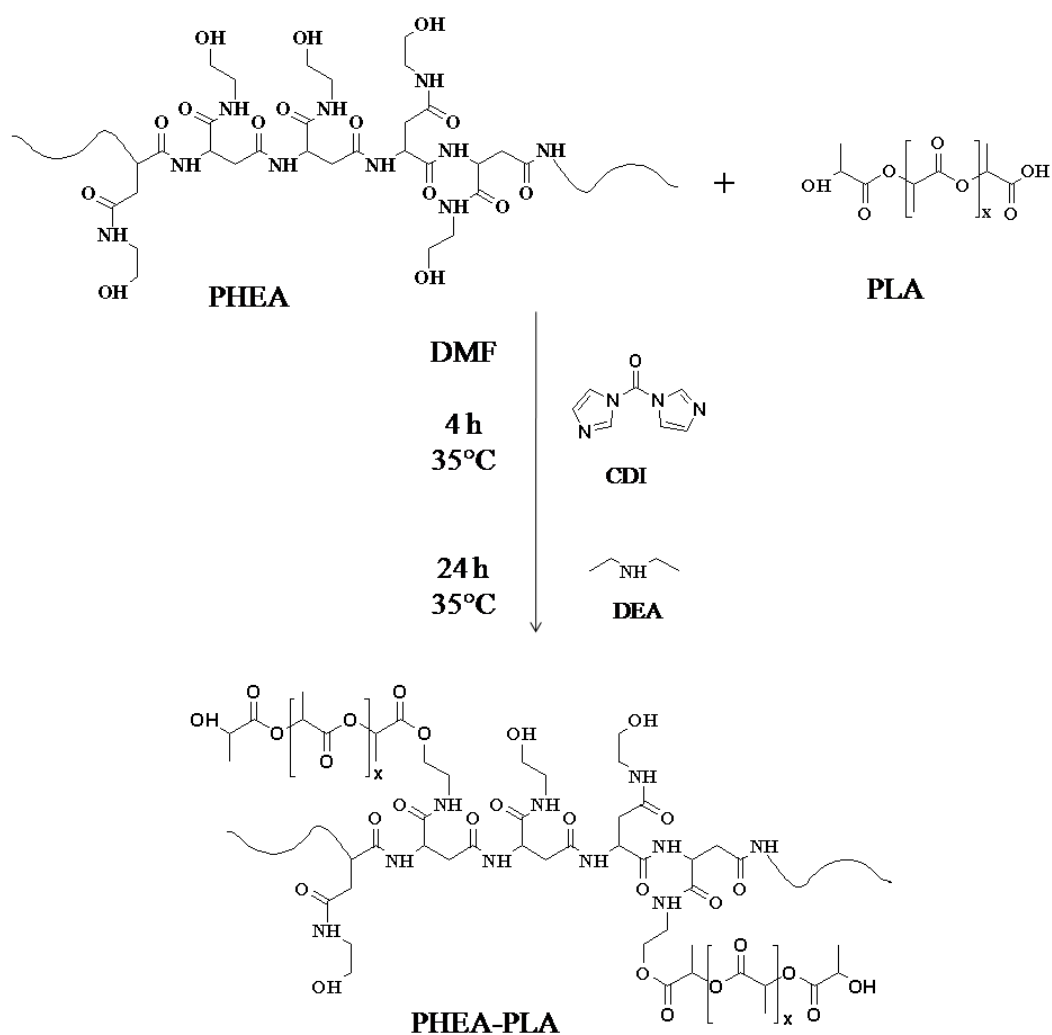
7.1 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG

Per il rivestimento delle nanoparticelle superparamagnetiche di Fe_3O_4 di 10 nm sono stati utilizzati due nuovi copolimeri anfifilici, il PHEA-PLA-PEG-FA e il PHEA-PLA-PEG.

Il PHEA-PLA-PEG è un copolimero-graft anfifilico a base di poliaspartammide, utile per la preparazione di nanocarriers auto-assemblati o come materiale di rivestimento di nanoparticelle colloidali. Esso è stato già sintetizzato, caratterizzato e utilizzato per la preparazione di nanoparticelle per il rilascio di farmaci [*Craparo et al.*, 2010].

I due copolimeri sono stati sintetizzati a partire dal PHEA, tramite due reazioni successive che comportano in primis la coniugazione di catene di PLA e, successivamente, l'attacco del PEG-NH₂ o del NH₂-PEG-FA, su porzioni della catena di PHEA-PLA.

Le catene di PLA sono state coniugate al *backbone* del PHEA utilizzando il CDI come agente attivante dei gruppi terminali carbossilici del PLA. Il PLA attivato dal carbonilimidazolo, può reagire facilmente con i gruppi idrossilici presenti in catena laterale del PHEA (Schema 1).



Schema 1. Rappresentazione schematica della sintesi del copolimero PHEA-PLA ($x = 111$).

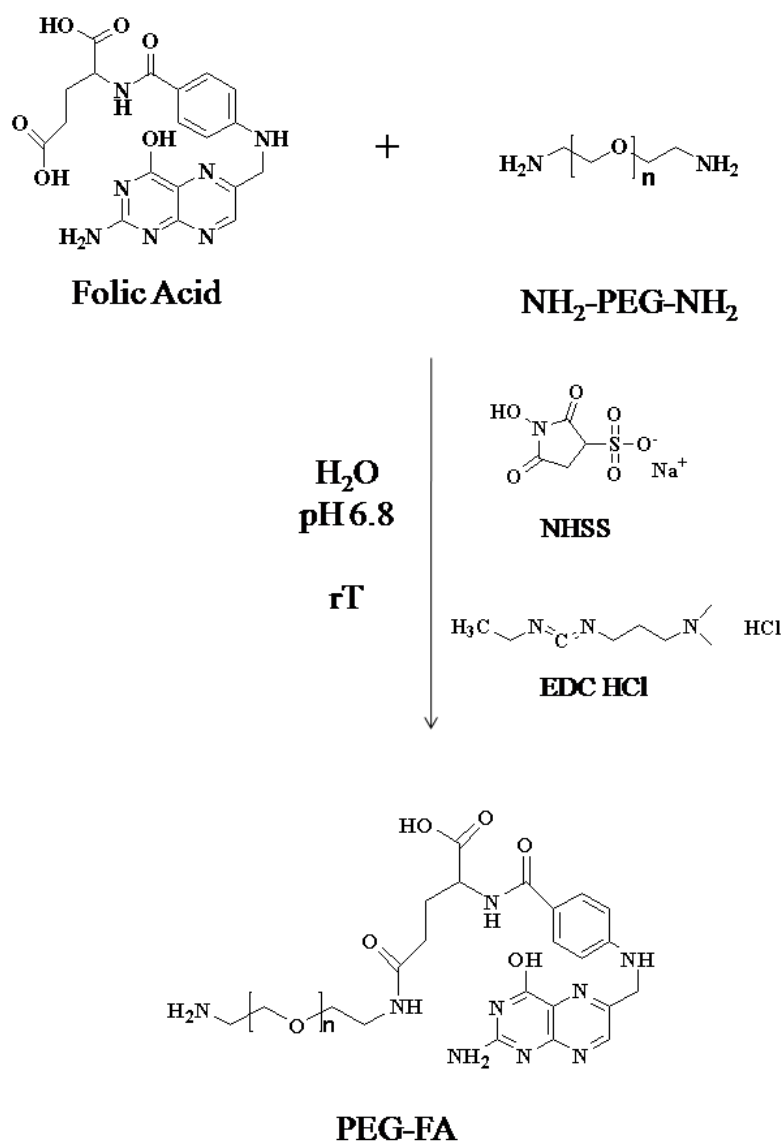
Il copolimero-graft PHEA-PLA è stato caratterizzato mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, che ha confermato l'introduzione delle catene di PLA sul PHEA e ha consentito il calcolo del grado di derivatizzazione molare (DD_{PLA}). Il DD, indicato come percentuale molare delle catene di PLA legate al PHEA rispetto alle unità ripetitive dello stesso PHEA, è stato calcolato paragonando l'integrale

dei picchi relativi ai protoni a δ 1,3-1,7 attribuibili a i protoni dei gruppi metilici appartenenti al PLA, con l' integrale del picco relativo ai protoni a δ 2,72 attribuibile ai protoni $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ appartenente al PHEA. La percentuale molare delle catene di PLA covalentemente legate al PHEA è risultata essere pari al 2,7% in moli rispetto alle unità ripetitive del PHEA.

Il copolimero-graft PHEA-PLA ottenuto, è stato poi usato come materiale di partenza per la coniugazione del $\text{NH}_2\text{-PEG-FA}$ o del PEG-NH_2 .

La reazione di coniugazione dell'acido folico (FA) al $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ ha richiesto una serie di tentativi sperimentali, al fine di ottimizzare la coniugazione dell'acido folico ad una sola estremità dell' $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$.

L'acido folico è stato coniugato al derivato amminico del PEG attivando il gruppo γ -carbossilico del FA con EDC/NHSS; lo schema di reazione è riportato in schema 2.



Schema 2. Rappresentazione schematica della sintesi del PEG-FA ($n = 44$).

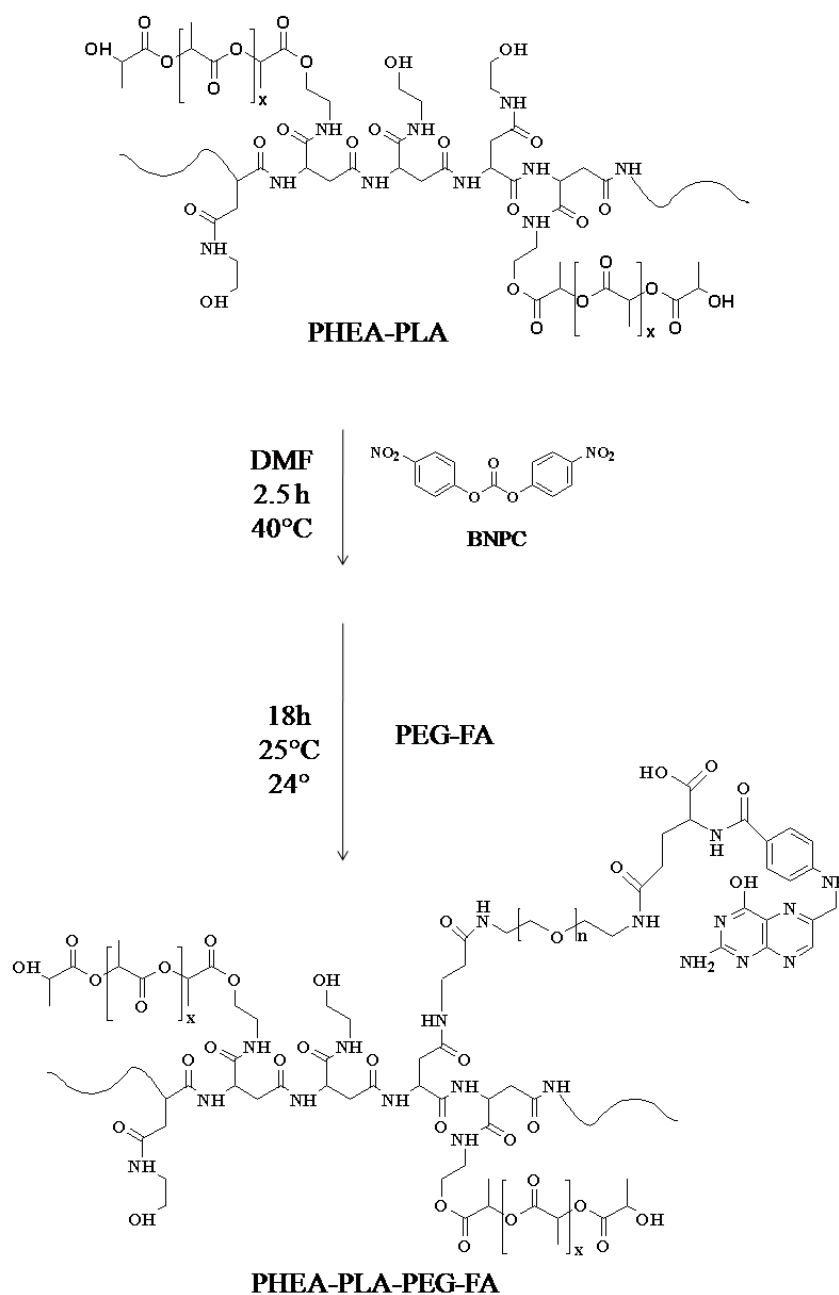
Diversi fattori giocano un ruolo cruciale in questa reazione: la concentrazione di $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ nella miscela di reazione e il suo eccesso molare rispetto al FA, i rapporti molari utilizzati tra gli agenti attivanti EDC, NHSS e FA ed infine, la procedura di doppia purificazione del prodotto finale (dialisi, in primo luogo, e

cromatografia di permeazione su gel, in secondo luogo), che ha permesso di ottenere il derivato mono-funzionalizzato NH₂-PEG-FA.

Inoltre, in diversi lavori è stato dimostrato che, seppure la reazione di attivazione può avvenire sia sul gruppo γ - che α - carbossilico, principalmente, circa per l'80%, l'attivazione si ha a livello del gruppo γ - carbossilico [Shukla *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 1996, Leamon *et al.*, 1999].

Le analisi spettroscopiche (¹H-NMR, FT-IR e UV) e le analisi SEC hanno confermato la struttura assegnata.

Successivamente, la coniugazione del derivato sintetizzato NH₂-PEG-FA o del PEG-NH₂ al PHEA-PLA è stata effettuata attraverso l'attivazione dei gruppi idrossilici del PHEA con il BNPC. Come esempio è riportata in schema 3 la sintesi del copolimero PHEA-PLA-PEG-FA.



Schema 3. Rappresentazione schematica della sintesi del copolimero PHEA-PLA-PEG-FA ($x = 111$; $n = 44$).

Un parametro molto importante nella reazione di attivazione dei gruppi idrossilici del PHEA con il BNPC, e di conseguenza per la

reazione di coniugazione con i gruppi amminici del PEG, è la durata della reazione di attivazione [Cavallaro *et al.*, 2008]. In questo caso 2,5 ore di reazione di attivazione sono state sufficienti per ottenere una coniugazione quantitativa dei derivati del PEG al copolimero PHEA-PLA.

Il grado di derivatizzazione in NH₂-PEG-FA, cioè la quantità di NH₂-PEG-FA legato al PHEA-PLA, è stato determinato attraverso analisi ¹H-NMR, ed in particolare è stato calcolato paragonando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3,65 attribuibili ai -CH₂-CH₂- del PEG, con l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 2,72 attribuibili al PHEA, ed è risultato essere pari al 4,7% in moli rispetto alle unità ripetitive di PHEA.

Questo valore corrisponde anche alla % molare di FA legato al PHEA-PLA-PEG-FA, che è stata determinata sia tramite analisi UV che tramite analisi ¹H-NMR (in questo caso sono stati usati come riferimento i picchi relativi ai protoni aromatici del FA a δ 6,73, 7,60 e 8,70) (figura 33).

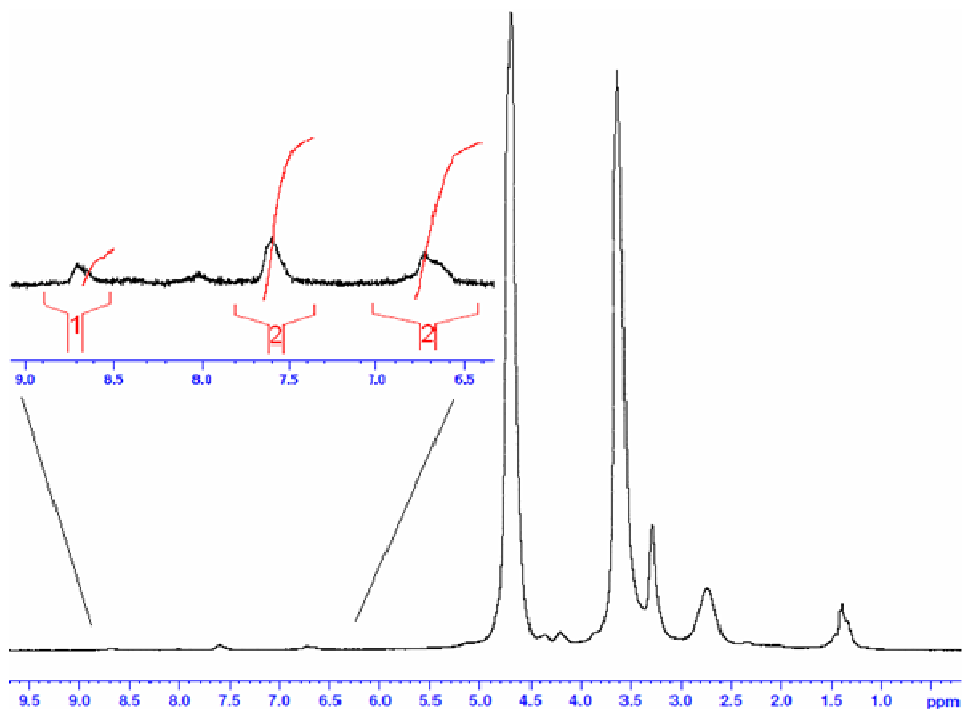


Figura 33. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del copolimero PHEA-PLA-PEG-FA.

Infine, il PHEA-PLA è stato marcato con una sonda fluorescente legando ai gruppi idrossilici liberi, in presenza di DMAP come catalizzatore, la sonda fluorescente Alexa Fluor® 647 (succinimmidil estere-attivato).

Nella tabella 5 sono riportati i dati di caratterizzazione di tutti i derivati del PHEA sintetizzati.

Tabella 5. Dati di caratterizzazione di tutti i derivati del PHEA sintetizzati: peso molecolare e polidispersità ottenuti tramite SEC, DD ottenuti tramite analisi UV e $^1\text{H-NMR}$ e rese percentuali.

Campione	DD _{PEG} (mol%)	DD _{FA} (mol%)	DD _{alexa} (mol%)	PM (kDa)	Polidispersità (M_w/M_n)	Resa (%p/p)
PHEA				32,8	1,6	
PHEA-PLA				66,2	1,8	90
PHEA-PLA- PEG	4,8			75,3	1,7	90
PHEA-PLA- PEG-FA	4,7	4,7		78,2	1,6	90
PHEA-PLA- Alexa			0,2	66,3	1,7	88
PEG-FA		95		2,4	1,2	85

7.2 Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG

Allo scopo di preparare nanoparticelle di ossido di ferro rivestite con i copolimeri sintetizzati, è stato utilizzato il metodo della nanoprecipitazione. Questo approccio si basa sulla precipitazione/coacervazione in acqua di polimeri solubili in un solvente organico, favorendone la deposizione sulla superficie delle nanoparticelle di magnetite e formando così un rivestimento insolubile [Ochekpe *et al.*, 2009]. Per rivestire le nanoparticelle magnetiche con il copolimero PHEA-PLA-PEG-FA, le particelle di ossido di ferro sono state disperse nella fase organica insieme ai due copolimeri anfifilici PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA. La precipitazione in

acqua ha indotto l'adsorbimento di queste macromolecole sulla superficie delle nanoparticelle di ossido di ferro, stabilizzandole e fungendo le stesse da colloidali protettori nella fase acquosa. La diffusione spontanea del solvente organico, utilizzato per solubilizzare i copolimeri, dal film polimerico adsorbito sulla superficie delle nanoparticelle di ossido di ferro verso la fase disperdente, genera il consolidamento dello strato polimerico all'interfaccia tra ossido di ferro e acqua, portando alla formazione di nanoparticelle rivestite con un film stabile. La stessa metodica è stata utilizzata per rivestire le nanoparticelle di magnetite con PHEA-PLA-PEG.

Il processo di formazione delle MNPs-FA è schematizzata in figura 34.

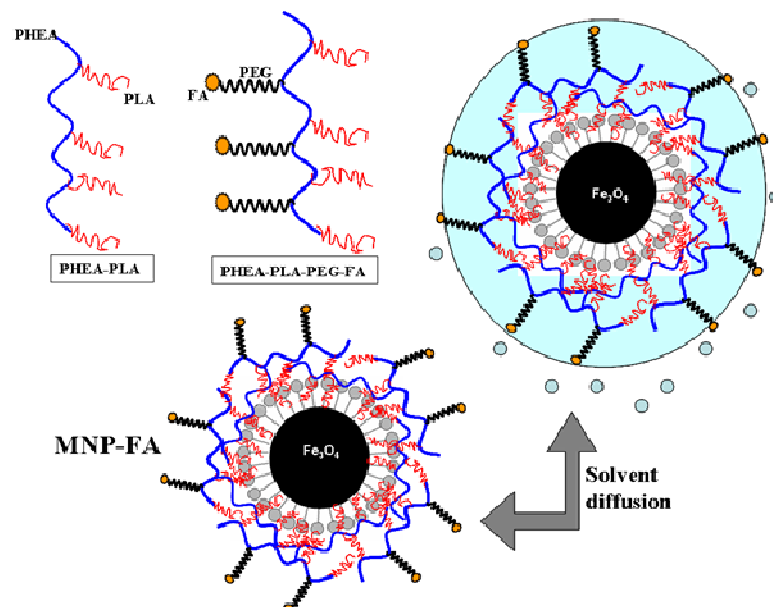


Figura 34. Rappresentazione schematica della formazione del rivestimento polimerico sulle MNPs.

In figura 35 è mostrata la morfologia delle MNPs-FA visualizzata mediante analisi SEM. Le immagini SEM hanno mostrato una popolazione omogenea di nanoparticelle sferiche, non aggregate e con un diametro di circa 35 nm. In particolare, nell'immagine SEM a maggiore ingrandimento (400000 X) è visibile lo strato di polimero che circonda il nucleo di magnetite.

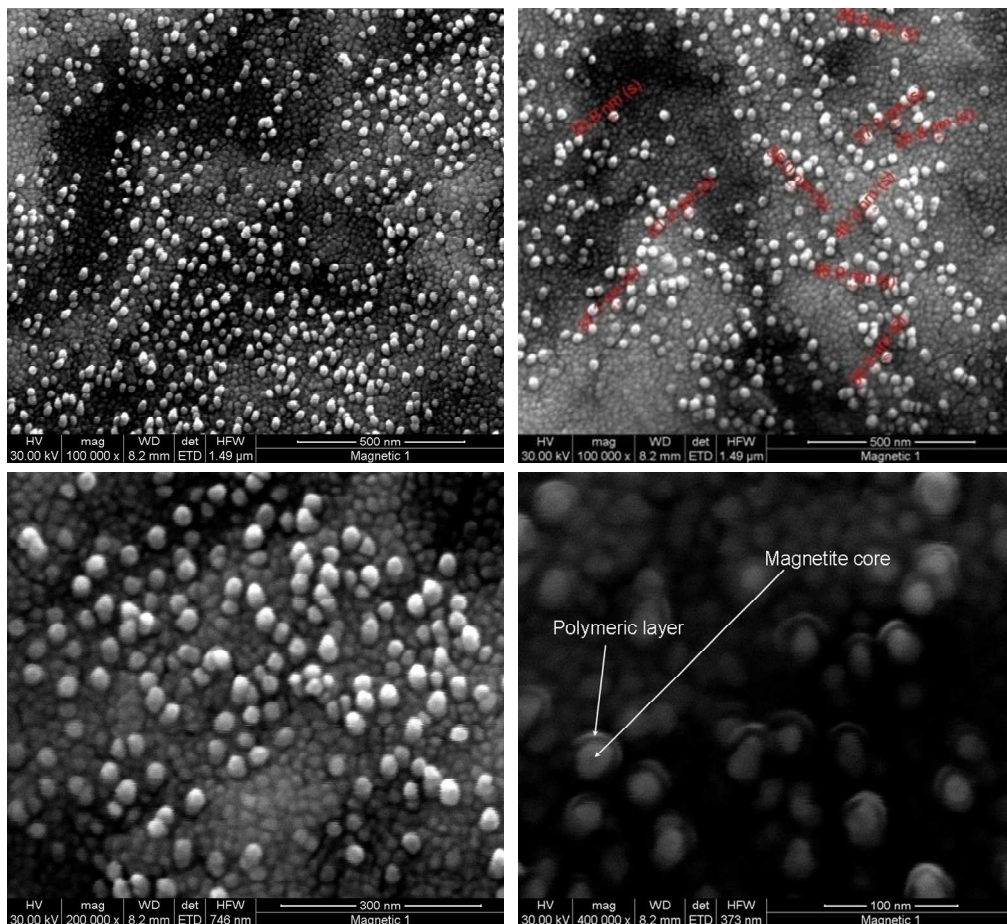


Figura 35. Immagini SEM delle MNPs-FA.

Le misure ottenute tramite dynamic light scattering (DLS) hanno confermato le dimensioni osservate tramite SEM, anche in dispersione acquosa, indicando che le nanoparticelle hanno un diametro idrodinamico medio pari a circa 38,7 nm con un PDI di 0,35.

L'analisi DLS ha mostrato che non vi è alcuna differenza significativa tra le MNPs-FA (Figura 36a) e nanoparticelle rivestite senza FA (MNPs) (Figura 36b).

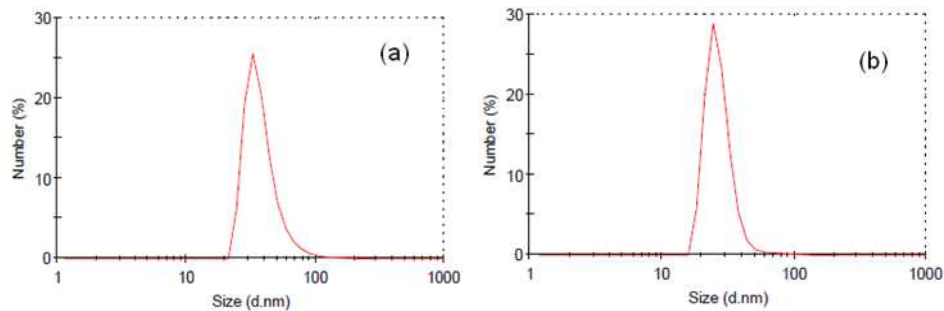


Figura 36. Istogramma della distribuzione dimensionale delle MNPs-FA (a) e delle MNPs (b).

Tutte le nanoparticelle in dispersioni acquose hanno mostrato un potenziale Zeta negativo con valori di circa -18 mV. I dati DLS sono riportati in tabella 6.

Tabella 6. Dati e valori di diametro idrodinamico medio, PDI e potenziale zeta, di campioni di MNPs-FA e di MNPs in mezzo acquoso ad una concentrazione finale di copolimero di $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$.

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	PDI	Potenziale Zeta (mV)
MNPs (PHEA-PLA + PHEA-PLA-PEG + Fe_3O_4)	36,5 nm	0,31	$-18,34 \pm 1,8 \text{ mV}$
MNPs-FA (PHEA-PLA + PHEA-PLA-PEG-FA + Fe_3O_4)	38,7 nm	0,35	$-17,21 \pm 2,2 \text{ mV}$

La composizione quali/quantitativa delle nanoparticelle, costituite da un nucleo di ossido di ferro inorganico ed uno shell esterno di copolimero, è stata valutata mediante saggio colorimetrico alla ferrozina, per la determinazione quantitativa della magnetite, e spettroscopia FT-IR, per la conferma dell'avvenuto rivestimento polimerico e della contemporanea presenza di Fe_3O_4 .

Il saggio alla ferrozina ha permesso di ricavare la quantità totale di ossido di ferro nelle MNPs-FA e nelle MNPs, che è risultato essere pari al 13,7% p/p per le prime e il 15,6% p/p per le seconde.

In figura 37a è riportato lo spettro FT-IR del campione solido di MNPs-FA paragonato con quello delle nanoparticelle solide di Fe_3O_4 e del copolimero PHEA-PLA-PEG-FA. Lo spettro FT-IR delle nanoparticelle di Fe_3O_4 ha mostrato la caratteristica banda (larga) dello stretching Fe-O a 579 cm^{-1} , che è assente nello spettro del copolimero PHEA-PLA-PEG-FA. Lo stretching Fe-O a 579 cm^{-1} è, invece,

presente nello spettro delle MNPs-FA, come chiaramente mostrato in figura 37b. Infine, nello spettro delle MNPs-FA sono chiaramente evidenziate delle bande vibrazionali attribuibili allo stretching C=O (1652 e 1759 cm^{-1}) del polimero. I dati ottenuti sono in accordo con l'esistenza di una matrice polimerica che riveste i domini di magnetite.

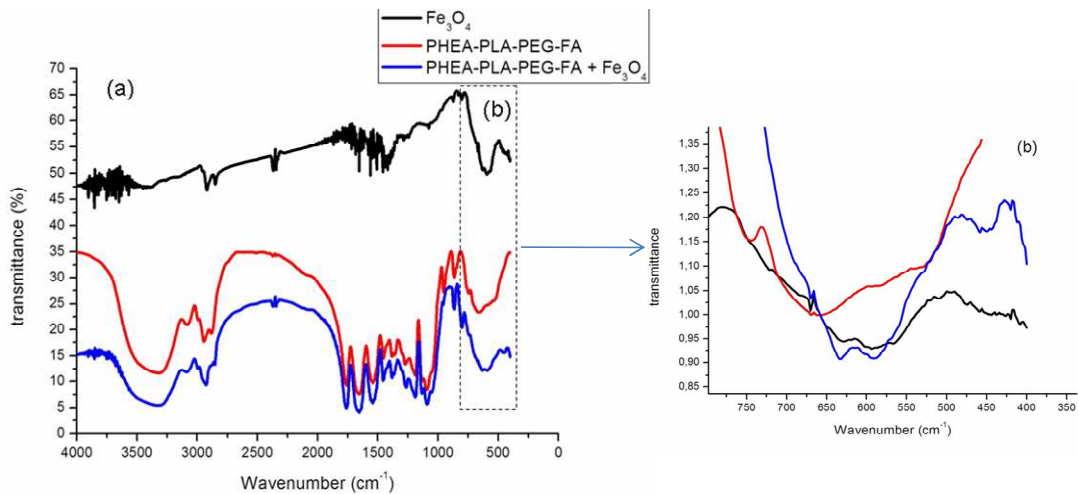


Figura 37. Spettri FT-IR di magnetite (Fe_3O_4), copolimero PHEA-PLA-PEG-FA e MNPs-FA (a); ingrandimento degli spettri (b).

Allo scopo di dimostrare la presenza di molecole di FA nei campioni di MNPs-FA, la quantità di FA è stata determinata mediante spettroscopia UV. Per effettuare tale analisi, lo strato di rivestimento polimerico è stato dapprima solubilizzato in THF, e la risultante soluzione di polimero è stata analizzata mediante uno spettrometro UV. La quantità di FA è risultata essere pari al 4,1% in peso. Pertanto,

è stato facile calcolare il numero di molecole di FA per μg di MNPs-FA, sfruttando la seguente equazione:

$$\frac{\% \frac{w}{w} \text{ FA}}{MW \text{ FA}} * \frac{NA}{100} = \frac{N \text{ FA molecules}}{\text{microG MNPs-FA}}$$

dove % w/w FA è la quantità in peso di FA nelle MNPs-FA; MW FA è il peso molecolare dell'FA; NA è il numero di Avogadro. Il numero di molecole di FA per μg di MNPs-FA è risultato essere pari a $5,6 \cdot 10^{13}$, un numero sufficiente per realizzare un efficiente targeting FR-mediato [Cavallaro *et al.*, 2010].

La curva di magnetizzazione (M) in funzione della temperatura (T) delle MNPs-FA in dispersione acquosa, a ZFC e a FC, è riportata in figura 38. La curva a ZFC è stata acquisita fino a 250 K per evitare la fusione del solvente. Il campione mostra il tipico comportamento di irreversibilità termica, caratteristico di un insieme di nanoparticelle a singoli domini che interagiscono debolmente; ciò può essere descritta dal modello di Néel [Néel, 1949], dove il tempo di rilassamento del momento magnetico delle nanoparticelle, τ , è dato da $\tau = \tau_0 \cdot e^{\frac{KV}{k_B T}}$, dove K è la costante di anisotropia, V è il volume della particella, τ_0 è il tempo di prova e k_B è la costante di Boltzmann. La temperatura alla quale il tempo di misura è uguale al tempo di rilassamento, τ , è definita temperatura di bloccaggio (T_B); tale temperatura, supponendo che τ

sia costante, risulterà direttamente proporzionale alla barriera di anisotropia KV e corrisponderà alla temperatura alla quale la maggior parte delle nanoparticelle si rilassano. Nei sistemi reali, T_B è comunemente identificata con la temperatura corrispondente al massimo della curva ZFC, mentre la differenza tra T_B e la temperatura alla quale ZFC e FC collassano dà una stima della distribuzione della barriera energetica. La T_B media della MNPs-FA è risultata essere pari a 71 K, tale risultato è in accordo con la presenza di nanoparticelle superparamagnetiche di maghemite/magnetite, con una dimensione media di 10 nm [Zhang *et al.*, 2006].

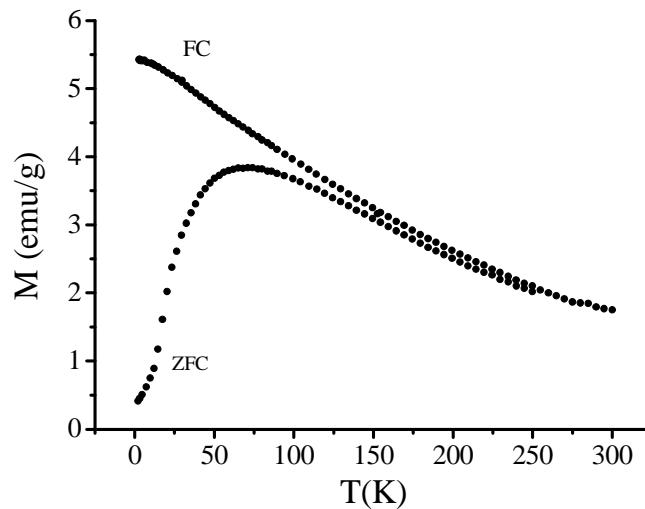


Figura 38. Curve relative alla dispersione di MNPs-FA a *Zero-field cooled* (ZFC) e a *field-cooled* (FC).

Tale valore di temperatura è ben al di sotto della temperatura ambiente, indicando che il campione, a 37°C, temperatura fisiologica, è sempre in regime superparamagnetico, come richiesto per le applicazioni in vivo.

Nell'esperimento condotto a *field cooled* i momenti magnetici delle particelle sono congelati in maniera tale da rimanere allineati al campo magnetico; in tal modo, quando tutte le particelle sono bloccate si potrebbe misurare il valore di magnetizzazione di saturazione. In questo caso, non è stata osservata alcuna saturazione; ciò significa che alla più bassa temperatura utilizzata per effettuare la misura non tutte le particelle erano bloccate.

Inoltre, le proprietà magnetiche delle MNPs-FA sono state studiate in funzione del campo magnetico sia ad alta (300 K) che a bassa (2,5 K) temperatura. Le misure sono state effettuate sia sulle dispersioni in acqua che sul campione di MNPs-FA liofilizzato, e non è stata osservata alcuna differenza significativa, suggerendo che le proprietà magnetiche delle MNPs-FA non sono suscettibili né all'ambiente fisico né alle interazioni.

La curva M contro H a temperatura ambiente (300 K) non ha mostrato coercitività (figura 39), confermando che tutti i campioni sono nel regime superparamagnetico. Il valore di magnetizzazione di

saturazione (M_s) stimato, applicando alla curva la legge empirica $M = M_s + \frac{a}{H} + \frac{b}{H^2}$ [Gittlemann *et al.*, 1974], è risultato essere pari a 26,8 emu g⁻¹. Il valore di M_s ottenuto è inferiore rispetto a quello osservato per la magnetite in bulk (circa 90 emu / g) [Schieber, 1967]: tale riduzione è comunemente osservata nelle nanoparticelle magnetiche in cui la magnetite è rivestita da una matrice polimerica e, a essa, è attribuita la presenza di uno strato di spin disordinato sulla superficie [Millan *et al.*, 2007], dovuto ad un aumento del rapporto superficie/volume .

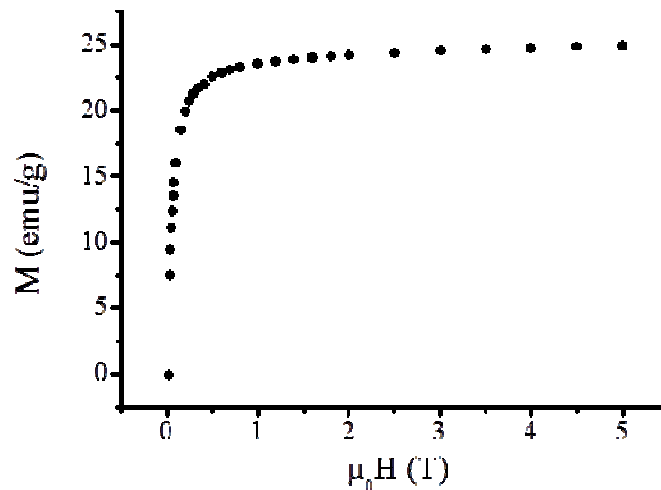


Figura 39. Curva di magnetizzazione delle MNPs-FA a temperatura ambiente.

La curva M contro H registrata a bassa temperatura (2,5 K), riportata in figura 40, mostra il ciclo di isteresi (vedi ingrandimento di Figura 40) con un campo coercitivo $\mu_0 H_C = 38$ mT. La magnetizzazione residua $M_R = (M_{0T}) / (M_{5T})$, valutata come rapporto tra il valore di magnetizzazione a 0 e 5 T, è risultata essere pari a 0,37. Questo valore è leggermente inferiore a 0,5, valore previsto per un insieme di nanoparticelle uniaxiali isolate, i cui assi sono facilmente orientati isotropicamente, confermando la presenza di una porzione di nanoparticelle magnetiche ultra-piccole che collassa più velocemente di quelle di media grandezza.

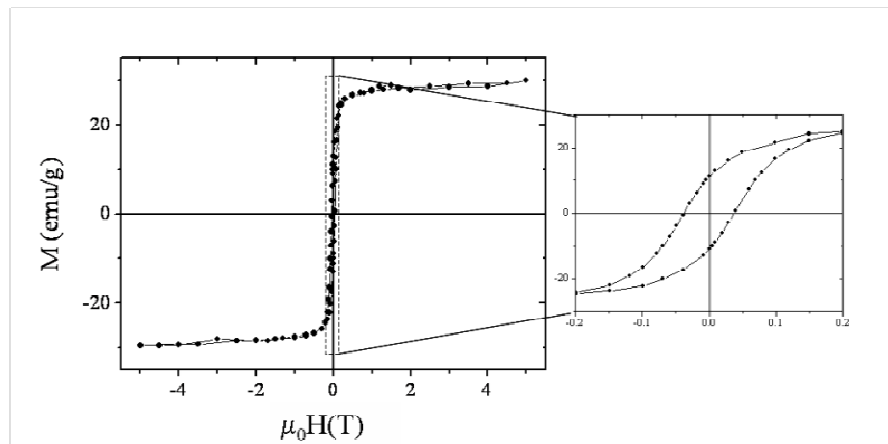
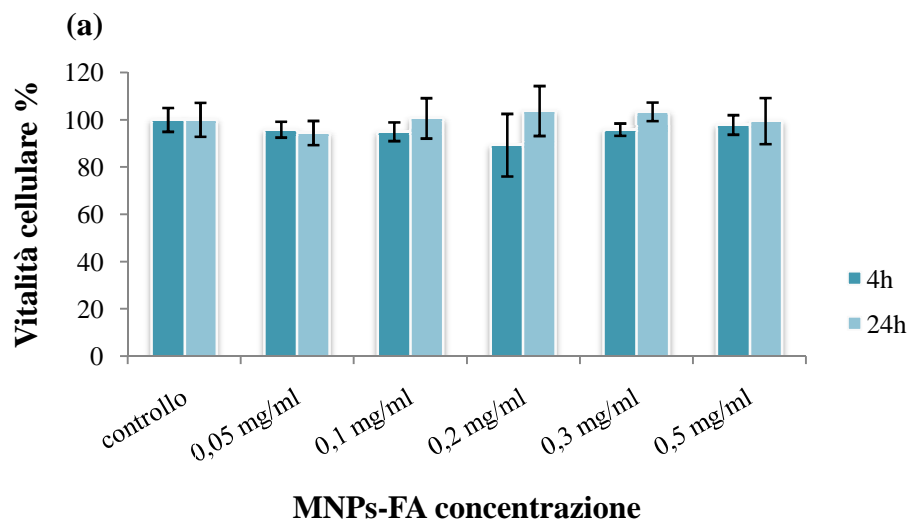
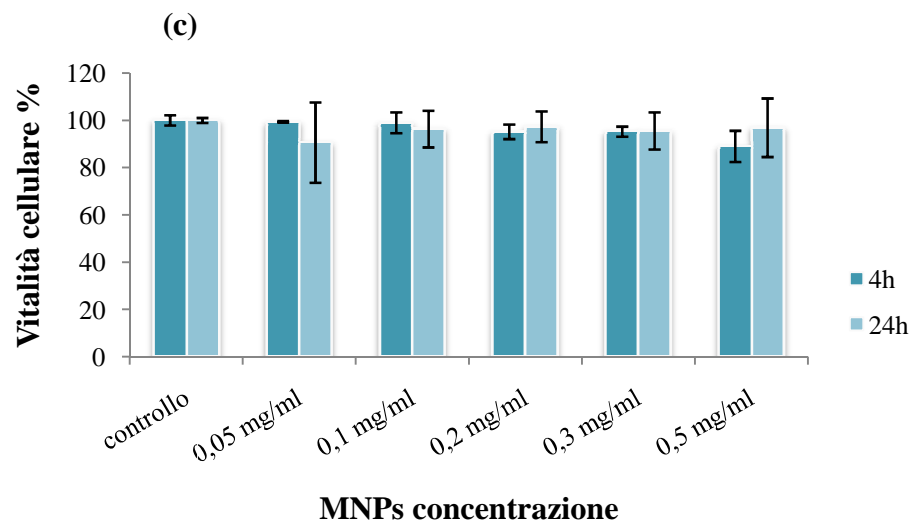
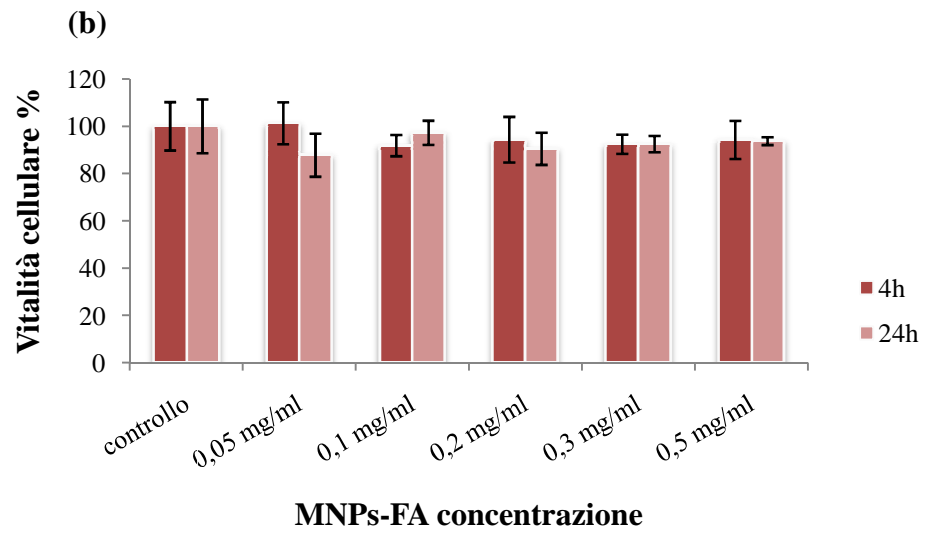


Figura 40. Curva di magnetizzazione delle MNPs-FA registrata a 2,5 K.

7.3 Valutazione biologica in vitro delle MNPs-FA e delle MNPs

La citotossicità delle MNPs-FA e delle MNPs è stata valutata in cellule MCF7, usate come linea cellulare tumorale modello, e in cellule 16HBE, utilizzate come linea cellulare umana non tumorale, valutando la vitalità cellulare mediante il saggio MTS. I risultati, in termini di vitalità cellulare (%) in funzione della concentrazione dei campioni, sono mostrati in figura 41. I dati mostrano che, per le nanoparticelle magnetiche sia con folato che senza folato, la vitalità cellulare è paragonabile al controllo, il che indica una buona citocompatibilità delle MNPs-FA (Figura 41a e b) e delle MNPs (figura 41c e d) alle concentrazioni testate sia sulle cellule tumorali (a, c) che sulle cellule normali (b, d).





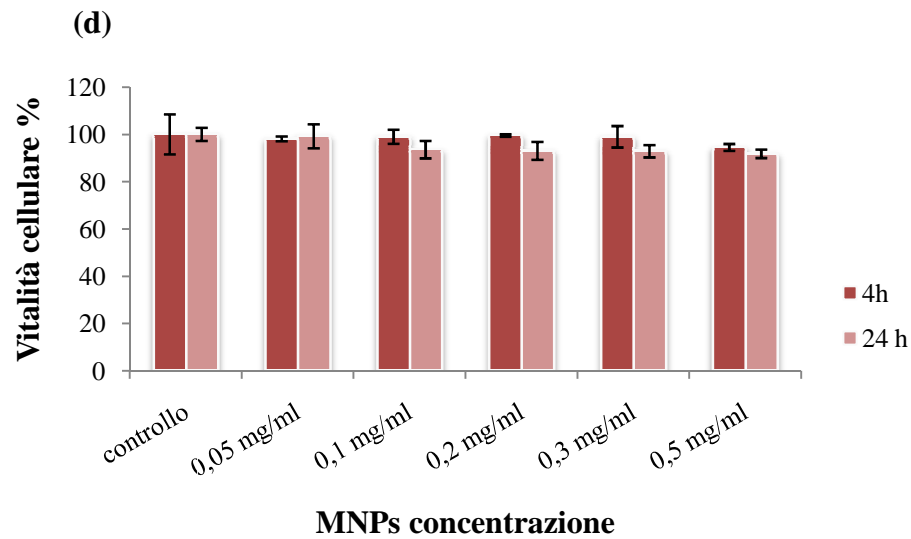
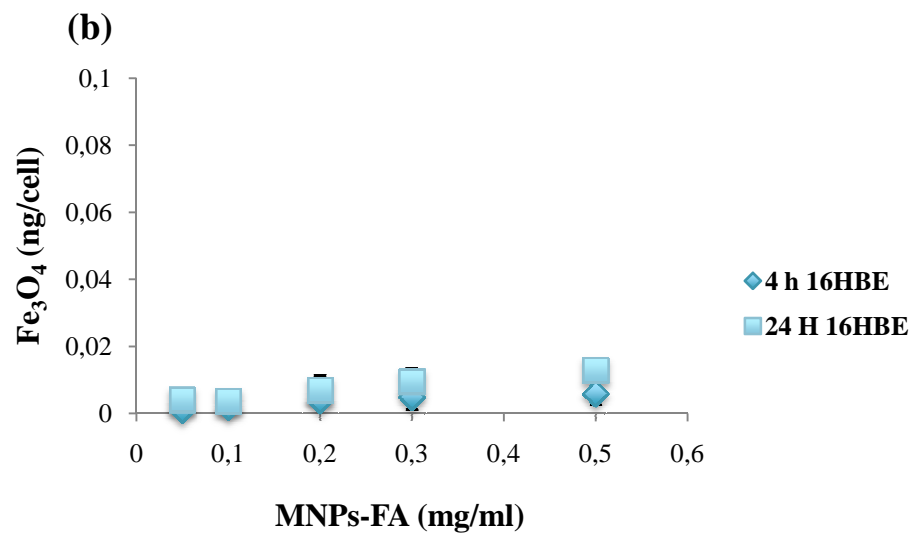
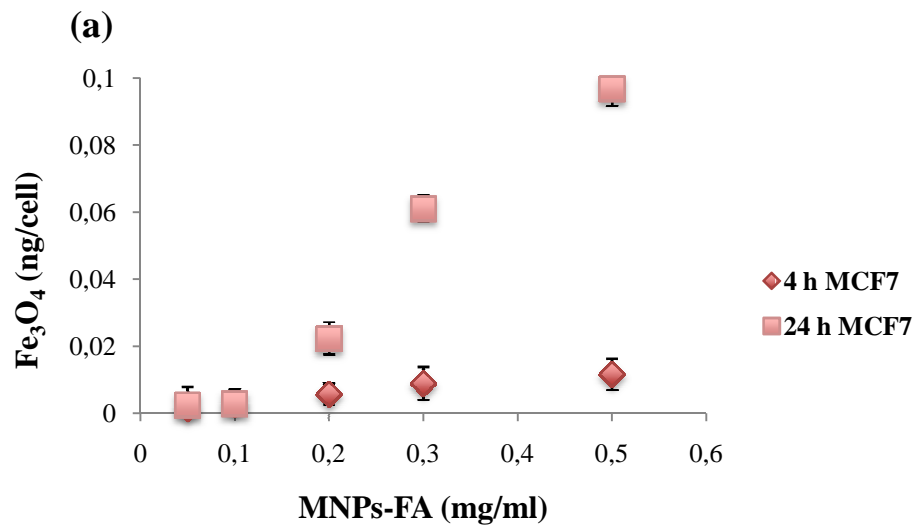


Figura 41. Vitalità cellulare % (saggio MTS) delle MNPs-FA (a,b) e delle MNPs (c,d) a 4 e 24 ore di incubazione a diverse concentrazioni, testate sia su cellule tumorali MCF7 (a,c) che su cellule normali 16HBE (b,d). I risultati sono riportati come media \pm SD (n = 6).

La preferenziale internalizzazione delle nanoparticelle magnetiche nelle cellule tumorali piuttosto che in quelle normali è un fattore importante, sia per garantire un effetto farmacologico mirato, di un eventuale farmaco caricato, ma anche per ottenere una maggiore risoluzione nell'area di accumulo, qual ora i sistemi vengano utilizzati come agenti di contrasto nella risonanza magnetica. Per questo motivo, è stato valutato l'uptake cellulare delle MNPs-FA e delle MNPs a tempi di incubazione diversi, sia nelle cellule tumorali che in quelle normali.

Le cellule MCF7 e 16HBE sono state incubate sia con le MNPs-FA che con le MNPs per 4 e 24 ore, ed è stata calcolata la quantità di Fe^{3+} internalizzato (espresso come Fe_3O_4). In figura 42 sono ripartati i grafici di uptake in termini di ng di Fe_3O_4 per cellula, ai due tempi di incubazione analizzati. Complessivamente, l'uptake delle MNPs-FA nelle MCF7 (figura 42a) è risultato essere cospicuamente superiore all'uptake nelle 16HBE (figura 42b). Al contrario, le MNPs non hanno la capacità di distinguere le due diverse linee cellulari MCF7 (figura 42c) e 16HBE (figura 42d).

Pertanto, si può ipotizzare, che il maggiore uptake delle nanoparticelle magnetiche da parte delle cellule tumorali piuttosto che dalle cellule normali dipende fortemente dalla presenza dell'FA, presumibilmente, esposto sulla superficie delle nanoparticelle. Infatti, come ampiamente discusso nella parte introduttiva, l'acido folico viene internalizzato dalle cellule attraverso un meccanismo recettore-mediato; ed inoltre, i recettori per il folato sono sovraespressi sulle membrane delle cellule tumorali [Cavallaro *et al.*, 2010].



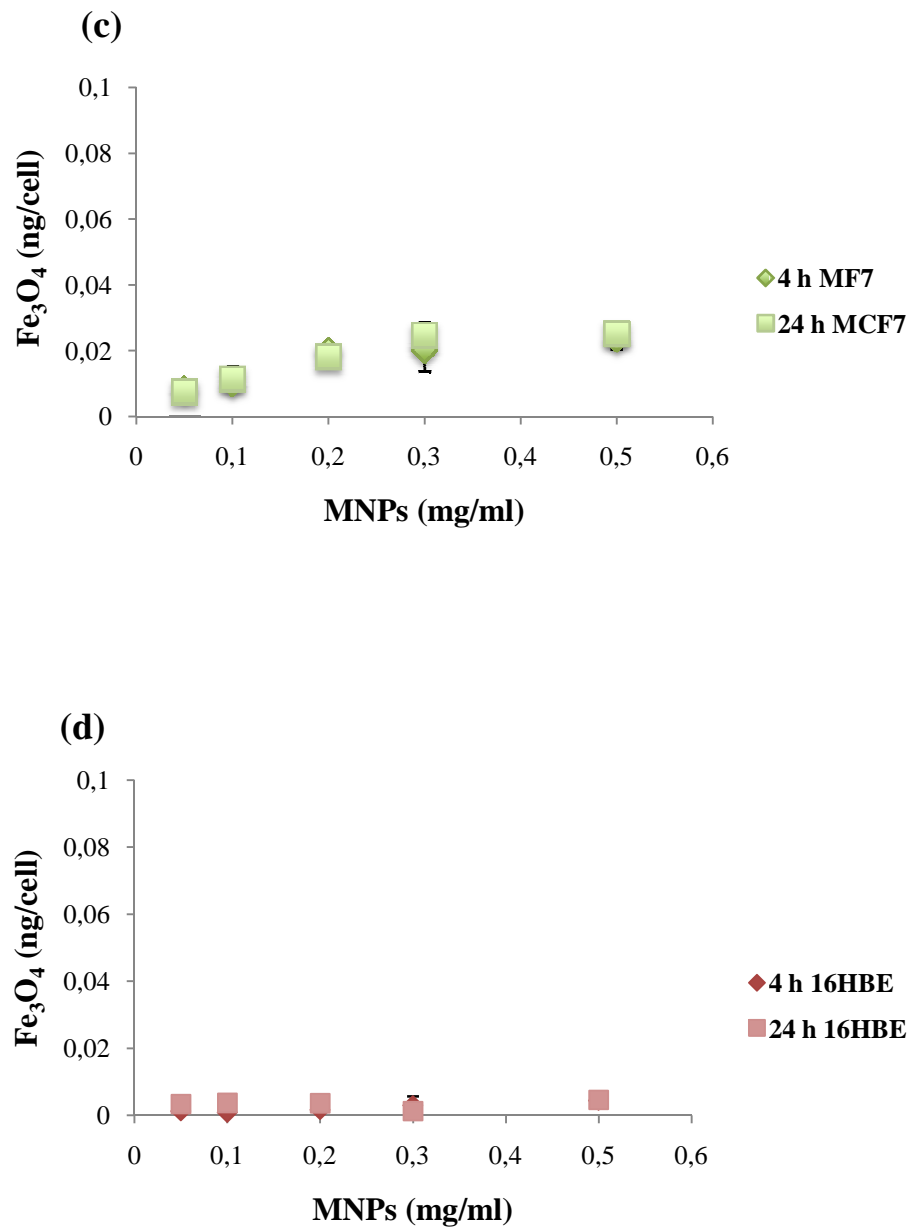


Figura 42. Uptake cellulare (espresso in ng di Fe_3O_4) delle MNPs-FA (a,b) e MNPs (c,d) dopo 4 e 24 ore d'incubazione a diverse concentrazioni su cellule MCF7 (a,c) e su cellule 16HBE (b,d). I risultati sono riportati come media \pm SD (n = 3).

Inoltre, allo scopo di valutare la possibilità di ottenere un duplice effetto targeting (attivo, dovuto ad un meccanismo recettore-mediato

tra l'acido folico e i suoi recettori cellulari, e magnetico, dovuto all'applicazione di un campo magnetico esterno), è stato valutato l'uptake delle MNPs-FA nelle cellule MCF7 anche in presenza di un magnete posto al di sotto dello strato cellulare. In particolare, le immagini dell'uptake cellulare (figura 44) delle cellule incubate per 4 (44 a, d) e 24 ore (44 b, c ed e), con (44a, b, c) o senza (44 d, e) un magnete applicato esternamente alla coltura (come mostrato in figura 43), sono state ottenute attraverso un microscopio ottico, utilizzando il reattivo alla ferrozina per la determinazione del ferro incorporato.

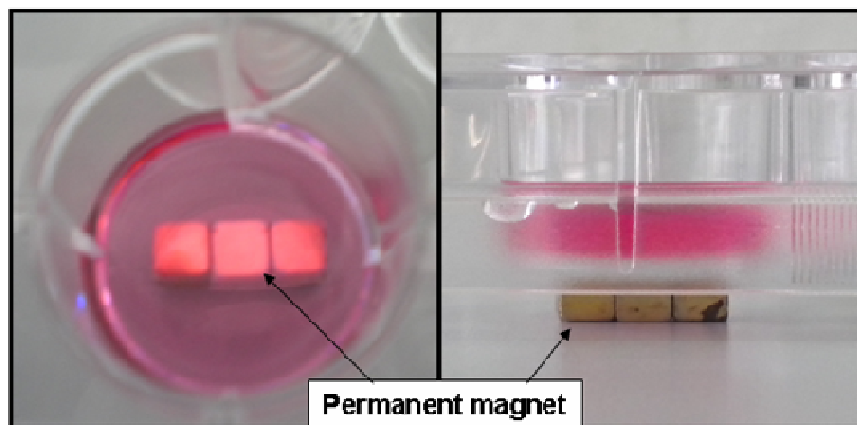


Figura 43. Fotografia dei pozzetti per la coltura cellulare usati per gli studi di uptake in presenza di un magnete applicato esternamente.

Come si può osservare, è stato evidenziato un colore rosso più intenso nei pozzetti delle cellule incubate con le MNPs-FA in presenza del magnete (figura 44 a, b, c), piuttosto che nelle cellule incubate senza il magnete esterno (figura 44 d ed e), dimostrando che il targeting attivo

dell'FA e l'applicazione di un campo magnetico esterno, migliorano l'internalizzazione delle nanoparticelle magnetiche, agendo, pertanto in maniera sinergica.

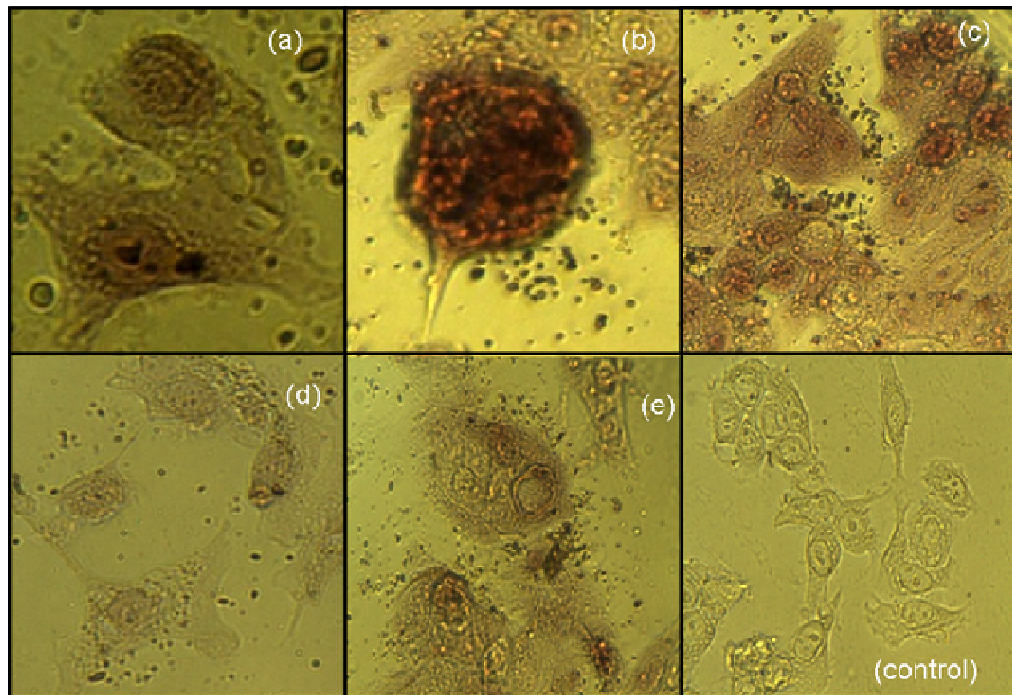


Figura 44. Immagini, ottenute attraverso microscopia ottica, delle cellule MCF7 incubate con le MNPs-FA per 4 (18 a,d) e 24 (18 b,c ed e) ore, con (18 a, b, c) o senza (18 d,e) un magnete applicato esternamente al pozzetto, dopo trattamento con ferrozina.

Infine, gli esperimenti di microscopia confocale hanno confermato che l'FA migliora l'accumulo delle MNPs-FA nel citoplasma cellulare (figura 45 e 46). Per rendere le nanoparticelle magnetiche visibili attraverso il microscopio confocale, è stato necessario sintetizzare un copolimero fluorescente (PHEA-PLA-Alexa). Successivamente, tale copolimero è stato utilizzato insieme al PHEA-PLA-PEG-FA o al

PHEA-PLA-PEG per preparare le MNPs-FA-Alexa e le MNPs-Alexa. L'uptake cellulare delle nanoparticelle magnetiche è stato valutato utilizzando un Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) a doppio canale, registrando la fluorescenza in emissione in cellule vive, per 18 ore. Le immagini in fluorescenza sono state acquisite a brevi intervalli di tempo e, allo stesso tempo, è stata costruita in tempo reale una curva del processo di uptake [*Palma et al.*, 2011].

Le immagini in fluorescenza in tempo reale sono riportate in figura 45. E' stato osservato un uptake trascurabile delle MNPs-Alexa nelle cellule MCF7 dopo 18 ore di incubazione (immagine non riportata). Al contrario, è risultato ben visibile, dalle immagini al confocale ottenute ad intervalli di tempo diversi, un aumento graduale dell'uptake delle MNPs-FA-Alexa. Tale risultato è confermato dai grafici in cui è riportata l'intensità di fluorescenza nel citoplasma, in funzione del tempo (figura 46).

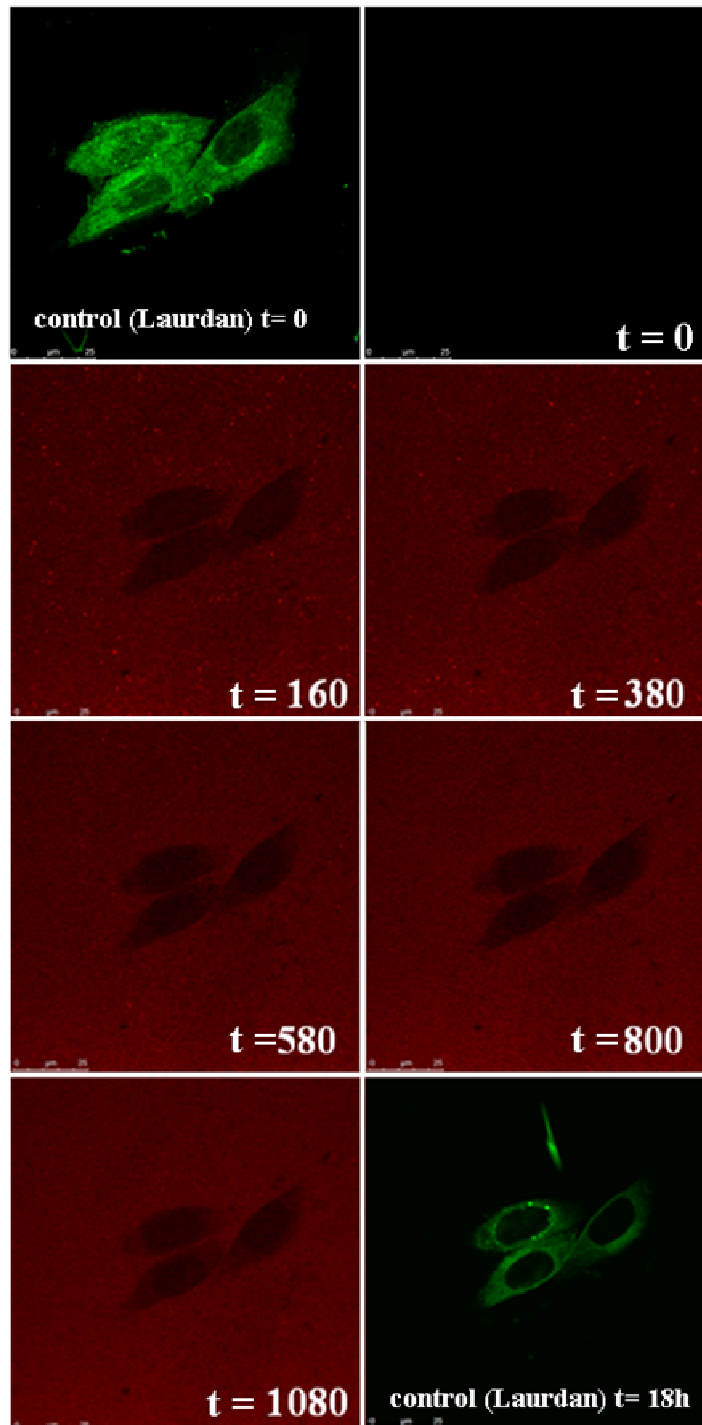


Figura 45. Immagini di microscopia confocale in tempo reale delle cellule MCF7 incubate con le MNPs-FA-Alexa per 18 ore. Le nanoparticelle marcate con Alexa sono colorate in rosso; le membrane cellulari sono marcate con Laurdan (verdi). In tutte le immagini la barra dimensionale è di 25 μm.

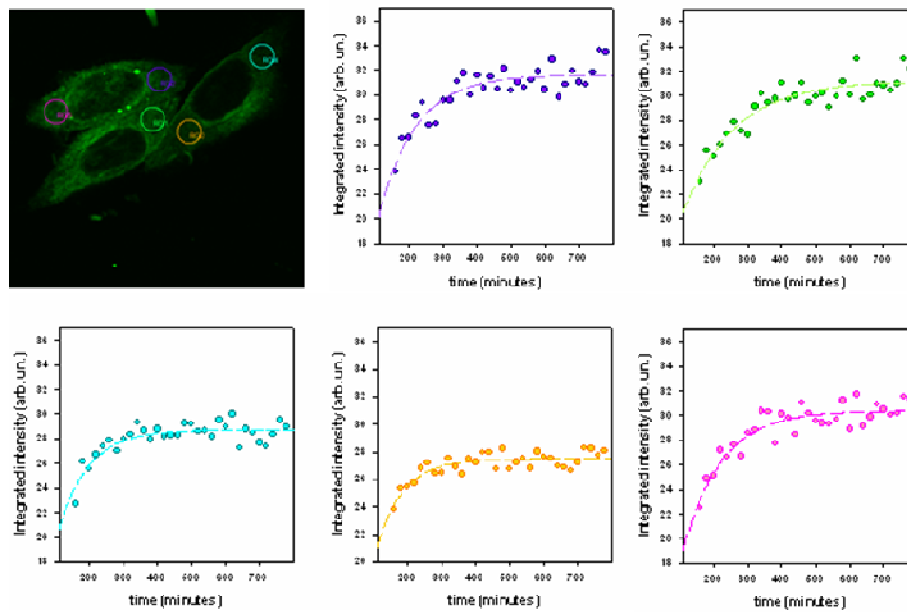


Figura 46. Intensità di fluorescenza normalizzata (arb. un.) delle cellule MCF7 incubate con le MNPs-FA-Alexa per 18 ore.

8. CONCLUSIONI

I trattamenti terapeutici oggi in uso per la cura del cancro, tra i quali la radioterapia, spesso combinata con la chemioterapia [Guo *et al.*, 2011], mirano ad inibire la crescita delle cellule tumorali e la recidiva della malattia. Ciascuno di questi approcci comporta, purtroppo, il rischio di uccidere cellule sane o danneggiare fatalmente un tessuto sano, causando tossicità sistemica ed effetti collaterali indesiderati.

Pertanto, una buona strategia, al fine di ottenere sistemi direzionati verso uno specifico organo bersaglio, è quella di coniugare sulla superficie esterna dei sistemi carrier molecole direzionanti (ligando targeting) [Gao *et al.*, 2005], che legano appropriati recettori espressi nel sito targeting. L'acido folico, un ligando ad elevata affinità per i recettori del folato, è uno tra i ligandi target proposti con maggior successo per il drug delivery tumore-specifico.

Per tale ragione, nel presente lavoro è stato sintetizzato con successo un copolimero anfifilico funzionalizzato con acido folico, utile per rivestire nanoparticelle superparamagnetiche, allo scopo di ottenere un sistema nanoparticellare dotato di un doppio targeting (folato mediato e magnetico) per le cellule tumorali. Le nanoparticelle magnetiche ottenute hanno mostrato dimensione di 37 nm e una struttura costituita da un core di magnetite e un rivestimento polimerico. Gli studi di

magnetizzazione hanno indicato che i campioni sono costituiti da nanoparticelle con comportamento superparamagnetico a temperatura fisiologica, come richiesto per le applicazioni biomediche.

Le nanoparticelle sono state inoltre caratterizzate dal punto di vista biologico mediante test di citotossicità e di uptake cellulare. Gli studi sulla vitalità cellulare hanno mostrato una mancanza di citotossicità sia in cellule tumorali che in cellule sane. I risultati degli studi di uptake cellulare hanno dimostrato, invece, che l'uptake delle nanoparticelle nelle cellule MCF7 può essere efficacemente migliorato con l'utilizzo dell'acido folico e che le nanoparticelle magnetiche FA-modificate sono in grado di discriminare, in termini di internalizzazione delle stesse nanoparticelle, le cellule cancerose da quelle non tumorali, in accordo con il fatto che i recettori dei folati sono principalmente sovra-espressi sulle membrane delle cellule tumorali. Inoltre, l'analisi CLSM in tempo reale ha ulteriormente confermato i risultati sopra citati. Per di più, le immagini di microscopia ottica dell'uptake intracellulare delle MNPs-FA nelle cellule MCF7 incubate in presenza di un magnete esterno applicato nella porzione inferiore del pozzetto in esame, ha evidenziato che un campo magnetico migliora l'internalizzazione delle nanoparticelle magnetiche in modo sinergico con il targeting attivo FA-mediato.

Concludendo, i risultati ottenuti in questo lavoro incoraggiano l'impiego delle nanoparticelle magnetiche rivestite di PHEA-PLA-PEG-FA come possibile "*Dual Targeted Delivery System*" per il trattamento dei tumori.

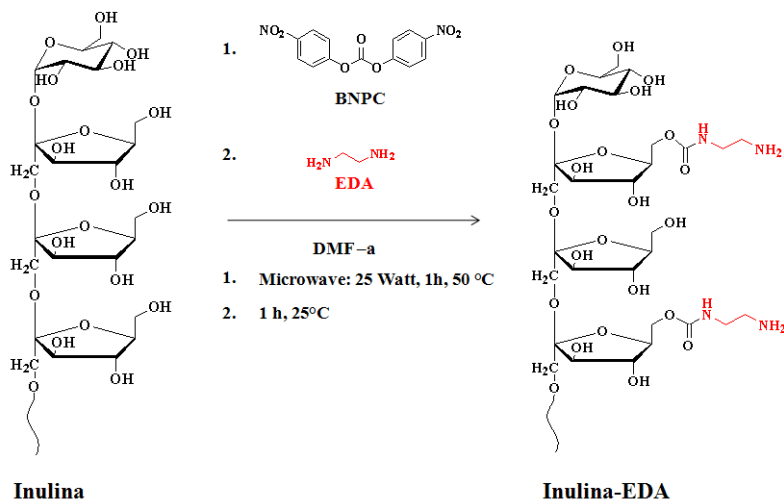
9. NANOPARTICELLE SUPERPARAMAGNETICHE RIVESTITE CON UN DERIVATO SQUALENICO DELL'INULINA PER IL "MAGNETIC DRUG TARGETING"

Tenenendo conto delle caratteristiche positive dello squalene, quali biocompatibilità, chemioprolifassi [Van Duuren *et al.*, 1976] attività antitumorale e azione citoprotettiva (protegge le cellule sane, ma non quelle tumorali, dall'azione tossica dei chemioterapici) [Ready *et al.*, 2009], sono state realizzate nanoparticelle superparamagnetiche rivestite con un copolimero dell'inulina funzionalizzato con derivati dello squalene, in grado di veicolare farmaci antitumorali attraverso l'applicazione di un campo magnetico esterno.

9.1 Sintesi e caratterizzazione del copolimero Inu-EDA-Sq-PEG

Al fine rivestire nanoparticelle di Fe_3O_4 idrodispersibili, stabilizzate con derivati del PEG (Sigma Aldrich), è stato sintetizzato e caratterizzato un nuovo copolimero anfifilico a struttura polisaccaridica, l'Inu-EDA-Sq-PEG.

Inizialmente l'inulina (Inu) è stata parzialmente derivatizzata con EDA (schema 4), allo scopo di introdurre nel backbone del polisaccaride gruppi amminici primari disponibili per ulteriori derivatizzazioni.

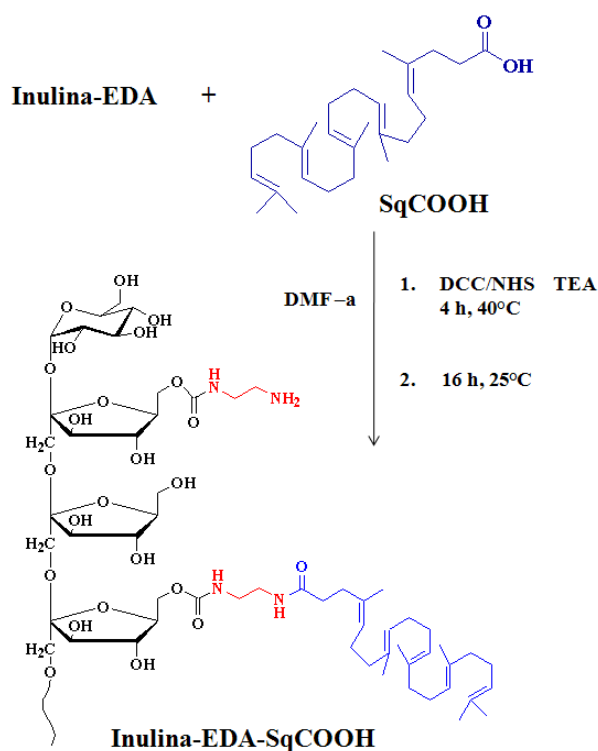


Schema 4: Schema di sintesi dell'Inu-EDA.

La reazione tra l'Inu e l'EDA è stata eseguita attivando i gruppi alcolici dell'Inu con BNPC. Tale reazione è stata condotta in un reattore a microonde a temperatura e potenza controllati. Ciò ha consentito di ottenere, rispetto a tecniche di reazioni che sfruttano il riscaldamento convenzionale, un elevato grado di derivatizzazione in EDA in tempi minori. Il grado di derivatizzazione dell'Inu-EDA (DD_{EDA}) è stato calcolato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, paragonando l'integrale dei picchi a δ 2,62 relativo ai protoni dell'EDA ($4H_{EDA}$, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) con l'integrale dei picchi a δ 3,76 ($5 H_{INU}$, $\text{-CH}_2\text{-OH}$; $\text{-CH-CH}_2\text{-OH}$; $\text{-C-CH}_2\text{-O-}$), δ 4,02 ($1H_{INU}$, -CH-OH), δ 4,19 (d,

$1H_{\text{INU}}$, $-\text{CH-OH}$) attribuibili ai protoni del fruttosio dell'Inu; tale valore è risultato essere pari al $28\pm 1\%$ in moli.

L'Inu-EDA è stata successivamente funzionalizzata con un derivato carbossilico dello squalene, SqCOOH C_{27} , attraverso una reazione di coupling carbodiimide mediata, in presenza di N-idrossisuccinimide, ottenendo il copolimero Inu-EDA-Sq (schema 5).

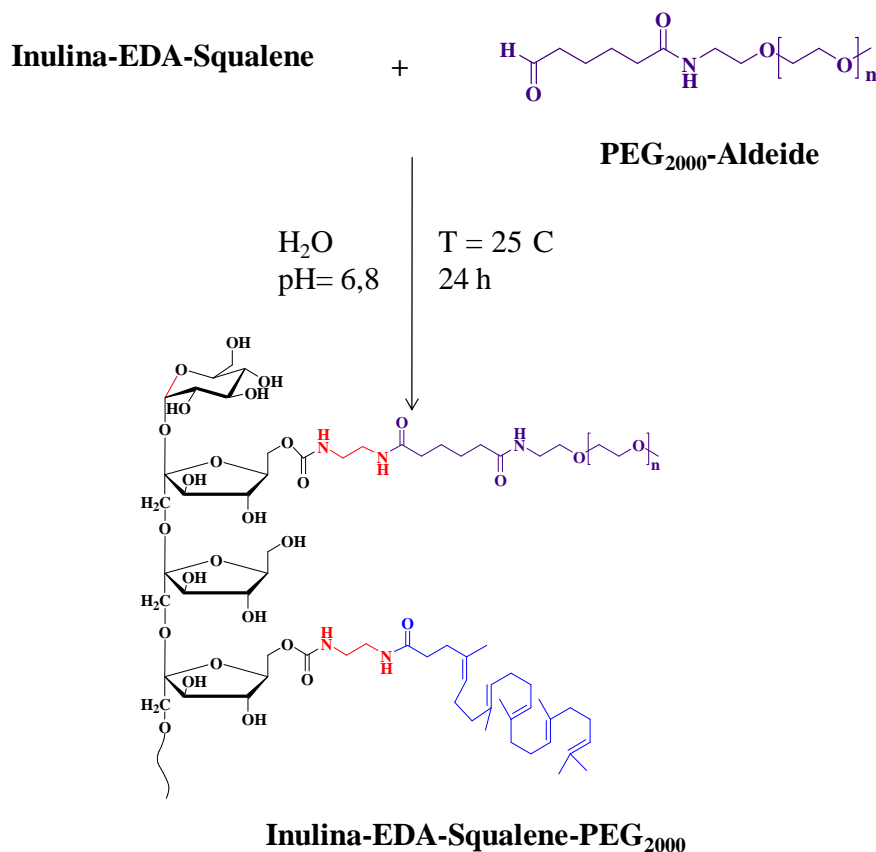


Schema 5. Schema di sintesi del copolimero Inu-EDA-Sq.

Il copolimero sintetizzato è stato opportunamente caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e il grado di derivatizzazione dell'Inu-EDA-Sq in Sq (DD_{Sq}) è stato determinato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$

registrato in una miscela di DMF/D₂O (7:1), paragonando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 1,5 e 1,9, attribuibili ai rispettivamente ai CH₃ e CH₂ dello squalene con gli integrali dei picchi compresi tra δ 3,76 e 4,19 relativi ai protoni del backbone dell'inulina: Il DD_{Sq}, espresso come valore medio di tre determinazioni, è risultato essere pari al $1,7 \pm 1$ % in moli.

Infine, i gruppi amminici liberi dell'Inu-EDA-Sq sono stati derivatizzati con catene di PEG₂₀₀₀, al fine di ottenere il copolimero Inu-EDA-Sq-PEG con potenziali proprietà *stealth* (schema 6).



Schema 6. Schema di sintesi del copolimero Inu-EDA-Sq-PEG.

La reazione è stata condotta in acqua a pH 6,8; in queste condizioni sperimentali il PEG₂₀₀₀ aldeide reagisce con i gruppi amminici liberi dell'Inu-EDA-Sq ottenendo così l'INU-EDA-Sq-PEG. Il grado di derivatizzazione dell'Inu-EDA-Sq-PEG in PEG (DD_{PEG}) è stato calcolato attraverso analisi ¹H-NMR comparando l'integrale del picco a δ 3,65 attribuibile ai 176 protoni del PEG (176 H_{PEG}, -CH₂-CH₂-O-) con gli integrali dei picchi compresi tra δ 3,76 e 4,19 relativi ai protoni del backbone dell'inulina. Il DD_{PEG} , espresso come valore medio di tre determinazioni, è risultato essere pari al $2,7 \pm 0,5$ % in moli.

Il peso molecolare medio (M_w) e l'indice di polidispersità (PDI), calcolati per mezzo di analisi SEC, come descritto nella sezione sperimentale, sono riportati in tabella 7.

Tabella 7. Peso molecolare medio (M_w), e indice di polidispersità (PDI) dei polimeri Inu, Inu-EDA, Inu-EDA-Sq e Inu-EDA-Sq-PEG.

Campione	M_w	PDI
Inu	4994	1,42
Inu-EDA	2549	1,24
Inu-EDA-Sq	3072	1,3
Inu-EDA-Sq-PEG	4296	1,7

9.2 Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con Inu-EDA-Sq-PEG

Allo scopo di preparare nanoparticelle di ossido di ferro rivestite (MNPs), il copolimero Inu-EDA-Sq-PEG è stato disperso in un 1 ml di acqua contenenti nanoparticelle di Fe_3O_4 , stabilizzate con PEG, e la miscela posta in dialisi contro acqua bidistillata per 48 ore. Il copolimero anfifilico in acqua si adsorbe, interagendo attraverso interazioni di tipo fisico, sulla superficie delle nanoparticelle di Fe_3O_4 , stabilizzandole e fungendo da colloide protettore.

La dimensione e la morfologia dei sistemi ottenuti è stata valutata attraverso analisi SEM. Le immagini così ottenute (figura 47) rivelano la presenza di una popolazione omogenea di nanoparticelle sferiche, non aggregate e con un diametro di circa 50 nm.

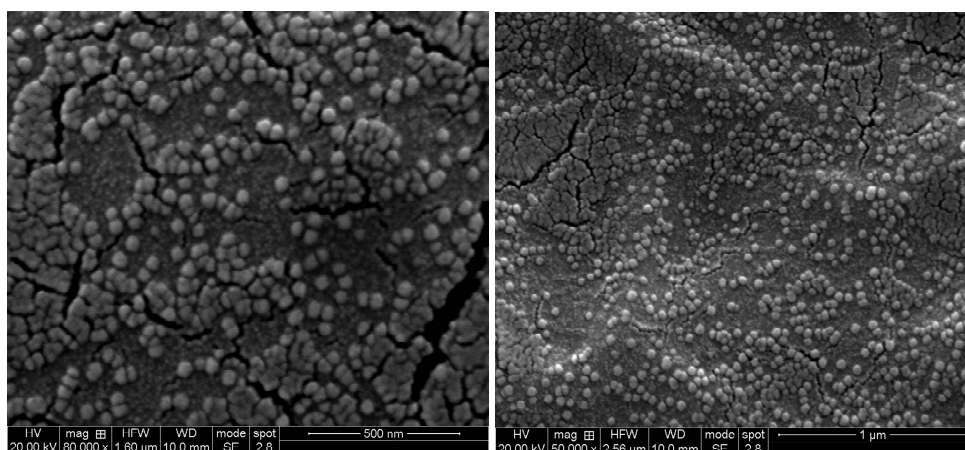


Figura 47. Immagini SEM delle nanoparticelle magnetiche di Inu-EDA-Sq-PEG.

Le misure ottenute tramite Dynamic light scattering (DLS) hanno confermato le dimensioni osservate tramite SEM, anche in dispersione acquosa, indicando che le nanoparticelle hanno un diametro idrodinamico medio pari a circa $54,79 \pm 1,2$ nm con un PDI di 0,16.

Inoltre, al fine di incorporare un farmaco modello all'interno delle nanoparticelle magnetiche rivestite con Inu-EDA-Sq-PEG, alla miscela acquosa di copolimero e nanoparticelle di Fe_3O_4 è stato aggiunto 1 ml di soluzione acquosa di Doxorubicina base libera

(Doxo). La miscela ottenuta è stata sonicata e posta in dialisi per 48 ore al fine di allontanare il farmaco non intrappolata all'interno delle nanoparticelle. L'incorporazione del farmaco avviene per l'insaturarsi di interazioni di tipo fisico tra il copolimero anfifilico e il farmaco.

La quantità di Doxo incorporata è stata quindi determinata tramite analisi UV, ed è risultata essere pari a circa il $10 \pm 0,5$ % (p/p) rispetto al sistema totale (copolimero/Fe₃O₄/DOXO). Le nanoparticelle ottenute (MNPs-DOXO) sono state caratterizzate attraverso DLS, al fine di valutare il diametro idrodinamico medio, l'indice di polidispersità e il potenziale zeta (tabella 8).

Tutte le nanoparticelle in dispersioni acquose hanno mostrato un potenziale Zeta positivo con valori di circa 20 mV.

Tabella 8. Dati e valori di diametro idrodinamico medio, PDI e potenziale zeta, di campioni di MNPs e MNPs-DOXO in mezzi acquosi.

Campione	Diametro medio (nm)	PDI	Pz (mV)
MNPs	54.19	0,16	21±8
MNPs-DOXO	44,15	0,46	19.8±2

L'analisi DLS ha mostrato che non vi è alcuna differenza significativa tra le MNPs (Figura 48a) e le nanoparticelle cariche di farmaco (MNPs-DOXO) (Figura 48b).

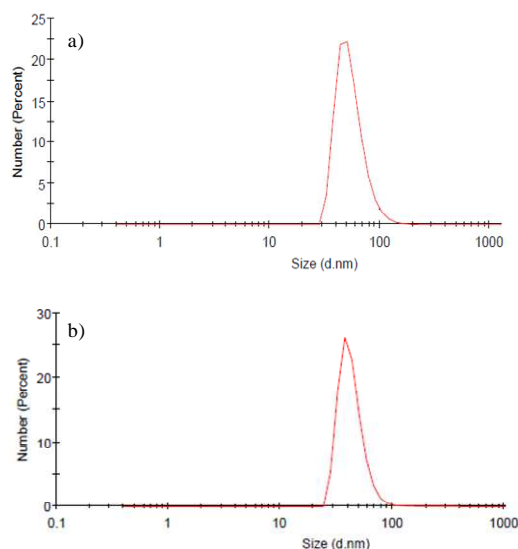


Figura 48. Istogramma della distribuzione dimensionale delle MNPs (a) e delle MNPs-DOXO(b).

La composizione quali/quantitativa delle nanoparticelle, costituite da un nucleo di ossido di ferro inorganico ed uno shell esterno di copolimero, è stata valutata mediante saggio colorimetrico alla ferrozina e spettroscopia FT-IR.

Il saggio alla ferrozina ha permesso di ricavare la quantità totale di ossido di ferro, per unità di massa di nanoparticelle. A tal proposito, le nanoparticelle sono state disperse in una soluzione di HCl 1,4 M e riscaldate a 60°C per 2 ore, al fine di disaggregare le nanoparticelle e

solubilizzare gli ioni ferro. In seguito, alla soluzione è stato aggiunto una la soluzione di reattivo composta da acido ascorbico, che riduce gli ioni ferrici a ioni ferrosi, la neucoproina, che complessa eventuali ioni presenti in soluzione che potrebbero interferire con l'analisi, e la ferrozina, che complessa gli ioni ferrosi formano un complesso colorato che assorbe a 560 nm. Pertanto, la concentrazione del complesso e, dunque, il contenuto di ferro nelle nanoparticelle è stato determinato attraverso analisi spettrofotometrica. Il contenuto di ossido di ferro nelle nanoparticelle è risultato essere pari a $6,5\pm 1\%$ p/p nelle MNPs e $7,7\pm 0,5\%$ p/p nelle MNPs-DOXO.

Allo scopo di verificare l'avvenuto rivestimento delle nanoparticelle superparamagnetiche di Fe_3O_4 con il copolimero Inu-EDA-Sq-PEG è stato effettuato un'analisi FT-IR; in particolare, sono stati confrontati gli spetti FT-IR della magnetite del copolimero e delle MNPs. Gli spettri sono riportati in figura 49.

Lo spettro FT-IR del campione solido di MNPs mostra un'ampia banda caratteristica dello stretching Fe-O a 590 cm^{-1} (ingrandimento figura 49), che è assente nello spettro del copolimero Inu-EDA-Sq-PEG.

Questo dato evidenzia la presenza di magnetite nel campione di nanoparticelle MNPs. Inoltre, confrontando lo spettro FTIR delle

nanoparticelle di ossido di ferro (magnetite) con quello del polimero di rivestimento, sono anche chiaramente visibili le bande vibrazionali attribuibili agli stretching C=O (1547 e 1718 cm^{-1}) del polimero. Tutto ciò è coerente con l'esistenza di domini di magnetite rivestiti da matrice polimerica.

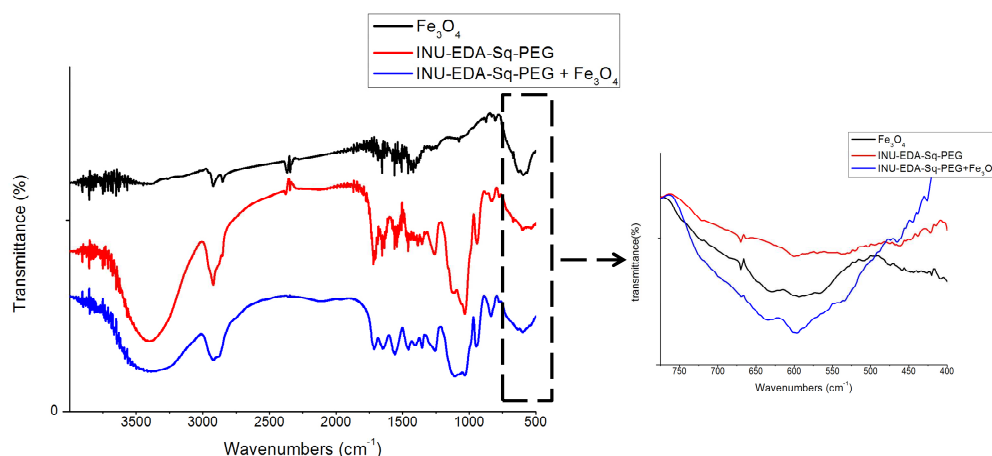


Figura 49. Spettro FTIR della magnetite, delle MNPs, del copolimero Inu-EDA-PEG-Sq e ingrandimento della banda vibrazionale compresa tra 800 e 400 cm^{-1} .

Inoltre è stato valutato il comportamento superparamagnetico delle MNPs applicando ad una dispersione acquosa di MNPs un campo magnetico esterno. Nella figura 50 si possono osservare le fotografie della dispersione di MNPs (a) e la dislocazione delle nanoparticelle dopo applicazione di un magnete esterno (b). Come si può notare, inizialmente le MNPs sono disperse in maniera omogenea, mentre tendono a concentrarsi in prossimità del magnete nel momento in cui la dispersione di MNPs viene posta per qualche minuto sotto l'azione

di un campo magnetico esterno, inoltre come è possibile vedere in figura 50 (c) dopo la rimozione del campo magnetico le nanoparticelle non conservano alcuna magnetizzazione residua e pertanto si ridisperdono istantaneamente. Questo risultato dimostra che le MNPs preparate contengono domini nanometrici di Fe_3O_4 con comportamento superparamagnetico.

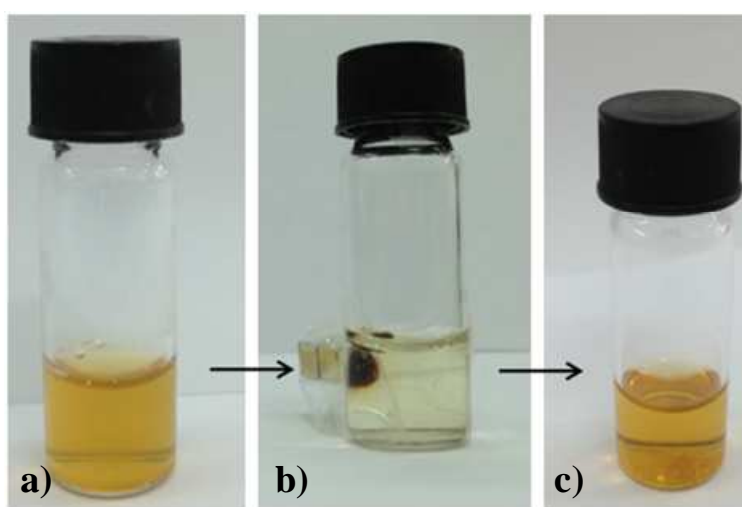


Figura 50. Fotografie della dispersione acquosa di MNPs prima (a), durante l'applicazione di un campo magnetico esterno (b), e dopo la rimozione del campo magnetico (c).

9.3 Studi di rilascio in vitro

Allo scopo di valutare la capacità dei sistemi di rilasciare il farmaco incorporato, sono stati effettuati studi di rilascio in due diversi mezzi, simulanti l'ambiente fisiologico: tampone fosfato (PBS) a pH 7,4, al fine di simulare il pH sanguigno, e PBS a pH 5,5, al fine di simulare il pH endosomiale e lisosomiale.

Per gli studi di rilascio, è stato utilizzato il metodo della dialisi; esso consiste nel caricamento delle nanoparticelle contenenti farmaco, in una membrana da dialisi, che viene posta all'interno di un opportuno volume di mezzo; quest'ultimo funge da compartimento ricevente.

Ad intervalli di tempo prestabiliti, si effettuano prelievi di aliquote di mezzo esterno, il quale viene poi sostituito da un uguale volume di mezzo fresco, al fine di mantenere le condizioni sink. Infine, le aliquote prelevate vengono analizzate attraverso analisi HPLC.

In figura 51a e b, sono riportati i profili di rilascio a pH 7,4 e 5,5, rispettivamente. La quantità di Doxo rilasciata durante lo studio, è stata espressa come percentuale del rapporto in peso di farmaco rilasciato, rispetto alla quantità totale di farmaco contenuta nelle nanoparticelle.

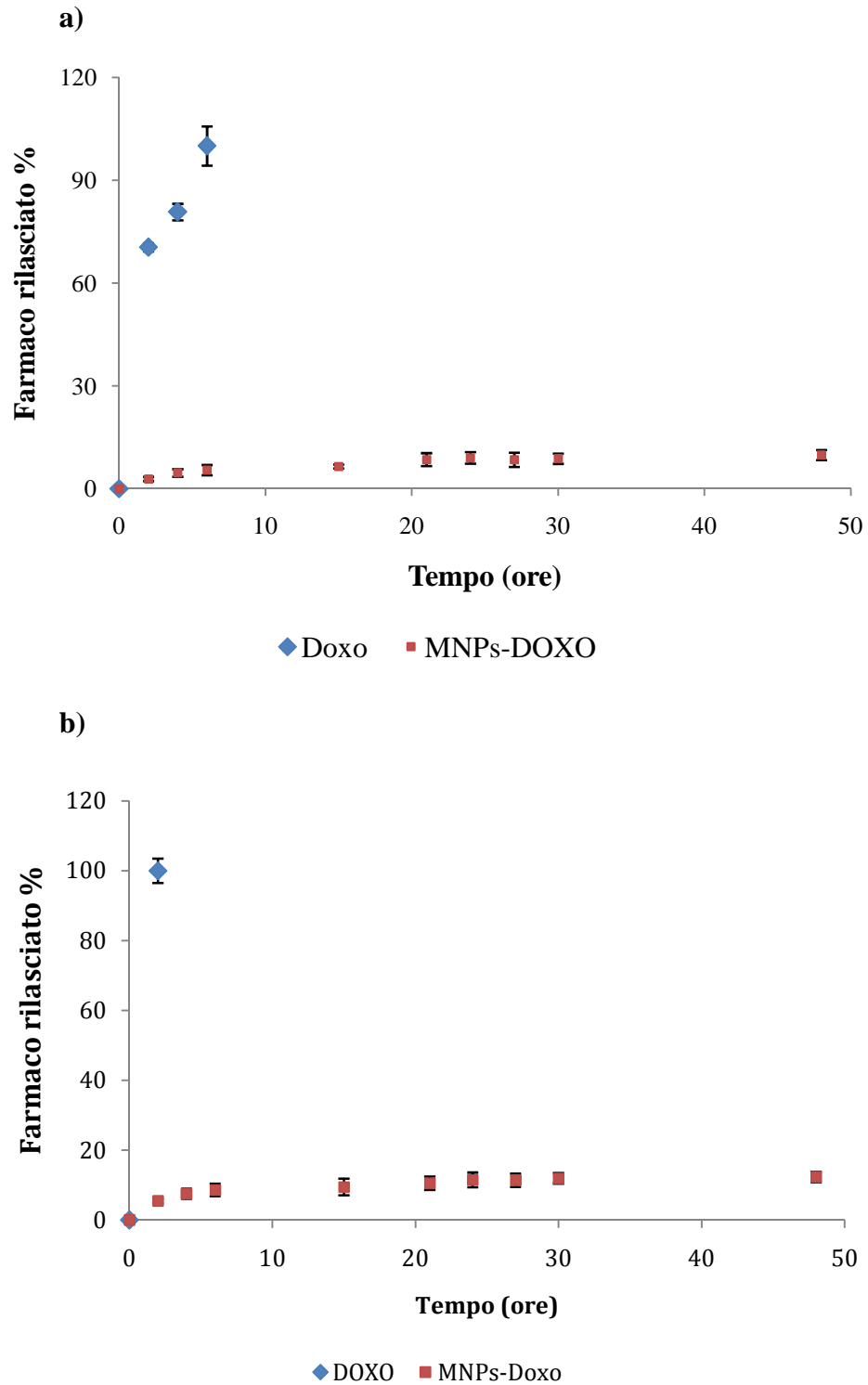


Figura 51. Percentuale di Doxo rilasciata dalle MNPs-DOXO in confronto alla curva di diffusione della Doxo libera nelle stesse condizioni sperimentali: a) PBS pH 7,4 e b) PBS pH 5,5. I valori di deviazione standard (\pm DS) sono stati calcolati sulla base di tre esperimenti.

Gli studi effettuati dimostrano come, ad entrambi i valori di pH, dopo 48 ore, solo circa il 12 % di Doxo venga rilasciata in forma libera dal sistema nanoparticellare, mentre tutta la Doxo libera, caricata all'interno delle membrana, diffonde nelle prime ore di incubazione. Ciò è presumibilmente dovuto alle forti interazioni che si instaurano tra le nanoparticelle e la Doxo, che mantengono quest'ultima saldamente ancorata al sistema.

Poiché le nanoparticelle preparate, nelle condizioni sperimentali scelte, rilasciano molto lentamente il farmaco caricato, si può supporre che i sistemi siano in grado di veicolare elevate quantità di farmaco all'interno delle cellule tumorali, senza che questo venga prematuramente rilasciato.

9.4 Valutazioni biologiche in vitro delle nanoparticelle magnetiche di Inu-EDA-Sq-PEG: citotossicità e uptake

Allo scopo di valutare l'attività citotossica delle nanoparticelle contenenti Doxo, sono stati condotti studi di tossicità cellulare *in vitro*. Cellule HCT116 sono state incubate con dispersioni contenenti nanoparticelle cariche di farmaco; inoltre, per valutare l'eventuale effetto del sistema sulle cellule, come confronto, sono state usate nanoparticelle magnetiche vuote, usando la stessa concentrazione di

sistema usata nell'esperimento fatto con le nanoparticelle cariche di farmaco. Cellule trattate con Doxo libera, sono state utilizzate come controllo positivo. Infine, attraverso il saggio MTS è stato anche valutato l'effetto di un campo magnetico esterno applicando sul fondo dei pozzetti contenenti le cellule un magnete con forza di attrazione pari a 250 g (figura 52).

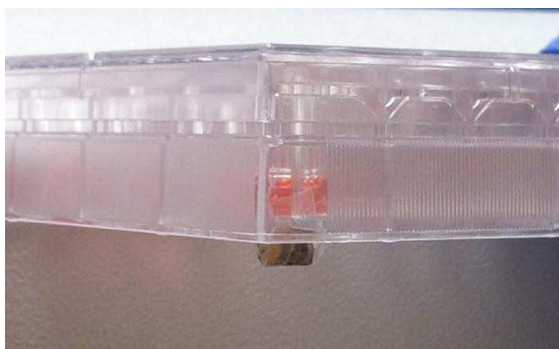


Figura 52. Fotografia dei pozzetti per coltura cellulare usati per gli studi di citotossicità e uptake in presenza di un magnete applicato esternamente.

In particolare, il campo magnetico è stato applicato a cellule non trattate e cellule trattate con la dispersione di MNPs e MNPs-DOXO, a concentrazione pari a $0,27 \text{ mg ml}^{-1}$ (corrispondente a $50 \text{ }\mu\text{M}$ di Doxo).

I sistemi sono stati incubati, con i campioni su indicati, per 24 e 48 ore. Trascorso il tempo di incubazione, le cellule sono state analizzate tramite saggio colorimetrico MTS, per valutare la vitalità cellulare.

I risultati, espressi in termini di vitalità cellulare (%), in funzione della concentrazione delle nanoparticelle cariche e della Dox libera, sono mostrati in figura 53.

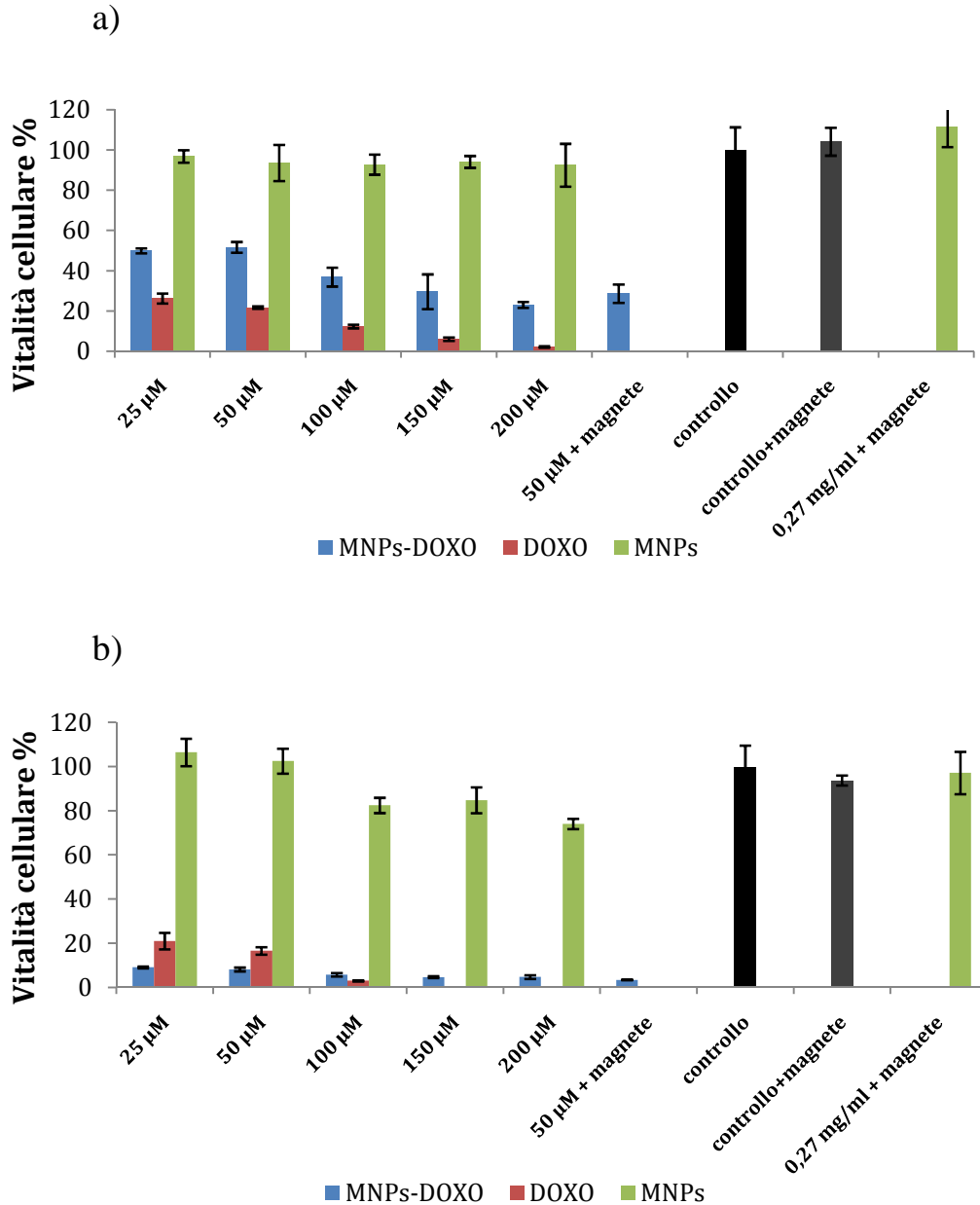


Figura 53. Vitalità cellulare % (saggio MTS) delle MNP-DOXO, delle MNPs e della Doxo, in presenza e in assenza di un campo magnetico esterno, a 24 (a) e 48 (b) ore di incubazione a diverse concentrazioni, testate su cellule di carcinoma del colon umane (HCT116). I risultati sono riportati come media \pm DS (n=6).

L'analisi dei dati consente di evidenziare che, sulle cellule tumorali *in vitro*, i sistemi particellari preparati non alterano la nota tossicità della Doxo, dal momento che sia quando si trova in forma libera che incorporata nelle nanoparticelle magnetiche l'efficacia del farmaco non cambia. In entrambi i casi, infatti, l'effetto citotossico è caratterizzato da un andamento crescente, sia all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle (e quindi di farmaco), sia del tempo di incubazione.

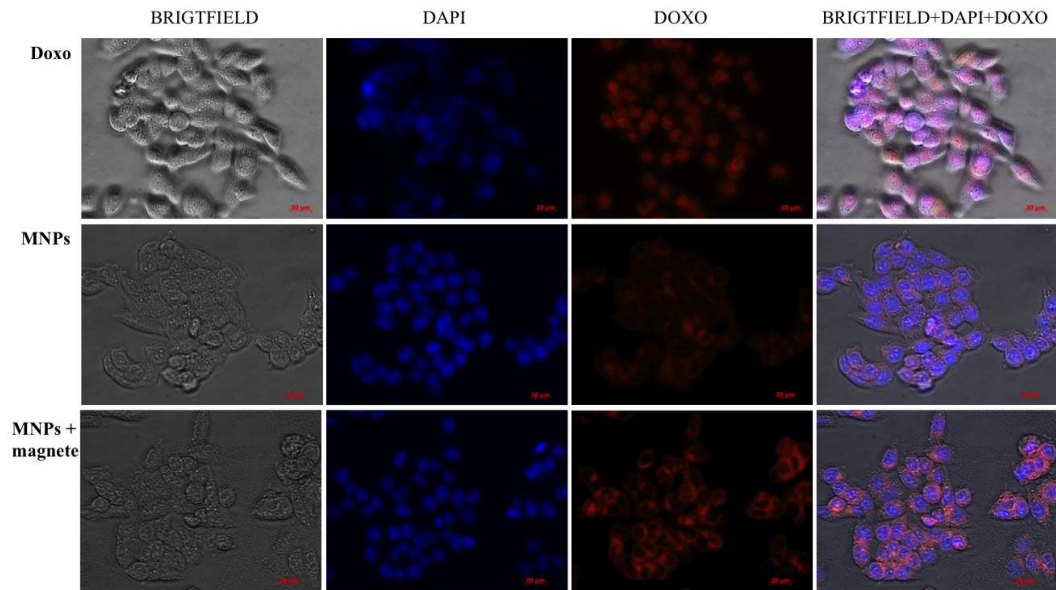
Inoltre, come è possibile osservare dal grafico 53a, quando le MNPs-DOXO a concentrazione pari a $0,27 \text{ mg ml}^{-1}$ (corrispondente a $50 \text{ }\mu\text{M}$ di Doxo), vengono incubate in presenza di un magnete posto al di sotto del letto cellulare, l'azione citotossica della Doxo caricata all'interno dei sistemi, dopo 24 ore di incubazione, aumenta di circa il 50 % rispetto all'effetto che si ha quando le MNPs-DOXO vengono incubate alla stessa concentrazione in assenza di un campo magnetico esterno. Nel primo caso infatti, in presenza del campo magnetico, la vitalità cellulare è circa il 28%, mentre nel secondo caso, in assenza del campo magnetico, è circa il 51% rispetto al controllo. Ciò significa che, il campo magnetico esterno, incrementa l'efficienza dei sistemi, infatti, a parità di concentrazione di farmaco, in presenza di un campo magnetico esterno, si ha un effetto farmacologico maggiore. L'effetto

citotossico è imputabile alla sola Doxo, dal momento che, come è possibile osservare dai grafici a 24 (53a) a 48 (53b) ore, quando le cellule sono incubate con le MNPs vuote la vitalità cellulare è paragonabile al controllo, ciò indica una buona citocompatibilità dei sistemi vuoti alle concentrazioni testate. Inoltre, l'applicazione di un campo magnetico esterno non ha effetto citotossico sulla linea cellulare testata.

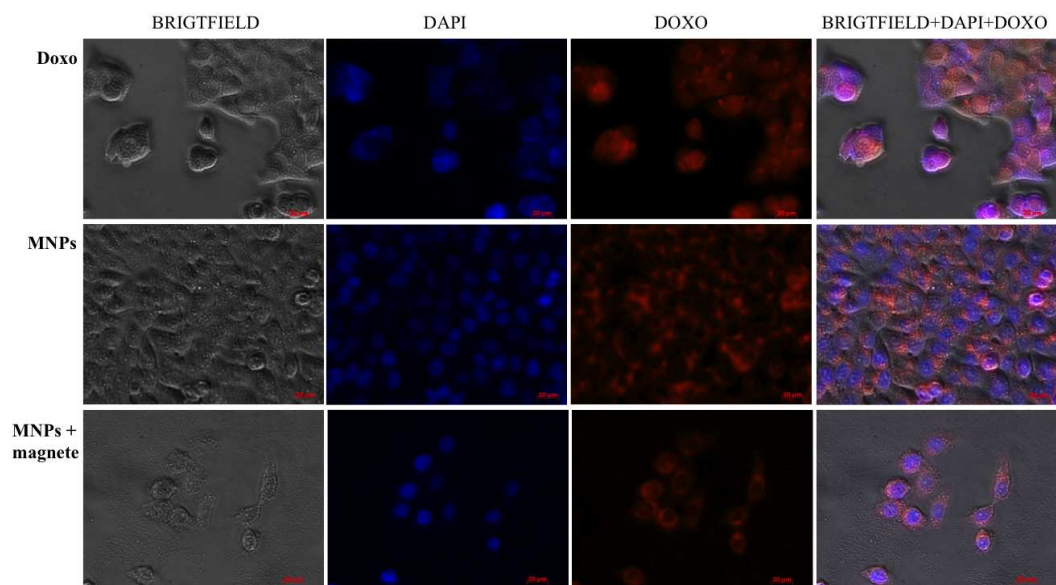
Affinché la Doxo caricata all'interno delle nanoparticelle possa manifestare la propria azione citotossica, è necessario che i sistemi vengano internalizzati all'interno delle cellule tumorali. Pertanto, attraverso microscopia a fluorescenza, è stato valutato l'uptake cellulare delle MNPs-DOXO a diversi tempi di incubazione, sia in presenza (figura 52) che in assenza di un campo magnetico esterno. Le cellule HCT116 sono state incubate con una dispersione acquosa di MNPs-DOXO, a concentrazione pari a $0,27 \text{ mg ml}^{-1}$ (corrispondenti a $50 \text{ }\mu\text{M}$) per 4, 24 e 48 ore; sono state fissate con forlmadeide ed i loro nuclei sono stati colorati con DAPI. Come controllo positivo, sono state utilizzate cellule incubate con dispersioni acquose di Doxo in forma libera, a concentrazione pari a $50 \text{ }\mu\text{M}$.

In figura 54 sono riportate le immagini dell'uptake cellulare delle cellule incubate per 4 (54a), 24 (54b) e 48 ore (54c), ottenute attraverso microscopia a fluorescenza.

a)



b)



c)

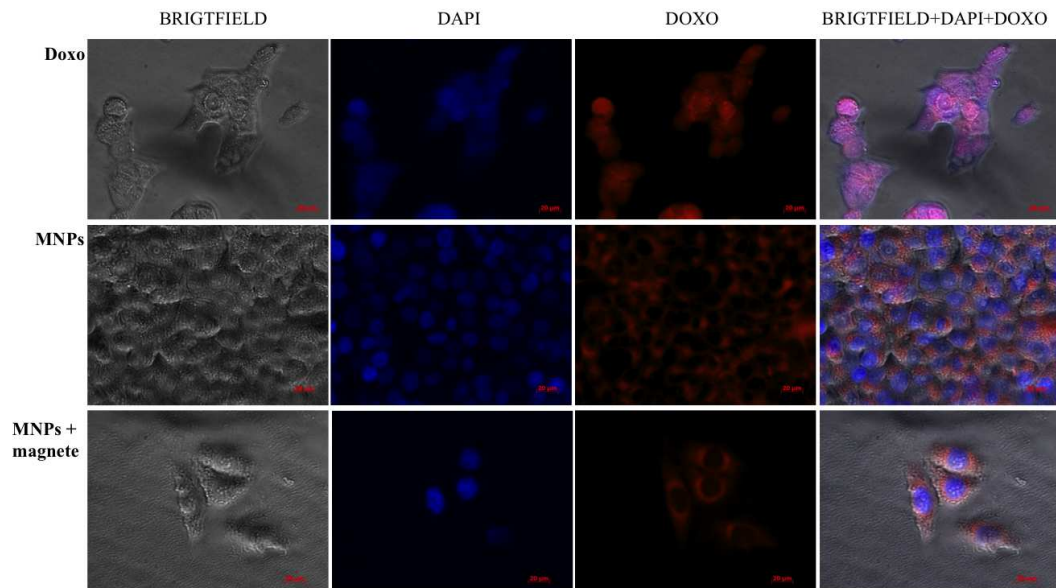


Figura 54. Immagini a fluorescenza (ingrandimento 40X) delle HCT116 incubate con Doxorubicina (DOXO), nanoparticelle magnetiche di Inu-EDA-Sq-PEG cariche di farmaco in assenza (MNPs-DOXO) e in presenza di un campo magnetico esterno (MNPs-DOXO), per 4 (a), 24 (b) e 48 (c) ore.

Come si può osservare, già dopo 4 ore di incubazione (54a) la Doxo, testata in forma libera, si accumula principalmente a livello dei nuclei delle cellule HCT116, mentre la fluorescenza in rosso della Doxo caricata all'interno delle nanoparticelle magnetiche, sia in presenza che in assenza di un campo magnetico esterno, è principalmente localizzata a livello del citoplasma cellulare. Dopo 24 e 48 ore di incubazione (54b-4c) anche i nuclei delle cellule trattate con le MNPs-

DOXO, cominciano a mostrare fluorescenza in rosso, soprattutto quando le cellule sono incubate in presenza del magnete esterno.

È interessante notare, come, dopo 4 ore di incubazione (54a) l'intensità di fluorescenza è maggiore nei campioni incubati con le MNPs-DOXO in presenza del magnete, piuttosto che nelle cellule incubate senza il magnete esterno. Inoltre, dopo 24 e 48 ore di incubazione (54b-54c) è possibile osservare come il numero di cellule è diminuito nei pozzetti delle cellule incubate con le MNPs-DOXO in presenza del magnete esterno. Tale risultato è in accordo con i dati ottenuti dagli studi di citotossicità. Pertanto, si può supporre che l'applicazione di un campo magnetico esterno aumenta l'uptake dei sistemi all'interno delle cellule; in tal modo una maggiore quantità di Doxo potrà raggiungere i nuclei delle cellule ed esplicare la propria azione citotossica.

10.CONCLUSIONI

Il concetto di drug delivery per mezzo di nanoparticelle magnetiche, trae beneficio dal fatto che la nanotecnologia ha raggiunto uno sviluppo tale da rendere possibile, non solo la produzione di nanoparticelle magnetiche con proprietà superparamagnetiche in un range molto stretto di dimensioni, ma anche di strutturare la superficie di queste particelle, per riuscire a trasferire farmaci in siti specifici.

Pertanto, allo scopo di ottenere sistemi magnetici di dimensione nanometrica in grado di veicolare farmaci attraverso l'applicazione di un campo magnetico, sono state realizzate nanoparticelle superparamagnetiche rivestite con un copolimero anfifilico a struttura poliasaccaridica.

Le nanoparticelle magnetiche sono state preparate anche in presenza del farmaco antitumorale Doxorubicina (Doxo), ottenendo una drug loading pari al 10% p/p. Le nanoparticelle magnetiche preparate (MNPs e MNPs-Doxo) sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico attraverso DLS, SEM e studi di rilascio del contenuto di Doxo; queste hanno dimensioni media di circa 50 nm con una ristretta distribuzione granulometrica e sono risultate in grado di rispondere ad un campo magnetico esterno, essendo attratte da quest'ultimo.

Studi in vitro su cellule di carcinoma del colon umane (HCT116) hanno mostrato che le nanoparticelle magnetiche di Inu-EDA-Sq-PEG non sono tossiche quando incubate sottoforma di nanoparticelle magnetiche vuote (MNPs), ma, quando caricate con Doxo, sono citotossiche sulla linea cellulare testata. Inoltre è stato visto che l'applicazione di un campo magnetico esterno non ha alcun effetto citotossico sulla linea cellulare testata.

Infine, gli studi di uptake in vitro hanno dimostrato che il sistema è in grado di veicolare la Doxo all'interno delle cellule. Per di più, attraverso microscopia a fluorescenza, è stato dimostrato che in presenza di un magnete esterno, si ha una maggiore internalizzazione di Doxo, con conseguente diminuzione della vitalità cellulare. Pertanto, i risultati ottenuti dimostrano l'utilità del *Targeting Magnetico* nell'incrementare l'efficienza dei sistemi, in quanto lo stesso effetto farmacologico è ottenibile impiegando una minore quantità di farmaco.

11.PARTE SPERIMENTALE

11.1 Materiali

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado analitico.

Sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia): acido D,L-aspartico, N,N-dimetilacetamide anidra (DMA-a), N,N-dimetilformamide anidra (DMF-a), Bis(4-nitrofenil)carbonato (BNPC), Polisorbato 80, pirene, D₂O (isotopo puro al 99.9%) dimetilsofossido deuterato (DMSO-d₆), N,N-dimetilformamide deuterata (DMF-d₇), 2-Bromoisobutirril bromuro (BIB), butil metacrilato (BMA), 2,2'-bipiridina (bpy, 99%), rame (I) bromuro (CuIBr 99.999%), dimetilacetammide (DMA), dimetilformammide (DMF), nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (Fe₃O₄) (SPIONs) (10 ± 1 nm) in toluene (magnetizzazione emu/g, a temperatura ambiente sotto 4500 Oe) [Le nanoparticelle secche di Fe₃O₄ sono state ottenute per evaporazione del toluene sotto vuoto da una miscela azeotropica con etanolo], nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (Fe₃O₄) (SPIONs) (10 ± 1 nm) in acqua, polivinil pirrolidone (PVP), gliceril monostearato, sodio dodecil solfato (SDS), flutamide (FLU) idrossiflutamide (FLU-OH), acido L-Ascorbico sale di sodio, ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis(fenil acido solfonico)-1,2,4-triazina), e neocuproina (2,9-dimetil(1,10-fenantrolina)), 1-1'carbonildiimidazolo (CDI), 6-dodecanoile-N,N-dimetil-2-naftilammina (Laurdan), poli (etilene glicole) bis (ammina) 2.000 Da (NH₂-PEG-NH₂), metossipoli-etilene glicole ammina 2000 Da (PEG-NH₂), la N-

idrossisulfosuccinimmide sale sodico (NHSS), 1-etil-3-[3-dimetilamminopropil], carbodiimmide cloridrato (EDC·HCl), Inulina estratta dai tuberi di dalia, N-idrossisuccinimmide (NHS), Sphadex G-25, Doxorubicina HCl, L-glutammina, Penicillina, Streptomicina, Amfotericina B. Sono state acquistate dalla Fluka (Italia): dimetilsolfossido anidro (DMSO-a), Dimetilacetammide anidra (DMA-a) etilendiamina (EDA), acido acetico, trietilammina (TEA), acido folico (FA), 4-(dimetilammino) piridina (DMAP), O'-metilpolietilenglicole 2000 (PEG₂₀₀₀), O-[2-(6-Oxocaproilamino)ethyl]-O'-methylpolyethylene glycol 2000 (PEG-aldeide) e gli standards di polietilenglicole per la SEC.

La Rivastigmina idrogenato è stata donata dalla Novartis Pharma AG (Svizzera).

Il derivato dello squaleno SqCHO C₁₇ è stato sintetizzato dal gruppo di ricerca del Professore Ceruti, presso l'università di Torino, attraverso una metodica già riportate in letteratura [Ceruti et al., 2005; Xiong et al., 2005].

Il derivato dello squalene SqCOOH C₂₇ è stato sintetizzati dal gruppo di ricerca del Professore Ceruti, presso l'università di Torino. In particolare, per la sintesi del nuovo derivato, l'1,1',2-tris-nor-squalene aldeide [Ceruti et al., 1993; Cattel et al., 1995; Viola et al., 2000] (1.58 g, 4.12 mmol) è stato solubilizzato in 20 ml di dietiletere a 0 °C. Separatamente, 2,3 ml di acido solforico e bicromato di potassio (1.21 g, 4.12 mmol) sono stato aggiunti, sotto continua agitazione, a 0 °C in 20 ml di acqua bidistillata, al fine di

ottenere l'acido cromico. Questo è stato aggiunto, in 20 minuti a 0 °C, alla soluzione di 1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide, precedentemente preparata, e la miscela è stata fatta reagire per 2 ore a 0°C sotto continua agitazione. La miscela di reazione è stata estratta 3 volte con 50 ml di etere etilico, lavata con una soluzione salina sature, seccata prima con solfato di sodio anidro e successivamente sotto vuoto. La reazione è stata seguita attraverso TLC su gel di silice, utilizzando come fase mobile una miscela costituita da etere di petrolio, etere etilico e metanolo (70:23:7). Il prodotto è stato purificato attraverso flash cromatografia, utilizzando come fase eluente prima etere di petrolio e poi una miscela costituita da etere di petrolio e etere etilico (95:5). Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 35% (p/p) rispetto al prodotto di partenza. Il derivato SqCOOH C₂₇ ottenuto è stato caratterizzato attraverso analisi ¹H NMR in CDCl₃, l'analisi ha evidenziato i seguenti segnali: δ, 1.55-1.63 (m, 18 H, CH₃ allilici), 1.90-2.05 (m, 16 H, CH₂ allilici), 2.26 (t, 2 H, CH₂CH₂COOH), 2.38 (t, 2 H, CH₂CH₂COOH), 5.00-5.19 (m, 5 H, CH vinilici), 12,20 (1 H, COOH).

Il D,L-poli(acido lattico) (PLA 8000 Da) è stato acquistato dalla Boehringer Ingelheim Pharma (Milano, Italia).

Glia standardi per la SEC di pullulano sono stati acquistati dalla Polymer Laboratories.

L'Alexa Fluor ® 647 (Alexa) è stata acquistata dalla Invitrogen.

Presso Carlo Erba Reagenti (Italia) è stato acquistato il tiocianato di potassio.

Il plasma umano è stato ottenuto da donatori volontari e sani.

Le linee cellulari di Neuro2a (neuroblastoma murino), LNCaP (adenocarcinoma prostatico metastatico umano) 16HBE (epitelio bronchiale umano), MCF7 (adenocarcinoma mammario umano) e HCT 116 (carcinoma di colon umane) sono state acquistate presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Italia).

I tubi da dialisi SpectraPor sono stati acquistati dallo Spectrum Laboratories, Inc. (Italia).

11.2 Metodi

L' α,β -poli-(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stato preparata mediante una reazione tra la polisuccinimmide (PSI) ed etanolamina in soluzione di DMF, purificata e caratterizzata secondo una procedura descritta in letteratura [Giammona *et al.*, 1987]. Il polimero ottenuto è stato isolato per filtrazione, lavato parecchie volte con acetone e seccato. Dopo solubilizzazione in acqua bidistillata il PHEA è stato ulteriormente purificato mediante dialisi esaustiva, utilizzando tubi da dialisi Spectra Por con cut-off pari a 12,000-14,000 Da. I risultati spettroscopici (FT-IR e $^1\text{H-NMR}$) sono risultati essere sovrapponibili ai precedenti risultati [Mendichi *et al.*, 2003].

I pesi molecolari medi ponderati (M_w) e i valori di polidispersità del PHEA, PHEA-PLA, PHEA-PLA-PEG, PHEA-PLA-Alexa e PHEA-PLA-PEG-FA, PHEA-IB-p(BMA) sono stati determinati mediante cromatografia ad

esclusione dimensionale (SEC) in mezzo organico. Il protocollo standard della SEC prevede l'utilizzo di una colonna Phenogel, acquistate dalla Phenomenx (10³R), collegata ad un rivelatore a indice di rifrazione Waters 2410. È stata utilizzata una soluzione di LiBr 0,1% in DMF come fase mobile; il flusso è stato impostato a 0,8 ml min⁻¹ e la temperatura a 50°C. La curva di calibrazione è stata ottenuta utilizzando standard di poli(ossido di etilene) con un range dimensionale compreso tra 274-0,5 kDa.

I pesi molecolari medi ponderati (Mw) e i valori di polidispersità dell'Inulina, INU-EDA, INU-EDA-Sq. INU-EDA-Sq-PEG sono stati determinati mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) utilizzando come fase mobile una miscela costituita da tampone fosfato a pH 6,5 e metanolo (9:1). Il protocollo standard della SEC prevede l' utilizzo di una colonna Phenogel, acquistate dalla Phenomenx (10³R), collegata ad un rivelatore a indice di rifrazione Waters 2410. Il flusso della fase mobile è stato impostato a 0,6 ml min⁻¹ e la temperatura a 35°C. La curva di calibrazione è stata ottenuta utilizzando standard di pullulano con un range dimensionale compreso tra 47,3-0,18 kDa.

Le centrifugazioni sono state eseguite utilizzando una centrifuga International Equipement Company Centra MP4R, dotata di un rotore 854 e di un dispositivo per il controllo della temperatura.

L'incubatore utilizzato per gli studi di rilascio è un Benchtop 808C Orbital Shaker modello 420.

Le misure dimensionali e di potenziale zeta sono state condotte utilizzando uno Zetasizer Nano ZS (Malver Instrument, Herrenberg, Germania). Tali misure sono state condotte ad angolo fisso di 173° e ad una temperatura di 25°C .

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati ottenuti mediante uno strumento Bruker-Avance II-300 (lavorando a 300 MHz).

Gli spettri FT-IR sono stati eseguiti in pellets di KBr nel range di 4000-400 cm^{-1} usando uno spettrometro FT-IR Perkin-Elmer 1720 a trasformata di Fourier, con una risoluzione di 1 cm^{-1} e un numero di scansioni pari a 100.

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro RF-5301PC (Shimadzu, Italia), con apertura di 3 mm, in un range pari a 300-360 nm, impostando una lunghezza d'onda di emissione a 373 nm e di eccitazione di 333nm.

Le analisi di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) sono state condotte utilizzando un cromatografo Waters Breexe System Liquid dotato di un Autocampionatore Waters 717 Plus (50 μl volume di iniezione), e un rivelatore HPLC Shimadzu UV-VIS in linea con una stazione di lavoro computerizzata. Come colonna è stata usata una fase inversa Gemini C18 Phenomenex (5 μm , $4,6 \times 250$ mm di colonna con una precolonna H5ODS-10CS).

Le analisi UV sono state condotte usando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2401.

La compatibilità cellulare dei vari sistemi ottenuti è stata testata *in vitro* su diverse linee cellulari tra cui: cellule di neuroblastoma murino (Neuro2a), cellule di adenocarcinoma prostatico metastatico umano (LNCaP), cellule di epitelio bronchiale umano (16HBE), e cellule di adenocarcinoma mammario umano (MCF7), mediante il saggio MTS, utilizzando un kit commerciale acquistato dalla Promega (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay).

Il saggio MTS è basato sulla capacità delle cellule vitali di metabolizzare, grazie alla succinato deidrogenasi mitocondriale, il sale giallo di tetrazolio (MTS), in presenza di fenazina metosulfonato (PMS) come accettore di elettroni, in formazano color porpora direttamente solubile nel mezzo di coltura. Tale capacità, che è proporzionale al numero di cellule vitali, è stata misurata a 490 nm usando un microplate reader Thermo (Thermo, UK).

Gli stidi di uptake al microscopio confocale sono stati effettuati utilizzando un microscopio confocale a scansione laser Leica RCS SP5 con un obiettivo 63x ad olio, NA = 1.4 (Leica Microsystems, Germania).

Gli studi di uptake in fluorescenza sono stati effettuate utilizzando un microscopio Zeiss Axio Vert.A1, Inverted Microscope, mentre le immagini sono state acquisite con una fotocamera Axio Cam MRm.

11.3 Sintesi del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀

La sintesi del PHEA-EDA è stata eseguita secondo una procedura già descritta in letteratura (*Licciardi et al.*, 2006). Brevemente, 83 mg ml⁻¹ di PHEA sono stati solubilizzati in DMF-a; la soluzione ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di BNPC (120 mg ml⁻¹) in DMF-a, e la soluzione finale è stata posta a reagire per 1 ora a 40°C. Successivamente, è stata aggiunta l'EDA (1 ml), e la soluzione finale è stata mantenuta sotto agitazione per 4 ore a 25°C. Le quantità di BNPC e di EDA utilizzate in questa reazione, sono state calcolate in accordo con l'equazioni: moli di BNPC/moli di unità ripetitive di PHEA=1 e moli di EDA/moli di BNPC=5

La miscela di reazione è stata purificata e caratterizzata secondo una procedura già descritta in letteratura (*Licciardi M et al.*, 2006). Il PHEA-EDA è stato ottenuto con una resa del 97% (p/p) rispetto alla quantità di PHEA di partenza. Il grado di derivatizzazione in EDA (DD_{EDA}), espresso come valore medio di tre determinazioni, è stato determinato attraverso analisi ¹H-NMR in D₂O ed è risultato essere pari a 30,0 ± 0,5 mol%.

Per la sintesi del copolimero PHEA-EDA-Sq [*Ognibene et al.*, 2011], una soluzione di aldeide squalenica (SqCHO) in acido acetico/DMF-a (10 vol%) (10 mg ml⁻¹), la cui sintesi è stata già riportata [*Xiong et al.*, 2005; *Ceruti et al.*, 2005], è stata aggiunta ad una soluzione di PHEA-EDA (33 mg ml⁻¹) in DMF-a e messa a reagire per 4 ore a 25°C. La quantità di SqCHO è stata

calcolata secondo l'equazione: moli di SqCHO/moli di gruppi-NH₂ del PHEA-EDA=0,1.

Il copolimero ottenuto è stato precipitato in etere etilico; il solido, recuperato mediante centrifugazione (15 minuti, 11 800 rpm, 4°C), è stato lavato quattro volte con lo stesso solvente e, infine, una volta in acetone. In seguito, il copolimero PHEA-EDA-Sq è stato seccato a pressione ridotta, solubilizzato in acqua distillata e purificato attraverso dialisi, utilizzando membrane da dialisi Spectra Por con esclusione di peso molecolare 12.000-14.000 Da. Dopo la dialisi, il copolimero PHEA-EDA-Sq è stato seccato attraverso freeze-drying. La resa del copolimero PHEA-EDA-Sq è risultata essere pari al 90% (p/p) rispetto al copolimero PHEA-EDA di partenza. Il grado di derivatizzazione del PHEA-EDA-Sq in Sq (DD_{Sq}), espresso come valore medio di tre determinazioni, è stato determinato attraverso analisi ¹H-NMR in DMSO-d₆ ed è risultato essere pari a 3 ± 0,3 mol%.

La sintesi del PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ è stata eseguita secondo una procedura già descritta in letteratura[Craparo *et al.*, 2008]. Brevemente, il PS₈₀ è stato attivato con BNPC, 267 mg ml⁻¹ di PS₈₀ e 62 mg ml⁻¹ BNPC sono stati solubilizzati in 0,8 ml di DMA-a; la miscela ottenuta è stata messa a reagire per 3 ore a 10°C. Al termine del tempo previsto, è stata aggiunta goccia a goccia la soluzione di PHEA-EDA-Sq in DMAa/DMSOa (4:1), e la soluzione finale è stata mantenuta sotto agitazione per 3 ore a 25°C e tutta la notte a 20°C. La miscela di reazione è stata purificata e caratterizzata seguendo una

procedura già riportata in letteratura. Le quantità di BNPC e di PS₈₀ utilizzate in questa reazione sono state calcolate in accordo con l'equazioni: moli di BNPC/moli di PS₈₀=1 e moli di PS₈₀/moli di di gruppi-NH₂ liberi nel PHEA=1.

Il copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ è stato ottenuto con una resa dell'85% rispetto al copolimero PHEA-EDA-Sq di partenza. Il grado di derivatizzazione del PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ in PS₈₀ (DD_{PS80}) espresso come valore medio di tre determinazioni, è stato determinato attraverso analisi ¹H-NMR in D₂O ed è risultato essere pari a 1,2 ± 0.03 mol%.

11.3.1 Preparazione delle micelle polimeriche caricate con Rivastigmina

La Rivastigmina base libera (Riv) è stata ottenuta aggiungendo ad una soluzione acquosa di Rivastigmina idrogenotartrato (Riv-ht) (20 mg ml⁻¹) NaOH 1 N fino a pH=9. Dopo 30 minuti, il farmaco è stato estratto dalla fase acquosa trattando per cinque volte con 20 ml di CH₂Cl₂ ed essiccando al rotavapor. Il prodotto è stato analizzato attraverso ¹H-NMR e UV. I dati analitici e gli spettri sono in accordo con i dati teorici.

La Riv è stata caricata all'interno delle micelle polimeriche mescolando un'appropriata quantità del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ (40 mg) e la Riv (10 mg) allo stato solido, in modo da ottenere un rapporto in peso pari a 4:1; successivamente, la miscela solida è stata solubilizzata in 1 ml di DMF,

solvente in cui sia il farmaco che il copolimero sono solubili. La miscela è stata seccata a pressione ridotta al fine di ottenere un residuo solido. La progressiva aggiunta di aliquote di acqua (fino ad un volume finale di 5 ml), determina l'auto-assemblaggio del copolimero anfifilico in aggregati micellari e l'incorporazione del farmaco idrofobico all'interno del core micellare. La dispersione ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione per tutta la notte; l'eccesso di Riv è stato rimosso dal sistema filtrando la dispersione con un filtro di cellulosa acetato (0.45 μ m) ed infine la dispersione è stata seccata mediante freeze-drying. Le micelle sono state ottenute con una resa dell'85% (p/p) rispetto ai prodotti di partenza. La capacità delle micelle di incorporare la Riv è stata valutata attraverso analisi HPLC. L'analisi HPLC è stata condotta su una colonna C₁₈ a fase inversa con una soluzione acquosa di sodio eptano solfato (SH) 0,01 M/CH₃CN (70:30) come fase mobile e velocità di flusso costante 1,0 ml min⁻¹ (Rao et al., 2005). L'eluato è stato monitorato a 217 nm e la quantificazione del farmaco effettuata mediante il confronto con una curva standard (ottenuta precedentemente da una soluzione di solo farmaco a concentrazione nota). Per l'analisi, 5 mg di micelle di PHEA-EDA-Sq₁₇-PS₈₀ cariche di farmaco (Riv-micelle) sono state solubilizzate in 1 ml di fase mobile, la soluzione è stata filtrata con filtri RC da 0,2 μ m e 50 μ l di tale soluzione sono stati analizzati attraverso analisi HPLC.

Le micelle di PHEA-EDA-Sq₁₇-PS₈₀ senza farmaco sono state preparate alla stessa maniera di quelle cariche di farmaco.

11.3.2 Determinazione delle concentrazione critica di aggregazione

La concentrazione critica di aggregazione (CAC) del PHEA-EDA-Sq₁₇-PS₈₀ è stata determinata attraverso misure di fluorescenza in presenza di pirene.

Inizialmente, è stata preparata una soluzione di pirene in acetone (6.0×10^{-5} M), ed in seguito, aliquote di 20 μ l di tale soluzione sono state poste in vials e poste ad evaporare per 30 minuti in orbital shaker a 37°C al fine di rimuovere l'acetone in esse contenute. Al residuo solido di pirene sono stati aggiunti 2 ml di dispersioni acquose del copolimero PHEA-EDA-Sq-PS₈₀, a concentrazioni comprese in un range che va da 1×10^{-9} a 1 mg ml⁻¹. La concentrazione finale di pirene in ogni campione è così uguale a 6.0×10^{-7} M. Le soluzioni sono state mantenute per 1 ore a 37°C sotto continua agitazione, all'interno dell'orbital shaker, al fine di equilibrare il pirene con le micelle. Gli spettri di eccitazione e di emissione del pirene sono stati registrati a 25°C ad una lunghezza d'onda di emissione di 373 nm e una lunghezza d'onda di eccitazione di 333 nm.

11.3.3 Caratterizzazione delle micelle: determinazione delle dimensioni e del potenziale zeta

Le misure del diametro medio e dell'indice di polidispersità (PDI) sono state determinate mediante Dynamic Light Scattering (DLS), utilizzato un Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument, Malvern, UK).

Le misure del diametro medio, indice di polidispersità (PDI) e del potenziale zeta delle micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ vuote e cariche di farmaco sono state condotte su dispersioni di copolimeri in acqua bidistillata a concentrazione pari a 0,2 mg ml⁻¹. Ogni dispersione è stata filtrata con filtri in RC da 0,2 µm posta all'interno di una cuvette e analizzata in triplicato.

Il diametro idrodinamico medio e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti mediante analisi cumulative della funzione di correlazione. Il potenziale zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione Smoluchowsky e supponendo che $K \cdot a \gg 1$ (dove K e a sono, rispettivamente, il parametro Debye-Hückel e il raggio della particella).

11.3.4 Studi di biocompatibilità

La citotossicità delle micelle polimeriche di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ vuote e cariche di farmaco è stata valutata sulla linea cellulare di neuroblastoma murino (Neuro2a) mediante il saggio MTS.

La linea cellulare Neuro2a è stata mantenuta nel Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (arricchito con il 10 % v/v di siero bovino fetale (FBS), 2mM L-glutamina, 100 U ml⁻¹ di penicillina e 100 µg ml⁻¹ di streptomina) in fiasche di coltura di 25 cm² ed incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂.

Un volume di 100 μl di Neuro2a, sospese ad una densità di $2,5 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} , è stato trasferito in una piastra a 96 pozzetti ed incubato a 37°C per 24 ore in atmosfera contenente il 5% di CO_2 . Successivamente, il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente una dispersione di micelle polimeriche cariche di farmaco (la concentrazione delle micelle è tale da avere una concentrazione di farmaco pari a 0,1-0,2-0,05 mg ml^{-1}). Le cellule incubate con il solo mezzo disperdente sono state usate come controllo negativo, mentre, cellule trattate con una soluzione di Riv in DMSO, con una concentrazione in Riv pari a 0,1-0,2-0,05 mg ml^{-1} , sono state usate come controllo positivo.

Dopo 6, 24 e 48 ore di incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito con 100 μl di mezzo fresco, e 20 μl di una soluzione di MTS sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. Le piastre sono state incubate per altre 2 ore a 37°C . L'assorbanza a 490 nm è stata registrata usando un lettore Microplate (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

11.3.5 Studi di uptake

Le cellule Neuro2a sono state sospese nel mezzo DMEM, arricchito con il 10% di siero bovino fetale (FBS), 2mM L-glutamina, 1% di penicillina/streptomicina (100 U ml^{-1} di penicillina e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di streptomicina). Le cellule sono state piastrate con una densità di 5×10^5 cellule/pozzetto su piastre a 24 pozzetti per 24 ore a 37°C in atmosfera

contenente il 5 % di CO₂. Dopo 24 ore il mezzo è stato rimosso è sostituito con mezzo fresco contenente una dispersione di micelle polimeriche cariche di farmaco e con farmaco libero, al fine di ottenere una concentrazione finale di farmaco pari a 0,1-0,2 e 0,05 mg ml⁻¹, ed incubate per 6 ore. Trascorso il tempo di incubazione, il mezzo è stato rimosso, le cellule sono state lavate due volte con Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) e trattate con un appropriato volume di CellLytic MT reagent. Dopo 15 minuti di incubazione, le cellule sono state raschiate e il lisato cellulare raccolto e seccato attraverso freeze drying. L'uptake del farmaco è stato quantificato analizzando il lisato cellulare attraverso analisi HPLC, dopo ridispersione in acqua bidistillata.

11.3.6 Studi di stabilità in plasma umano

La stabilità della Riv e della Riv caricata all'interno delle micelle polimeriche di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ è stata valutata incubando i campioni con plasma umano a 37°C. Sono state preparate sei sospensioni, tre contenenti 2 mg di micelle di PHEA-EDA-Sq-PS₈₀ cariche di Riv in 1 ml di plasma umano, e tre contenenti Riv libera in 1 ml di plasma umano alla concentrazione di 0.4 mg ml⁻¹. Le sospensioni sono state mantenute sotto continua agitazione a 37°C all'interno dell'orbital shaker. A tempi stabiliti (6, 24, 48 ore) sono stati aggiunti 2 ml di acido trifluoroacetico al 10% (v/v), al fine di precipitare le proteine plasmatiche. Successivamente, la miscela è stata centrifugata a 9800 rpm per 5 minuti a 4°C. Quindi, il surnatante è stato filtrato con filtri RC da

0,2 μm e analizzato mediante analisi HPLC. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

11.4 Sintesi del copolimero PHEA-IB-p(BMA)

La derivatizzazione del PHEA con il 2-bromoisobutirril bromuro (BIB) al fine di ottenere il macroiniziatore multifunzionale PHEA-BIB è stata eseguita usando un protocollo già descritto in letteratura [Cavallaro *et al.*, 2009]. Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 95% (p/p), rispetto al polimero di partenza PHEA. Il grado di derivatizzazione (DD_{BIB}), determinato mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ in D_2O è stato calcolato secondo una procedura descritta in letteratura [Cavallaro *et al.*, 2009], ed è risultato essere pari al 30% in moli.

La reazione di polimerizzazione radicalica controllata mediante *Atom transfer radical polymerization* (ATRP) del monomero butil metacrilato, usando come macroiniziatore il PHEA-BIB è stata condotta seguendo una procedura descritta in letteratura [Cavallaro *et al.*, 2009], modificando alcuni parametri di reazione.

Brevemente, la sintesi del PHEA-IB-p(BMA) è stata condotta sotto gorgogliamento di argon in un pallone a tre colli. Il PHEA-BIB è stato solubilizzato nella miscela solvente DMF/MeOH 1:1 (v/v) precedentemente degassata; alla soluzione è stata aggiunta un'opportuna quantità di butil metacrilato precedentemente distillata (equivalente alle moli dei residui di BIB), il catalizzatore Cu(I)Br (25,5 mg, equivalente alle moli dei residui di BIB), il ligando bpy (101 mg, pari a quattro volte le moli dei residui di BIB)

sempre sotto continua agitazione e sotto continuo gorgogliamento di argon. La reazione è stata condotta usando un bagno ad acqua termostato a 50°C sotto continua agitazione ed in presenza di argon per 24 ore. La polimerizzazione è stata interrotta ponendo la miscela di reazione a contatto con l'aria fino alla completa ossidazione del rame; quest'ultima è stata quindi precipitata goccia a goccia in acqua bidistillata e il residuo solido lavato due volte in miscela acqua/metanolo (1:1). Il residuo di colore bianco, ottenuto dopo centrifugazione, è stato sospeso in acqua bi-distillata e la sospensione purificata mediante dialisi esaustiva utilizzando membrane da dialisi SpectraPor con cut-off del peso molecolare 12.000-14.000. In seguito, la sospensione è stata liofilizzata e il prodotto puro ottenuto caratterizzato tramite $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$. I dati spettroscopici ottenuti sono risultati essere sovrapponibili ai precedenti risultati riportati in letteratura [Cavallaro *et al.*, 2009]. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO, 25°C) del PHEA-IB-p(BMA) mostra i picchi a δ : 0.77 (m, 3H, CH_3)_{BMA}, 0.90 (m, 3H, CH_3)_{BMA}, 1.29 (m, 6H, CH_3)_{IB}, 1.36 (m, 2H, CH_2)_{BMA}, 1.56 (m, 2H, CH_2)_{BMA}, 1.88 (s, 6H, CH_3)_{BIB}, 2.70 (m, 2H, CH_2)_{PHEA}, 3.16 (m, 2H, CH_2)_{PHEA}, 3.41 (m, 2H, CH_2)_{PHEA}, 3.90 (m, 2H, CH_2)_{PHEA}, 4.13 (m, 2H, CH_2)_{PHEA}, 4.59 (m, 1H, CH)_{PHEA}.

11.4.1 Preparazione delle nanoparticelle superparamagnetiche (MNPs) di PHEA-IB-p(BMA)

Le nanoparticelle superparamagnetiche (MNPs) sono state ottenute a partire dal copolimero graft PHEA-IB-p(BMA), attraverso il metodo di omogeneizzazione ed evaporazione del solvente.

Innanzitutto è stato necessario preparare una fase organica disperdendo il copolimero graft PHEA-IB-p(BMA) (40 mg ml^{-1}) in 1 ml di cloroformio, contenente 40 mg di gliceril monostearato e 5 mg di nanoparticelle superparamagnetiche di Fe_3O_4 di 10 nm, stabilizzate con SDS.

La fase organica ottenuta, è stata aggiunta goccia a goccia a 50 ml di una fase acquosa, contenente polivinilpirrolidone (1,5% p/v) e Pluronic F68 (0,25% p/v), ottenendo un'emulsione primaria stabile o/w attraverso l'uso di un Ultra-Turrax (T 25, Janke & Kunkel Ika–Labortchnik) con una agitazione di 24.000 rpm per 20 minuti. La temperatura è stata mantenuta vicina ai 3°C per mezzo di un bagno di ghiaccio. Questa emulsione è stata rotta tramite evaporazione della fase organica a pressione ridotta e a temperatura ambiente. Come conseguenza di questa estrazione sono state ottenute nanoparticelle solide. La sospensione di nanoparticelle è stata quindi purificata tramite dialisi esaustiva contro acqua bidistillata per 48 ore, usando membrane da dialisi con un cut-off di 100 kDa. Infine, le nanoparticelle sono state essiccate mediante freeze-drying.

Una procedura analoga è stata utilizzata per la preparazione di nanoparticelle magnetiche caricate con flutamide (FLU-MNPs) e nanoparticelle non magnetiche caricate con flutamide (FLU-NPs). In questo caso la flutamide (180 mg) è stata dispersa in 1 ml di cloroformio e questa soluzione è stata aggiunta alla fase organica polimerica prima di ottenere la microemulsione primaria.

11.4.2 Caratterizzazione delle MNPs

Analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

La dispersione acquosa di nanoparticelle, in acqua distillata, è stata posta su una griglia di rame e i campioni sono stati lasciati seccare spontaneamente a temperatura ambiente per tutta la notte. I campioni sono stati analizzati usando un microscopio elettronico a trasmissione JEM-2100 LaB₆, operante a un voltaggio accelerato di 200 kV, fornito di una fotocamera Multi Scan CCD allo scopo di valutare le dimensioni e la forma delle nanoparticelle.

Determinazione del ferro totale

Il contenuto di ferro nelle nanoparticelle è stato determinato attraverso analisi spettrofotometrica usando un metodo, già riportato in letteratura, basato sulla formazione del complesso ferro-ione tiocianato intensamente colorato [*Gupta and Gupta 2005a*]. Inizialmente, il ferro presente nelle nanoparticelle è stato estratto disperdendo 5 mg di nanoparticelle in 1 ml di HCl al 30% v/v per 2

ore a 60°C. In seguito, 0,1 ml di soluzione acquosa di perossido di idrogeno (H₂O₂) (35% p/p) sono stati aggiunti al fine di ossidare gli ioni ferrosi (Fe²⁺), presenti nella soluzione sopra indicata, a ioni ferrici (Fe³⁺). Infine, a questa soluzione sono stati aggiunti 1,5 ml di una soluzione di tiocianato di potassio 0,1 M al fine di formare il complesso ferro-tiocianato intensamente colorato di rosso. La concentrazione di ferro è stata determinata misurando l'assorbanza a 478 nm. La curva di calibrazione è stata ottenuta usando soluzioni standard di nanoparticelle di Fe₃O₄.

FT-IR

Studi sulla composizione generale delle nanoparticelle di ossido di ferro rivestite con il polimero sono stati effettuati tramite spettroscopia infrarossa (FT-IR). Gli spettri del copolimero PHEA-IB-p(BMA), delle nanoparticelle di Fe₃O₄ rivestite con il copolimero e delle nanoparticelle solide di ossido di ferro, sono stati registrati in KBr nel range di frequenza 4000-400 cm⁻¹. Gli spettri sono stati registrati in scala di trasmittanza (% T) con una risoluzione di 1 cm⁻¹ e un numero di scansioni pari a 100.

Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e del potenziale zeta

Gli studi di DLS e le misurazioni del potenziale zeta (mV) sono state condotte a 25° C usando uno strumento Nano ZS Malvern Zetasizer. La dispersione acquosa di ciascun campione di nanoparticelle, preparata in acqua bidistillata

con una concentrazione finale di $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$, è stata analizzata dopo filtrazione attraverso filtri di membrana di cellulosa di $5 \mu\text{m}$. Il diametro idrodinamico medio e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti mediante analisi cumulative della funzione di correlazione. Il potenziale zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione Smoluchowsky e supponendo che $K \cdot a \gg 1$ (dove K e a sono, rispettivamente, il parametro Debye-Hückel e il raggio della particella).

Proprietà magnetiche

Le misure di magnetizzazione sono state eseguite in funzione della temperatura e del campo magnetico applicato usando due magneti commerciali SQUIDD (Cryogenic Ltd. S600 and Quantum Design MPMS), operanti nel range di temperature 1,8 K - 350 K con un campo applicato fino a 6,5 T.

Le misure sono state effettuate sia sui i campioni liofilizzati sia sulla dispersione acquosa di nanoparticelle (1% p/p di magnetite). Tutti i dati ottenuti sono stati corretti in base alle proprietà magnetiche del campione controllo, il quale è stato misurato separatamente, e in base al contributo diamagnetico dell'acqua. La dipendenza della magnetizzazione dalla temperatura è stata misurata con un campo magnetico applicato di $\mu_0 H = 5 \text{ mT}$, in un range di temperatura di 5-300 K, dopo le procedure di *zero field cooling* (ZFC) e di *field cooling* (FC). Le curve ZFC sono state ottenute dopo il

raffreddamento dei campioni fino a temperatura iniziale (5 K) in assenza di un campo magnetico esterno. Al contrario, le curve FC sono state ottenute dai campioni raffreddati da 300 a 5 K e applicando un campo magnetico esterno di 5 mT.

11.4.3 Determinazione della quantità di farmaco incorporato all'interno delle nanoparticelle magnetiche e studi di rilascio del farmaco

La quantità di flutamide (FLU) caricata all'interno delle nanoparticelle di FLU-MNPs e FLU-NPs è stata determinata mediante analisi HPLC. La fase mobile usata è una miscela di: acido acetico / H₂O / trietilammina / metanolo (38/1/0,02/61), il flusso di 1 ml min⁻¹. Prima dell'analisi, il farmaco è stato estratto disperdendo una quantità nota di campioni di nanoparticelle in metanolo. Per determinare la quantità del farmaco è stata utilizzata una curva di calibrazione ottenuta utilizzando standard di FLU.

Allo scopo di valutare la capacità dei sistemi ottenuti di rilasciare il farmaco incorporato, aliquote di 5 mg di FLU-MNPs e FLU-NPs e FLU da sola (come controllo positivo) sono state disperse in 20 ml di acqua bidistillata e trasferite all'interno di una membrana da dialisi Spectra/Por (MWCO 12.000-14.000 Da). La dialisi è stata immersa in tampone fosfato (PBS) a pH 7,4 (80 ml) e incubata a 37° C sotto continua agitazione (100 rpm) in un incubatore. A intervalli di tempo programmati, sono state prelevate dall'esterno della

membrana da dialisi aliquote di mezzo esterno (1 ml) e sostituite con una quantità uguale di mezzo fresco. I campioni prelevati sono stati analizzati attraverso HPLC al fine di determinare la quantità di farmaco rilasciata. I dati sono stati corretti tenendo in considerazione la procedura di diluizione. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e i risultati si sono rivelati conformi all'errore standard $\pm 5\%$.

11.4.4 Studi di citotossicità in vitro e uptake cellulare delle nanoparticelle magnetiche caricate con farmaco

Test di citotossicità

Le cellule di adenocarcinoma prostatico metastatico umano (LNCaP) sono state sospese in un mezzo RPMI 1640 arricchito con il 5% di siero bovino fetale (FBS), 1 mM di piruvato di sodio, 1 mM di glutammina e l'1% di antibiotici (50 mg ml⁻¹ di penicillina e 50 mg ml⁻¹ di streptomina), e incubate a 37° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Per gli esperimenti condotti in presenza di diidrotestosterone (DHT), il siero bovino fetale è stato privato degli steroidi (ZSD), utilizzando dunque, al posto di FBS, un siero di origine bovina modificato per uso commerciale. Negli ZSD la concentrazione di steroidi è ridotta, attraverso filtrazione su carbone attivo, di circa 20 volte rispetto al normale FBS. Per gli esperimenti in presenza dello steroide DHT, le cellule LNCaP sono state fatte crescere in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 1x10⁵ cellule ml⁻¹ in RPMI-1640 con il 5% (v/v) di

ZDS per 96 ore. Dopo 96 ore di crescita cellulare, il mezzo è stato sostituito con RPMI-1640 con il 5% (v/v) di ZDS e le cellule sono state incubate con differenti campioni, quali il DHT (10^{-7} e 10^{-8} M), nanoparticelle magnetiche senza farmaco (MNPs) e nanoparticelle magnetiche cariche di farmaco (FLU-MNPs) a due concentrazioni, corrispondenti alla quantità di nanoparticelle che, disperse nel mezzo, darebbe una concentrazione di farmaco pari a 34 o 100 μ M. Inoltre, le cellule LNCaP sono state co-trattate con DHT (10^{-7} e 10^{-8} M) e flutamide (FLU) a concentrazione di 10 μ M, corrispondente alla massima solubilità del farmaco nel mezzo acquoso.

I campioni di FLU, FLU-MNPs e MNPs sono stati dispersi in PBS pH 7.4, mentre DHT è stato disperso in DMSO. Le cellule non trattate o trattate con DMSO sono state usate come controllo. Il tempo di incubazione per tutti gli esperimenti è stato di 72 ore. Trascorso il tempo di incubazione la vitalità cellulare è stata valutata attraverso il saggio MTS; in particolare, dopo il tempo di incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito con 100 μ l di mezzo fresco e 20 μ l della soluzione MTS sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Le piastre sono state incubate a 37° C per 4 ore. L'assorbanza è stata letta a 490 nm sul lettore Microplate. I risultati sono stati espressi come riduzione della vitalità cellulare rispetto al controllo.

Tutti gli esperimenti di coltura cellulare sono stati ripetuti almeno tre volte e ciascun esperimento è stato eseguito in triplicato.

Studi di uptake cellulare

Le cellule LNCaP sono state sospese nel mezzo DMEM contenente il 10% (v/v) di FBS, 1 mM di glutammica, 1% di antibiotici (10.000 U ml⁻¹ penicillina, 10 mg ml⁻¹ di streptomina) e 2% amfotericina B (0,25 mg ml⁻¹), incubate a 37° C in atmosfera umidificata e in aria al 5% di CO₂, e incubate ad una densità di 1x10⁵ cellule per pozzetto in piastre a 96 pozzetti per 96 ore. Dopo 96 ore il mezzo è stato sostituito con 200 µl di DMEM contenente differenti quantità di FLU-MNPs (la concentrazione di nanoparticelle per pozzetto è compresa tra 0,09 e 0,61 mg ml⁻¹) e le cellule sono state incubate per 4, 24 e 48 ore. Trascorso il periodo di incubazione, il mezzo è stato allontanato e il monostrato di cellule è stato lavato due volte con DPBS. Il monostrato di cellule è stato poi trattato con un volume appropriato (200 µl) di acqua bi distillata, al fine di lisarle. Dopo 30 minuti di incubazione le cellule sono state raschiate e il lisato cellulare è stato raccolto in Eppendorf. Per la determinazione del ferro, aliquote di lisati cellulari (100 µl) sono state poste in provette pyrex e miscelate con 100 µl di una soluzione di HCl 1,4 M. Queste miscele sono state incubate per 2 ore a 60°C all'interno di un bagno di acqua e poi lasciate raffreddare a temperatura ambiente. In seguito sono stati aggiunti a ciascuna provetta: 140 µl di soluzione NaOH 1 M, 100 µl di tampone acetato a pH 4,5 ed infine 50 µl di reattivo di rilevamento del ferro

(6,5 mM ferrozina, 6,5 neocuproina mM e 1 M acido ascorbico dispersi in tampone acetato a pH 4,5). Dopo 10 minuti, sono stati prelevati 200 µl da ciascuna soluzione campione e trasferiti all'interno dei pozzetti di una piastra a 96 pozzetti e l'assorbanza è stata misurata a 560 nm su un lettore per Microplate. Il contenuto di ferro del campione è stato calcolato per confronto con una curva di calibrazione ottenuta mediante registrazione dell'assorbanza degli standards preparati in modo simile a quello dei campioni dei lisati cellulari (miscela di 20-100 µl di soluzioni standard di FeCl₃ (0,05 0,5 e 5 µg ml⁻¹) in HCl 1,4 M, e 50 µl di reattivo di rilevamento). La concentrazione del ferro intracellulare, di ogni lisato cellulare determinata per ciascun pozzetto, è stata corretta in riferimento al bianco e rapportata al numero di cellule per pozzetto.

La quantità di farmaco incorporata è stata determinata attraverso analisi HPLC, analizzando il lisato cellulare e il mezzo di lavaggio. Tutti gli esperimenti di coltura cellulare sono stati ripetuti almeno tre volte e ciascun esperimento è stato eseguito in triplicato.

11.4.5 Esperimenti in vivo

Per gli studi in vivo sono stati utilizzati ratti maschi sani SPF Wistar (300-350 g di peso corporeo) ottenuti dall'Istituto Zooprofilattico della Sicilia, Palermo, Italia. Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati condotti secondo i protocolli approvati dal Comitato Nazionale di Bioetica.

I ratti sono stati anestetizzati per inalazione di alotano all'1%. Su un gruppo di ratti, è stato fissato saldamente un magnete cubico permanente ($0,5 \text{ cm}^3$), con una densità di flusso magnetico massimo di 0,3 T, in prossimità della regione addominale, molto vicino al sito di somministrazione (sistema urinario), per mezzo di un mastice biocompatibile etil-2-cianoacrilato (EPIGLU®, Meyer-Haake).

Sono stati lentamente iniettati per via intraperitoneale volumi di 0,25 ml di dispersioni isotoniche contenenti 20 mg ml^{-1} (circa 15 mg kg^{-1}) di FLU-MNPs o FLU-NPs. I ratti sono stati sacrificati 24 o 48 ore dopo la somministrazione delle nanoparticelle, previa anestesia, tramite somministrazione intraperitoneale di ketamina (100 mg kg^{-1}).

Subito dopo il sacrificio degli animali è stato raccolto un campione di sangue e prelevati gli organi principali (polmoni, fegato, reni, milza e cervello); quest'ultimi sono stati lavati due volte con soluzione fisiologica e liofilizzati. I campioni di sangue sono stati centrifugati e il plasma è stato raccolto in una provetta da centrifuga sterile.

Determinazione della FLU, FLU-OH e ossido di ferro dagli organi di ratto

Per la determinazione del farmaco, gli organi liofilizzati e il plasma sono stati omogeneizzati (per 15 minuti, a 24000 rpm) in presenza di metanolo per HPLC (10 o 20 ml in funzione del peso dell'organo) e le sospensioni degli

organi sono state centrifugate a 9800 rpm per 10 minuti. I surnatanti sono stati raccolti e concentrati sottovuoto fino ad un volume finale di 1 ml. La FLU e il suo metabolita FLU-OH sono stati quantizzati mediante analisi HPLC, l'eluato è stato monitorato a 250 nm. La fase mobile usata è costituita da una miscela MeOH/PBS (80:20) a pH=8,7, con un flusso di 1 ml min^{-1} .

Per la determinazione del ferro, le nanoparticelle magnetiche sono state dapprima estratte dalla sospensione dell'organo utilizzando un magnete permanente esterno applicato al fondo della provetta per 96 ore. L'organo omogeneizzato è stato poi eliminato e le nanoparticelle magnetiche rimaste adese alla parete del tubo sono state completamente disperse in 2 ml di HCl al 30% (v/v) e incubate per 2 ore a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Successivamente, le soluzioni ottenute sono state trattate per tutta la notte con 0,1 ml di soluzione di H_2O_2 (35% p/p) al fine di ossidare tutti gli ioni ferrosi e per decolorare la dispersione, contenente ancora residui di omogeneizzato di organo. Successivamente, 2 ml di soluzione di tiocianato di potassio 0,1 M sono stati aggiunti alla suddetta soluzione per formare il complesso ferro-tiocianato di colore rosso. La concentrazione di ferro è stata determinata registrando l'assorbanza a 478 nm. La curva di calibrazione è stata ottenuta usando soluzioni standard di nanoparticelle di Fe_3O_4 .

11.5 Sintesi del copolimero NH₂-PEG-FA

Per sintetizzare dell'NH₂-PEG-FA, 250 mg di NH₂-PEG-NH₂ sono stati solubilizzati in 5 ml di acqua bidistillata e il pH di questa soluzione è risultato essere pari a 8,5. Successivamente, a tale soluzione sono stati aggiunti 42 mg di FA (0,095 mmol) e dopo la sua completa solubilizzazione sono stati aggiunti 30,5 mg di NHSS (0,14 mmol). Il pH della miscela scende rapidamente e pertanto è stato aggiunto NaOH 0,1 N al fine di portarlo a 6,8. Infine, sono stati aggiunti 27 mg di EDC HCl (0,14 mmol) e il valore del pH della miscela di reazione è stato mantenuto a 6,8 con NaOH 0,1 N. La miscela è stata lasciata reagire sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. Trascorso il tempo di reazione, l'NH₂-PEG-FA ottenuto è stato purificato mediante dialisi esaustiva, utilizzando tubi di dialisi SpectraPor con un cut-off di peso molecolare di 1.000 Da e, in seguito, il prodotto è stato ulteriormente purificato mediante cromatografia di permeazione su gel, usando Sephadex G-25 come gel di separazione. Infine, dopo la purificazione, la soluzione di NH₂-PEG-FA è stata liofilizzata. Il copolimero NH₂-PEG-FA è stato ottenuto con una resa dell'85% (p/p), calcolata in base alla quantità di NH₂-PEG-NH₂ utilizzato in partenza.

Il PEG-derivato ottenuto è stato caratterizzato mediante ¹H-NMR.

Lo spettro ¹H-NMR (300 MHz, MeOD) ha evidenziato i segnali: δ 2,1 - 2,31 (m, 4H di FA); δ 3,67 (m, 174H di PEG, -CH₂-CH₂-O); δ 4,48 (d, 1H di FA);

δ 4,64 (d, 2H di FA,); δ 6,76 (d, 2H di FA); δ 7,75 (d, 2H di FA); δ 8,75 (s, 1H di FA).

11.5.1 Sintesi dei copolimeri PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG

La derivatizzazione del PHEA con il PLA, al fine di ottenere il copolimero graft PHEA-PLA, è stata eseguita utilizzando il CDI come agente attivante i gruppi carbossilici terminali del PLA. Una quantità nota di CDI, solubilizzato in 0,1 ml di DMF-a, è stata aggiunta goccia a goccia a una soluzione di 3 ml di PLA, anch'esso solubilizzato in DMF-a. La soluzione è stata lasciata reagire sotto agitazione per 4 ore a 35 °C.

Nel frattempo, 100 mg di PHEA sono stati solubilizzati in 1,2 ml di DMF-a e, alla soluzione ottenuta, è stata poi aggiunta la DEA.

Trascorso il tempo di attivazione del PLA con il CDI, la soluzione di PHEA è stata aggiunta lentamente, goccia a goccia, al PLA attivato e la soluzione risultante è stata lasciata reagire per 24 ore a 35 °C.

Le quantità di PLA, CDI e DEA sono state aggiunte secondo l'equazione: moli di PLA/moli di gruppi idrossilici liberi nel PHEA = 0,1; moli di CDI/moli di PLA = 1,2 e moli di DEA/moli di PLA = 5.

Il copolimero PHEA-PLA ottenuto è stato precipitato in una miscela costituita da etere dietilico/diclorometano (15:1 v/v) e la sospensione è stata poi centrifugata per 15 minuti, a 9800 rpm a 4 °C. Il prodotto solido ottenuto è

stato recuperato e lavato quattro volte con la medesima miscela al fine di allontanare eventuali tracce di CDI in eccesso, di imidazolo liberatosi durante la reazione e di PLA non reagito. Infine, il prodotto solido è stato accuratamente seccato sotto vuoto e, successivamente, pesato. Il copolimero PHEA-PLA è stato ottenuto con una resa del 90% (p/p), calcolata in base alla quantità di PHEA utilizzata.

Il copolimero PHEA-PLA ottenuto è stato caratterizzato mediante $^1\text{H-NMR}$.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMF-d7) ha evidenziato i segnali: δ 1,3 - 1,7 (m, 333H di PLA, -O-CO-CH(CH₃)-O-); δ 2,72 (m, 2H di PHEA, -CO-CH-CH₂-CO-NH-); δ 3,4 (m, 2H di PHEA, -NH-CH₂-CH₂-O-); δ 3,7 (m, 2H di PHEA, -NH-CH₂-CH₂-O-); δ 5,0 e 5,5 (m, 111H di PLA, -O-CO-CH-(CH₃)-).

Per la successiva coniugazione del NH₂-PEG-FA al copolimero PHEA-PLA precedentemente sintetizzato, una quantità nota di PHEA-PLA (100 mg) solubilizzata in 4 ml di DMF-a è stata fatta reagire con 7,5 mg di BNPC. La soluzione finale è stata lasciata reagire per 2,5 ore a 40 °C, al fine di attivare i gruppi ossidrilici in catena laterale del PHEA-PLA.

Trascorso il tempo di reazione, sono stati aggiunti goccia a goccia 4 ml di una soluzione di NH₂-PEG-FA (29 mg) in DMF-a, e la miscela finale è stata lasciata agitare a 25 °C per 18 ore. Le quantità di BNPC e di NH₂-PEG-FA utilizzate in questa reazione sono state calcolate secondo i rapporti: moli di BNPC/moli di gruppi idrossilici liberi nel PHEA-PLA = 0,1 e moli di NH₂-PEG-FA/moli di BNPC = 0,5.

La miscela di reazione è stata quindi precipitata in etere etilico e la sospensione è stata centrifugata per 15 minuti, a 9800 rpm a 4 °C. Il residuo solido è stato poi lavato quattro volte con aliquote di acetone. Il prodotto ottenuto è stato solubilizzato in acqua bidistillata e purificato mediante dialisi esaustiva utilizzando tubi da dialisi SpectraPor con cut-off di peso molecolare di 12.000-14.000 Da. Dopo la purificazione, la soluzione dializzata è stata liofilizzata e il prodotto puro è stato ottenuto con una resa del 90% (p/p) rispetto alla quantità di PHEA-PLA di partenza.

Il copolimero finale PHEA-PLA-PEG-FA è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O) ha evidenziato i seguenti segnali: δ 1,40 (m, 333H di PLA, $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$); δ 2,0-2,34 (m, 4H di FA); δ 2,74 (m, 2H di PHEA, $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$); δ 3,29 (m, 2H di PHEA, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); δ 3,65 (m, 174H di PEG, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); δ 3,77 (m, 2H di PHEA, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); δ 4,19 (d, 1H di FA); δ 4,38 (m, 2H di FA); δ 5,13 (m, 111H di PLA $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}-(\text{CH}_3)-$); δ 6,73 (d, 2H Ph di FA); δ 7,60 (d, 2H Ph di FA); δ 8,70 (s, 1H Ar di FA).

Inoltre, utilizzando la stessa procedura di sintesi riportata per il PHEA-PLA-PEG-FA, è stato sintetizzato il copolimero PHEA-PLA-PEG, utilizzando il PEG- NH_2 anziché l' NH_2 -PEG-FA.

11.5.2 Coniugazione del fluoroforo Alexa con PHEA-PLA

La sonda fluorescente Alexa Fluor 647 è stata coniugata al PHEA-PLA prima della preparazione delle MNPs. Per questa reazione di coniugazione 0,5 mg di Alexa sono stati fatti reagire con una soluzione (25 mg ml^{-1}) di PHEA-PLA in DMF-a, utilizzando $10 \text{ }\mu\text{l}$ di una soluzione 5 mg ml^{-1} di DMAP in DMF-a come catalizzatore. La miscela di reazione è stata lasciata reagire sotto agitazione per 24 ore a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Trascorso il tempo di reazione, la miscela è stata concentrata sotto vuoto e, successivamente, il prodotto è stato diluito con acqua bidistillata. Il prodotto PHEA-PLA-Alexa ottenuto è stato purificato mediante cromatografia di permeazione su gel, usando Sephadex G-25 come gel di separazione. Dopo la suddetta purificazione, la soluzione di PHEA-PLA-Alexa è stata liofilizzata e il prodotto puro è stato ottenuto con una resa dell' 88% (p/p) rispetto alla quantità di PHEA-PLA iniziale. Le quantità di DMAP e di Alexa usate in questa reazione sono state calcolate secondo i rapporti: moli di DMAP moli di Alexa = 1 e moli di Alexa/moli di gruppi idrossilici liberi nel PHEA-PLA = 0,002.

11.5.3 Preparazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-PLA-PEG-FA e PHEA-PLA-PEG

Le nanoparticelle sono state preparate a partire dai copolimeri PHEA-PLA e PHEA-PLA-PEG-FA con il metodo della nano-precipitazione. Una soluzione organica di copolimero è stata preparata solubilizzando 15 mg di PHEA-PLA

e 15 mg di PHEA-PLA-PEG-FA in una miscela costituita da THF/DMSO (5:1 v/v); contemporaneamente, 5 mg di nanoparticelle solide di ossido di ferro sono state disperse in 1 ml di THF. La soluzione di polimero è stata miscelata con le nanoparticelle di ossido di ferro e la dispersione è stata sonicata in un bagno ad ultrasuoni per 15 minuti. Questa miscela organica è stata quindi aggiunta, sotto agitazione, a 50 ml di acqua bidistillata e omogeneizzata mediante un Ultra-Turrax (T 25, Janke & Kunkel-Ika Labortechnik) a 24.000 rpm per 20 minuti. La temperatura è stata mantenuta intorno ai 3°C tramite l'utilizzo di un bagno di ghiaccio. Le nanoparticelle ottenute (MNPs-FA) sono state purificate attraverso ultrafiltrazione, utilizzando delle membrane per ultrafiltrazione (Pall Life Sciences) con cut-off di 10 kDa. Infine, le nanoparticelle sono state essiccate mediante freeze-drying. La stessa procedura è stata utilizzata per la preparazione delle nanoparticelle magnetiche senza acido folico (MNPs) e per la preparazione delle nanoparticelle magnetiche fluorescenti (MNPs-Alexa). Per la preparazione delle MNPs è stata utilizzata una miscela di PHEA-PLA/PHEA-PLA-PEG in rapporto 1:1 (p/p), mentre per la preparazione delle MNPs-Alexa è stata utilizzata una miscela di PHEA-PLA-Alexa e PHEA-PLA-PEG-FA o PHEA-PLA-PEG in rapporto 1:1 (p/p).

11.5.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle magnetiche rivestite con PHEA-PLA-PEG-FA e con PHEA-PLA-PEG

Microscopia a scansione elettronica (SEM)

Per gli studi di morfologia, le MNPs-FA liofilizzate sono state visualizzate attraverso un microscopio a scansione elettronica, ESEM XL30 Philips. I campioni in polvere sono stati posti su un nastro biadesivo precedentemente applicato su uno stub di acciaio inossidabile. Le MNPs-FA sono state poi rivestite con polvere d'oro prima dell'analisi al microscopio.

Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e del potenziale zeta

Gli studi di DLS e le misurazioni del potenziale zeta (mV) sono state condotte a 25° C usando uno strumento Nano ZS Malvern Zetasizer. Le soluzioni acquose di MNPs-FA e MNPs sono state analizzate ad una concentrazione finale di copolimero di 0,2 mg ml⁻¹, dopo essere state filtrate con filtri in cellulosa con cut-off di 5 µm. Il diametro idrodinamico medio e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti dalla funzione di correlazione di analisi cumulative. Il potenziale Zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica, usando la relazione di Smoluchowsky e assumendo che $K \cdot a \gg 1$ (dove K e a sono rispettivamente il parametro Debye-Hückel e il raggio della particella).

Analisi FT-IR

Studi sulla composizione generale delle nanoparticelle di ossido di ferro rivestite con il polimero sono stati effettuati tramite spettroscopia infrarossa

(FT-IR). Gli spettri del copolimero PHEA-PLA-PEG-FA, delle MNPs-FA e delle nanoparticelle solide di ossido di ferro, sono stati registrati in KBr nel range di frequenza 4000-400 cm^{-1} . Gli spettri sono stati registrati in scala di trasmittanza (% T) con una risoluzione di 1 cm^{-1} e un numero di scansioni pari a 100.

Determinazione del ferro totale

Il contenuto di ferro nelle MNPs-FA e nelle MNPs è stato determinato utilizzando il metodo della Ferrozina, basato sulla valutazione spettrofotometrica del complesso ferro-ferrozina [Riemer et al., 2004]. Secondo questo metodo, 5 mg di nanoparticelle magnetiche liofilizzate sono state disperse in una soluzione di HCl 1,4 N (1 mg ml^{-1}) e incubate per 2 ore a 60 °C, in un bagno d' acqua, al fine di consentire la disaggregazione delle nanoparticelle e la completa solubilizzazione delle nanoparticelle di Fe_3O_4 . Trascorso il tempo di incubazione, è stato aggiunto 1 ml di reattivo per il ferro contenente 6,5 mM di ferrozina, 6,5 mM di neocuproina e 1M di acido ascorbico solubilizzati in tampone acetato a pH 4,5.

Le nanoparticelle sono così state incubate con il reattivo per 30 minuti a temperatura ambiente. Passati i 30 minuti, la densità ottica del campione è stata misurata a 560 nm, usando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2401PC. Il contenuto in ferro delle nanoparticelle è stato determinando paragonando l'assorbanza dei campioni, così trattati, con una retta di calibrazione ottenuta misurando l' assorbanza a 560 nm di soluzioni standard di FeCl_3 a

concentrazione nota (comprese tra 0,5-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) trattati con il reattivo per il ferro. Come bianco, è stata utilizzata la soluzione di reattivo per il ferro

Determinazione dell'acido folico nelle MNPs-FA

La quantità di FA coniugato al polimero $\text{NH}_2\text{-PEG-FA}$ è stata determinata mediante spettroscopia UV, leggendo l'assorbanza a 360 nm delle MNPs-FA solubilizzate in tetraidrofurano (THF) e confrontando tale valore con una curva di calibrazione ottenuta a partire da soluzioni standard di FA nello stesso solvente. Il contenuto in FA è stato espresso come percentuale di FA coniugato per unità di massa delle MNPs.

Proprietà magnetiche

Le misure di magnetizzazione sono state eseguite in funzione della temperatura e del campo magnetico, utilizzando due magneti commerciali SQUID (Cryogenic Ltd. S600 and Quantum Design MPMS) operanti nel range di temperatura compreso tra 1,8 K - 350 K, applicando un campo magnetico fino a 6,5 T. Le misure sono state effettuate sia sul campione liofilizzato che sulla dispersione acquosa (1% p / p di magnetite). Tutti i dati sono stati corretti in base alle proprietà magnetiche del campione controllo, che è stato misurato separatamente, e in base al contributo diamagnetico dell'acqua. La dipendenza della magnetizzazione dalla temperatura è stata misurata con un campo magnetico applicato di $\mu_0 H = 5\text{mT}$, in un range di temperatura di 5-300 K, dopo le procedure di *zero field cooling* (ZFC) e di *field cooling* (FC). Le curve ZFC sono state ottenute dopo il raffreddamento

dei campioni fino a temperatura iniziale (5 K) in assenza di un campo magnetico esterno. Al contrario, le curve FC sono state ottenute dai campioni raffreddati da 300 a 5 K e applicando un campo magnetico esterno di 5 mT.

11.5.5 Studi di citotossicità in vitro delle nanoparticelle magnetiche

Attraverso il saggio MTS sono stati effettuati studi di citotossicità sulle linee cellulari di epitelio bronchiale umane (16HBE) e di adenocarcinoma mammario umano (MCF7).

Le cellule sono state piastrate su piastre a 96 pozzetti con una densità di $5 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto e sospese in DMEM privo di acido folico (Euroclone, Italia) contenente il 10 % v/v di siero bovino fetale (FBS), l'1% v/v di antibiotici (10.000 U ml^{-1} di penicillina, 10 mg ml^{-1} streptomicina) e il 2% v/v di amfotericina B ($0,25 \text{ mg ml}^{-1}$), e incubate in condizioni standard (95% di umidità relativa, 5% CO₂ e 37 °C). Dopo 24 ore, le cellule sono state incubate con 200 µl di mezzo di coltura cellulare, contenente una volta le MNPs e un'altra volta le MNPs-FA, ad una concentrazione finale di nanoparticelle compresa tra 0,05 e 0,5 mg ml⁻¹.

Dopo 4, 24, 48 e 96 ore di incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito con 100 µl di DMEM fresco e sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 20 µl di una soluzione MTS; infine le piastre sono state nuovamente incubate per altre 3 ore a 37 °C. Trascorso il tempo di incubazione, è stata misurata l'assorbanza a 490 nm usando un lettore Microplate. I risultati sono stati espressi come

riduzione percentuale della vitalità cellulare rispetto alle cellule controllo. Come controllo negativo sono state usate cellule incubate con il solo mezzo. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

11.5.6 Studi di uptake in vitro delle nanoparticelle magnetiche

Per gli studi di uptake cellulare sia le cellule MCF7 che le 16HBE sono state piastrate con una densità di $2,5 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto in DMEM privo di acido folico, contenente il 10% (v/v) di FBS, 1 mM di glutammina, l'1% (v/v) di antibiotici (10.000 U ml^{-1} di penicillina, 10 mg ml^{-1} streptomicina) e il 2% (v/v) di amfotericina B ($0,25 \text{ mg ml}^{-1}$), e incubate a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO_2 , in piastre a 96 pozzetti per 24 ore. Dopo 24 ore il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state incubate con $200 \text{ }\mu\text{l}$ di DMEM contenenti diverse quantità di MNPs e di MNPs-FA (nanoparticelle a concentrazioni note comprese tra $0,05$ e $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$), per 4 e 24 ore. Trascorso il tempo di incubazione, il mezzo è stato rimosso e il monostrato di cellule è stato lavato due volte con mezzo DPBS. Il monostrato di cellule è stato quindi trattato con $200 \text{ }\mu\text{l}$ di acqua bidistillata, al fine di lisare le cellule. Dopo 30 minuti di incubazione, le cellule sono state raschiate e il lisato cellulare raccolto in Eppendorf.

Per la determinazione del ferro, $100 \text{ }\mu\text{l}$ di lisati cellulari sono stati posti in provette pyrex e miscelati con $100 \text{ }\mu\text{l}$ di una soluzione $1,4 \text{ M}$ di HCl. Queste miscele sono state incubate per 2 ore a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in un bagno d' acqua

termostato. Successivamente, le miscele sono state raffreddate a temperatura ambiente e sono stati aggiunti a ciascuna provetta 140 μl di una soluzione 1 M di NaOH, 100 μl di tampone acetato a pH 4,5 ed infine 50 μl di reattivo per il ferro. Dopo 30 min, 200 μl di ciascuna soluzione sono stati trasferiti all'interno dei pozzetti di una piastra a 96 pozzetti ed è stata misurata l'assorbanza a 560 nm, utilizzando un lettore Microplate. Il contenuto di ferro del campione è stato calcolato facendo il confronto con una curva di calibrazione, ottenuta mediante la registrazione dell'assorbimento di soluzioni standard di FeCl_3 (comprese tra 0,5-5 $\mu\text{g} / \text{ml}$). La concentrazione di ferro intracellulare di ciascun lisato cellulare, determinata per ciascun pozzetto, è stata corretta in riferimento al bianco e normalizzata rispetto al numero di cellule per pozzetto. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Inoltre, è stato anche valutato l'uptake qualitativo delle MNPs-FA sulle MCF7, al fine di rivelare il ferro all'interno delle cellule in presenza e in assenza di un campo magnetico esterno. Per gli esperimenti in presenza di un campo magnetico esterno, prima della deposizione delle cellule ($2,5 \cdot 10^4$ cellula/pozzetto), un magnete cubico ($0,5 \text{ cm}^3$), con una forza di attrazione di 500 g, è stato fissato saldamente al fondo di ciascun pozzetto. Dopo l'incubazione con le nanoparticelle, ad una concentrazione di $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ per 4 e 24 ore, è stato rimosso il magnete e lo strato di cellule è stato fissato con una soluzione di formaldeide al 4% (vol vol^{-1}), lavato due volte con DPBS e incubato per 30 minuti con 100 μl di HCl al 6% (vol vol^{-1}). Successivamente,

dopo aver rimosso l' HCl, le cellule sono state lavate con DPBS, incubate con 50 µl di reattivo per il ferro e infine osservate attraverso un microscopio ottico.

11.5.7 Eccitazione a due fotoni e microscopia confocale

Per gli studi di microscopia confocale a scansione laser (CLSM), le MCF7 sono state piastrate ad una densità di $2,5 \cdot 10^4$ cellule/ pozzetto, in piastre da 8 pozzetti, utilizzando DMEM privo di rosso fenolo, contenente il 10 % (v/v) di FBS, l'1 % (v/v) di antibiotici (10.000 U ml⁻¹ di penicillina, 10 mg ml⁻¹ di streptomicina) e il 2 % (v/v) di amfotericina B (0,25 mg ml⁻¹). Dopo 24 ore è stato rimosso il mezzo e le cellule sono state lavate due volte con DPBS. Le membrane delle cellule sono state marcate incubando il monostrato cellulare con il colorante Laurdan solubilizzato in DMSO e diluito con DMEM + il 2,5% (v/v) di FBS ad una concentrazione finale di 1 µM, per 15 minuti a 37°C e in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Dopo il tempo di incubazione, le cellule sono state lavate due volte con DPBS. Le cellule ancora vive sono state trattate con le MNPs-FA-Alexa e le MNPs-Alexa e riprese in sequenza attraverso l'uso di un microscopio confocale. Dopo l'aggiunta delle MNPs-FA-Alexa e delle MNPs-Alexa (0,25 mg ml⁻¹) sono state acquisite diverse immagini in funzione del tempo, con una scansione di frequenza di 400 Hz. Le membrane cellulari marcate con il colorante Laurdan sono state visualizzate attraverso un'eccitazione a due fotoni (Spectra-Physics / Mai /- / Tai / Ti: Sa ultra-veloce laser). L'eccitazione

PARTE SPERIMENTALE

è stata fissata a 780 nm mentre il range di emissione è stato impostato tra 430-500 nm. La fluorescenza dell'Alexa 647 è stata misurata attraverso il microscopio confocale, impostando l' eccitazione a 633 nm (argon laser), mentre la gamma di emissione spettrale è stata impostata tra 650-720 nm.

11.6. Sintesi dell' INU-EDA

La derivatizzazione dell'Inulina con l'EDA, al fine di ottenere il poliero INU-EDA, è stata condotta utilizzando il BNPC come agente attivante dei gruppi ossidrilici dell'inulina. In particolare, 236 mg di BNPC sono stati solubilizzati in 1 ml di DMF-a e la soluzione risultante è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di inulina in DMF-a ($62,5 \text{ mg ml}^{-1}$) (l'inulina è stata precedentemente seccata in stufa per 24 ore a 70°C). La reazione è stata condotta utilizzando un reattore a microonde (CEM Discover Microwave Reactor). La miscela di reazione è stata irradiata per 1 ora e lo strumento è stato settato ad una potenza di 25W; la temperatura è stata mantenuta intorno a 60°C raffreddando il sistema dall'esterno con aria compressa. Trascorso il tempo di reazione, la soluzione d'inulina attivata, è stata aggiunta lentamente goccia a goccia ad una soluzione di EDA preparata solubilizzando 250 μl di EDA in 1 ml di DMF-a. La miscela di reazione è stata lasciata reagire per 1 ora a 25°C .

Le quantità di BNPC e di EDA utilizzate in questa reazione sono state calcolate in accordo con le equazioni: moli di BNPC/moli di unità ripetitive dell'inulina = 0,5 ; moli di EDA/moli di BNPC =5. Infine, il prodotto ottenuto è stato precipitato in una miscela di etere etilico/diclorometano (2:1 v/v), e il prodotto solido è stato recuperato centrifugando per 5 minuti a 9000 rpm a 5°C . Il prodotto è stato, successivamente, lavato 3 volte in acetone al fine di eliminare l'eccesso di EDA e di BNPC non reagiti. Il prodotto ottenuto è stato

solubilizzato in 2 ml di acqua bidistillata e ulteriormente purificato mediante cromatografia di permeazione su gel, usando Sephadex G-25 come gel di separazione. Dopo la purificazione, la soluzione di INU-EDA è stata liofilizzata. Il prodotto finale INU-EDA è stato ottenuto con una resa del 98% (p/p) rispetto all'inulina di partenza. Il polimero INU-EDA è stato caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz D_2O).

11.6.1 Sintesi dell'INU-EDA-Sq

Al fine di ottenere il copolimero INU-EDA-Sq è stata eseguita la derivatizzazione dell' INU-EDA con il derivato squalenoilico SqCOOH C_{27} (Sq) utilizzando EDC/NHS come agenti attivanti del gruppo carbossilico dello Sq. Una soluzione contenente opportune quantità di EDC HCl, NHS e TEA è stata aggiunta goccia a goccia ad 1 ml di soluzione di Sq in DMF-a (20 mg ml^{-1}). La miscela di reazione è stata lasciata a reagire 4 ore a 40°C . Trascorso il tempo di attivazione, la miscela è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di INU-EDA in DMF-a (37,5 mg ml^{-1}), e lasciata reagire 18 ore a 25°C . Le quantità di Sq, EDC HCl, NHS e TEA utilizzate in questa reazione sono state calcolate in base all'equazioni: moli di Sq/moli di gruppi amminici liberi nell'INU-EDA = 0,1 ; moli di EDC HCl/moli di Sq = 1,2 ; moli di NHS/moli di Sq = 1,2 ; moli di TEA/moli di Sq = 1,2.

Il prodotto ottenuto è stato precipitato in una miscela di etere etilico /diclorometano (2:1 v/v) e il prodotto solido è stato recuperato centrifugando

per 5 minuti a 9000 rpm a 5°C. Infine, il solido recuperato è stato lavato 4 volte in nella stessa miscela e seccato sotto vuoto. Il copolimero INU-EDA-Sq è stato ottenuto con una resa dell'95% (p/p) calcolata rispetto all' inulina di partenza. Il copolimero ottenuto è stato caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR (300 MHz D₂O/DMF-d₇ (7:1)).

11.6.2 Sintesi INU-EDA-Sq-PEG₂₀₀₀

Per la successiva coniugazione del PEG₂₀₀₀ al copolimero precedentemente sintetizzato, una quantità nota di INU-EDA-Sq (90 mg) è stata solubilizzata in acqua bidistillata (4 ml); il pH della soluzione è risultato essere pari a circa 8, pertanto, il pH è stato portato 6,8 utilizzando HCl 0,1 M. A questo punto, 21 mg di PEG₂₀₀₀ sono stati aggiunti alla soluzione di INU-EDA-Sq. Il pH della miscela tende a salire, e pertanto viene mantenuto a 6,8 con l'aggiunta di alcune gocce di HCl 0,1 M. La miscela di reazione viene lasciata reagire per 24 ore a temperatura ambiente, sotto costante agitazione. La quantità di PEG₂₀₀₀ utilizzata in questa reazione è stata calcolata in base all'equazione: moli di PEG₂₀₀₀/moli di gruppi amminici liberi dell'INU-EDA = 0,1. Trascorso il tempo di reazione, la miscela è stata seccata sotto vuoto, utilizzando una pompa Vacubrand, e il solido ottenuto è stato lavato 4 volte con etere etilico/diclorometano (2:1 v:v). Infine, il prodotto ottenuto è stato seccato sotto vuoto. Il copolimero INU-EDA-Sq-PEG₂₀₀₀ è stato ottenuto con

una resa del 100% (p/p), rispetto all'inulina di partenza. Il copolimero INU-EDA-Sq-PEG₂₀₀₀ è stato caratterizzato attraverso analisi ¹H-NMR.

Lo spettro ¹H-NMR (300MHz D₂O/DMFa-d₇) ha evidenziato i seguenti segnali: δ 1,12 e 1,53 e δ 1.9 e 2.2 attribuibili rispettivamente ai CH₃ e ai CH₂ allilici dello squalene, δ 2,62 relativo ai protoni dell'EDA (4H_{EDA}, NH₂-CH₂-CH₂-NH-), 3,65 (176 H_{PEG}, -CH₂-CH₂-O-), δ 3,77 (5 H_{INU}, -CH₂-OH; -CH-CH₂-OH; -C-CH₂-O-), δ 4,06 (1H_{INU}, -CH-OH), δ 4,2 (d, 1H_{INU}, -CH-OH).

11.6.3 Preparazione delle nanoparticelle superparamagnetiche di INU-EDA-Sq-PEG

Le nanoparticelle superparamagnetiche di INU-EDA-Sq-PEG (MNPs) sono state preparate aggiungendo 50 mg del copolimero INU-EDA-Sq-PEG ad 1 ml di soluzione di Fe₃O₄ in H₂O. La dispersione ottenuta è stata sonicata per 10 minuti, diluita fino ad un volume finale di 5 ml e posta in tubi da dialisi flottanti Spectra Por con cut-off di 8000-10000 Da. Dopo 48 ore la dispersione è stata congelata e seccata attraverso freeze drying. Le MNPs sono state ottenute con una resa del 100% (p/p) rispetto ai prodotti di partenza.

11.6.4 Preparazione delle nanoparticelle superparamagnetiche di INU-EDA-Sq-PEG caricate con Doxorubicina

Le nanoparticelle superparamagnetiche di INU-EDA-Sq-PEG cariche di farmaco (MNPs-DOXO) sono state preparate miscelando una dispersione acquosa di copolimero (50 mg ml^{-1}) e nanoparticelle superparamagnetiche di Fe_3O_4 (5 mg ml^{-1}) con 1 ml di soluzione acquosa di Doxorubicina base libera (DOXO) (10 mg ml^{-1}). La soluzione di Doxo è stata ottenuta solubilizzando 10 mg di doxorubicina cloridrato in 1 ml di acqua bidistillata ed aggiungendo un eccesso di TEA (4 mmoli). La miscela ottenuta è stata sonicata per 10 minuti, diluita fino ad un volume finale di 5 ml e posta in tubi da dialisi flottanti Spectra Por con cut-off di 8000-10000 Da e dializzata contro acqua bidistillata per 48 ore, effettuando dei cambi a 6, 24 e 48 ore, al fine di eliminare la DOXO non incorporata. Dopo 48 ore la dispersione è stata congelata e seccata attraverso freeze drying. Le MNPs-DOXO sono state ottenute con una resa del 90% (p/p) rispetto ai prodotti di partenza.

11.6.5 Determinazione del contenuto di farmaco

La quantità di Doxo caricata all'interno delle MNPs-DOXO è stata determinata mediante analisi UV disperdendo una quantità nota di nanoparticelle cariche di farmaco in acqua bidistillata.

La curva di calibrazione è stata ottenuta usando soluzioni standard di Doxorubicina HCl con concentrazioni comprese nel range $0,1 - 0,01 \text{ mg ml}^{-1}$.

Il risultato è stato espresso come percentuale di farmaco contenuto in 100 mg di materiale secco.

11.6.6 Caratterizzazione delle nanoparticelle superparamagnetiche rivestite con INU-EDA-Sq-PEG

Determinazione del ferro totale

Il contenuto di ferro nelle nanoparticelle superparamagnetiche di INU-EDA-Sq-PEG è stato determinato utilizzando il metodo della Ferrozina, basato sulla valutazione spettrofotometrica del ferro [Riemer et al., 2004]. Secondo questo metodo, 5 mg di nanoparticelle magnetiche liofilizzate sono state disperse in 5 ml di HCl 1,4 N (1 mg ml^{-1}) e incubate per 2 ore a 60 °C, in un bagno d'acqua, al fine di consentire la disaggregazione delle nanoparticelle e la completa solubilizzazione delle nanoparticelle di Fe_3O_4 . Trascorso il tempo d'incubazione, 100 μl di tale soluzione sono stati diluiti fino ad un volume di 5 ml con tampone acetato a pH 4,5 ed aggiunto un opportuno volume (1,6 ml) di reattivo per il ferro contenente: 6,5 mM di ferrozina, 6,5 mM di neocuproina e 1M di acido ascorbico solubilizzati in tampone acetato a pH 4,5.

La soluzione è stata incubata con il reattivo per 30 minuti a temperatura ambiente, e successivamente, è stata misurata la densità ottica del campione a 560 nm, utilizzando un lettore Microplate. Il contenuto in ferro delle nanoparticelle di INU-EDA-Sq-PEG è stato determinando paragonando

l'assorbimento del campione, così trattato, con una retta di calibrazione ottenuta misurando l'assorbimento a 560 nm di soluzioni standard di FeCl_3 a concentrazione nota (comprese tra $0,5-5 \mu\text{g ml}^{-1}$) trattati con il reattivo per il ferro. Come bianco, è stata utilizzata la soluzione di reattivo per il ferro.

FT-IR

Studi sulla composizione generale delle nanoparticelle di ossido di ferro rivestite con il polimero sono stati effettuati tramite spettroscopia infrarossa (FT-IR). Gli spettri del copolimero INU-EDA-Sq-PEG, delle nanoparticelle rivestite con il copolimero e delle nanoparticelle solide di ossido di ferro, sono stati registrati in KBr nel range di frequenza $4000-400 \text{ cm}^{-1}$. Gli spettri sono stati registrati in scala di trasmittanza (% T) con una risoluzione di 1 cm^{-1} e un numero di scansioni pari a 100.

Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e del potenziale zeta

Gli studi di DLS e le misurazioni del potenziale zeta (mV) sono state condotte a 25° C usando uno strumento Nano ZS Malvern Zetasizer. La dispersione acquosa di ciascun campione di nanoparticelle, preparata in acqua bidistillata con una concentrazione finale di $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$, è stata analizzata dopo filtrazione attraverso filtri di membrana di cellulosa di $5 \mu\text{m}$. Il diametro idrodinamico medio e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti mediante analisi cumulative della funzione di correlazione. Il potenziale zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione

Smoluchowsky e supponendo che $K \cdot a \gg 1$ (dove K e a sono, rispettivamente, il parametro Debye-Hückel e il raggio della particella).

Microscopia a scansione elettronica (SEM)

Per gli studi di morfologia, le MNPs-FA liofilizzate sono state visualizzate attraverso un microscopio a scansione elettronica, ESEM XL30 Philips. I campioni in polvere sono stati posti su un nastro biadesivo precedentemente applicato su uno stub di acciaio inossidabile. Le MNPs-FA sono state poi rivestite con polvere d'oro prima dell'analisi al microscopio.

11.6.7 Studi di rilascio del farmaco.

Allo scopo di valutare la capacità dei sistemi ottenuti di rilasciare il farmaco incorporato, 5 mg di MNPs-DOXO e 0,5 mg di Doxorubicina HCl (come controllo positivo) sono state disperse in 5 ml di tampone fosfato a pH 7,4 e trasferite all'interno di una membrana da dialisi Spectra/Por (MWCO 1000 Da). Le membrane da dialisi, contenenti le dispersioni di micelle cariche di farmaco e il farmaco da solo, sono state immerse in PBS a pH 7,4 (15 ml) e incubata a 37° C sotto continua agitazione (100 rpm) in un incubatore Benchtop 808C Orbital Shaker modello 420. A intervalli di tempo programmati, sono state prelevate dall'esterno della membrana da dialisi aliquote di mezzo esterno (1 ml) e sostituite con una quantità uguale di mezzo fresco. I campioni prelevati sono stati analizzati attraverso HPLC al fine di determinare la quantità di farmaco rilasciata. I dati sono stati corretti tenendo

in considerazione la procedura di diluizione. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e i risultati si sono rivelati conformi all'errore standard \pm 5%. Allo stesso modo sono stati effettuati studi di rilascio in tampone PBS a pH 5,5.

La quantità di DOXO rilasciata dalle nanoparticelle è stata determinata mediante analisi HPLC. La fase mobile usata è una miscela di tampone a pH 4, ottenuto aggiustando il pH di una soluzione 10 mM di $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 5 ml di TEA con acido ortofosforico, e acetonitrile (68:32), il flusso di 1 ml/min e l'assorbanza è stata registrata ad una lunghezza d'onda di 485 nm. Per determinare la quantità del farmaco è stata utilizzata una curva di calibrazione ottenuta utilizzando standard di Doxorubicina HCl.

11.6.8 Studi di citotossicità in vitro

La vitalità cellulare è stata testata con saggio MTS sulla linee cellulare di carcinoma del colon umane (HCT 116). Le cellule sono state piastrate su piastre a 96 pozzetti con una densità di $2,5 \cdot 10^4$ cellule per pozzetto, e sospese nel mezzo Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), arricchito con 10% vol/vol di siero bovino fetale (FBS), 1% vol/vol di antibiotici (10 mgml⁻¹ streptomicina 10000 U-1 ml penicillina), e incubate in condizioni standard (95% UR e 5% di CO₂ a 37°C).

Dopo 24 ore, le cellule sono state incubate con 200 μ l di mezzo di coltura cellulare per pozzetto, contenenti le MNPs e le MNPs-DOXO a

concentrazioni comprese tra 0,027 e 1,08 mg ml⁻¹, corrispondenti alla quantità di micelle che, disperse nel mezzo, darebbe una concentrazione di farmaco compreso tra 5 e 200 µM. Come controllo positivo, le tre linee cellulari sono state incubate con Doxorubicina HCl a concentrazione compresa tra 5 e 200 µM. Inoltre, attraverso saggio MTS, è stato valutato l'effetto di un campo magnetico esterno. In particolare, al fondo dei pozzetti contenenti le cellule incubate con MNPs e MNPs-DOXO a concentrazione pari a 0,27 mg ml⁻¹ (corrispondente a 50 µM di Doxo) sono stati posti dei magneti (forza di attrazione pari a 250 g). Dopo 24, 48 ore di incubazione, il mezzo contenete la dispersione acquosa di nanoparticelle o Doxo e i magneti sono stati rimossi, lo strato cellulare lavato con DPBS ed aggiunti 100 µl di DMEM fresco e 20 µl della soluzione MTS; infine, le piastre sono state nuovamente incubate per 3 ore a 37 °C . Trascorso il tempo di incubazione è stata misurata l'assorbanza a 490 nm usando un lettore Microplate. I risultati sono stati espressi come riduzione percentuale della vitalità cellulare rispetto alle cellule controllo. Come controllo negativo sono state usate cellule incubate con il solo mezzo. Tutti gli esperimenti di coltura sono stati eseguiti in triplicato.

11.6.9 Studi di Uptake

Per gli studi di uptake le cellule HCT 116 sono state piastrate con una densità di $2,5 \cdot 10^4$ per pozzetto in piastre a 46 pozzetti, e sospese nel mezzo Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), arricchito con 10% vol/vol di

siero bovino fetale (FBS), 1% vol/vol di antibiotici (10 mg ml⁻¹ streptomicina 10000 U-1 ml penicillina), e incubate in condizioni standard (95% UR e 5% di CO₂ a 37°C). Dopo 24 ore il mezzo è stato rimosso e sostituito con 200 µl di una sospensione in DMEM contenete Doxo libera o incorporata all'interno delle MNPs-Doxo, al fine di avere una concentrazione finale di Doxo pari a 50 µM. Inoltre, è stato valutato l'uptake della Doxo in presenza di un campo magnetico esterno, applicando al fondo della piastra contenete le cellule incubate con le MNPs-Doxo un magnete (forza di attrazione 250 g).

Le piastre sono state incubate per 4, 24 e 48 ore in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Quindi, trascorso il tempo previsto sia il mezzo che i magneti sono stati rimossi; le cellule sono state lavate con DPBS e fissate con una soluzione al 4 % (v/v) di paraformaldeide in DPBS per 30 minuti. Successivamente, lo strato cellulare è stato lavato due volte con DPBS e i nuclei delle cellule sono stati colorati, incubando, per 15 minuti, lo strato cellulare con 200 µl di una soluzione di 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) in DPBS (0,1µg/ml). Infine, le cellule sono state lavate due volte con DPBS ed osservate al microscopio a fluorescenza.

12. BIBLIOGRAFIA

- Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S., *Amphiphilic block copolymers for drug delivery*. J. Pharm. Sci. 92 (2003) 1343-1355.
- Allen C., Maysinger D., Eisenberg A., *Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery*. Colloids Surf B Biointerfaces 16, (1999) 3–27.
- Alyautdin RN., Reichel A., Lobenberg R., Ramge P., Kreuter J., Begley DJ., *Interaction of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier in vivo and in vitro*. J. Drug Target. 9 (2001) 209-211.
- Amstad E., Zurcher S., Mashaghi A., Wong JY., Textor M., Reimhult E., *Surface functionalization of single superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted magnetic resonance imaging*. Small. 5(2009) 1334–1342.
- Andrianov K., Payne L.G., *Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates*. Adv. Drug delivery Rev. 34 (1998) 155-170.
- Antony AC., *The biological chemistry of folate receptors*. Blood, 79 (1992) 2807-2820.
- Arbab AS., Wilson LB., Ashari P., Jordan EK., Lewis BK., Frank JA., *A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging*. NMR Biomed. 18 (2005) 383–389.
- Astafieva I., Zhong X., Eisenberg A., *Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solution*. Macromolecules 26 (1993) 7339–7352.
- Attwood D, Florence AT., (Eds.), *Surfactant Systems*. Chapman and Hall, London, UK (1983).
- Babes L., Denizot B., Tanguy G., Le Jeune JJ., Jallet P., *Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study*. J. Coll. Int. Sci. 212 (1999) 474–482.
- Babic M, Horak D, Trchova M, Jendelová P., Glogarová K., Lesný P.; Herynek V., Hájek M., Syková E., *Poly (L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling*. Bioconjug. Chem. 19 (2008) 740–750.
- Bader H., Ringsdorf H., Schmidt B. *Water soluble polymers in medicine*. Angew. Makromol. Chem. 123 (1984) 457–485.
- Bae YH., *Drug targeting and tumor heterogeneity*. J. Control. Release 133 (2009) 2–3.
- Bailey RL., *Lesser known applications of ferrofluids*. J. Magn. Magn. Mater. 39 (1983) 178–182.

- Barry SE., *Challenges in the development of magnetic particles for therapeutic applications*. Int. J. Hyperthermia 24 (2008) 451–466.
- Bean CP., Livingston JD. *Superparamagnetism*. J. Appl. Phys. 30 (1959) 120S–129S.
- Benahmed A., Ranger M., Leroux JC., *Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(Nvinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide)*. Pharm. Res. 18 (2001) 323-328.
- Berry CC., Curtis ASG., *Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. J. Phys. D: Appl. Phys. 36 (2003) R198–206.
- Bilbao G., Gomez-Navarro J., Curiel D., In: Walden P, et al., editors. *Targeted adenoviral vectors for cancer gene therapy*. New York: Plenum Press 1998. p. 365–74.
- Bothun GD., Lelis A., Chen Y., Scully K., Anderson LE., Stoner MA., *Multicomponent folate-targeted magnetoliposomes: design, characterization, and cellular uptake*. Nanomedicine: NBM 7 (2011) 797-805.
- Briley-Saebo K., Bjornerud A., Grant D., Ahlstrom H., Berg T., Kindberg GM., *Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging*. Cell Tissue Res. 316 (2004) 315–323.
- Bueno R., Appasani K., Mercer H., Lester S., Sugarbaker D. *The alpha folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma*. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 121 (2001) 225-233.
- Bulte JWM., Douglas T., Witwer B., Zhang SC., Strable E., Lewis BK., Zywicke H., Miller B., van Gelderen P., Moskowitz BM., Duncan ID., Frank JA., *Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells*. Nat Biotechnol. 19 (2011) 1141–1147.
- Butoescu N., Seemayer CA., Foti M., Jordan O., Doelker E., *Dexamethasone-containing PLGA superparamagnetic microparticles as carriers for the local treatment of arthritis*. Biomaterials 30 (2009) 1772–1780.
- Calvo P., Gouritin B., Brigger I., Lasmezas C., Deslys J., Williams A., Andreux JP., Dormont D., Couvreur P., *Pegylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion diseases*. J. Neurosci. Methods 111 (2001) 151-155.
- Cattell L., Ceruti M., Balliano G., Viola F., Grosa G., Rocco F., Brusa P., *2,3-Oxidosqualene cyclase: from azasqualenes to new site-directed inhibitors*. Lipids 30 (1995) 235-246.

- Cavallaro G., Licciardi M., Caliceti P., Salmaso S., Giammona G., *Synthesis, physico-chemical and biological characterization of a paclitaxel macromolecular prodrug*. *Europ. J. of Pharmac. And Biopharmac.* 58 (2004a) 151-159.
- Cavallaro G., Licciardi M., Di Stefano M., Pitarresi G., Giammona G., *New self-assembling polyaspartamide-based brush copolymers obtained by atom transfer radical polymerization*. *Macromolecules* 42 (2009) 3247-3257.
- Cavallaro G., Licciardi M., Pitarresi G., Giammona G. *Folate-mediated targeting of polymers as components of colloidal drug delivery systems in Handbook of drug targeting and monitoring*. Edited B. Andreev, V. Egorov, Nova Science Publishers, Inc. NY Chapter 6 (2010) 165-178.
- Cavallaro G., Maniscalco L., Licciardi M., Giammona G., *Tamoxifen-Loaded Polymeric Micelles: Preparation, Physico-Chemical Characterization and In Vitro Evaluation Studies*. *Macromol. Biosci.* 4 (2004b) 1028–1038.
- Cavallaro G., Scirè S., Licciardi M., Ogris M., Wagner E., Giammona G. *Polyhydroxyethylaspartamide-spermine copolymers: Efficient vectors for gene delivery*. *J. Control. Release* 131 (2008) 54-63.
- Ceruti M., Balliano G., Rocco F., Lenhart A., Schulz G.E., Castelli F., Milla P., *Synthesis and biological activity of new iodoacetamide derivatives on mutants of squalene-hopene cyclase*. *Lipids* 40 (2005) 729-735.
- Ceruti M., Rocco F., Viola F., Balliano G., Grosa G., Dosio F., Cattel L., *Synthesis and biological activity of 19-azasqualene 2,3-epoxide as inhibitor of 2,3-oxidosqualene cyclase*. *Eur. J. Med. Chem.* 28 (1993) 675-682.
- Chen C., *Magnetism and metallurgy of soft magnetic materials*. New York: Dover Publications, Inc. (1986).
- Chen H., Ebner AD., Kaminski MD., Rosengart AJ., Ritter JA., *Analysis of magnetic drug carrier particle capture by a magnetizable intravascular stent-2: parametric study with multi-wire two-dimensional model*. *J. Magn. Magn. Mater.* 293(2005) 616–632.
- Chen J., Jiang M., Zhang Y., Zhou H., *Fluorescence studies on hydrophobic association of fluorocarbon-modified poly(acrylic acid) solution*. *Macromolecules* 32 (1999) 4862-4866.
- Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune JJ., Jallet P., *Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution*. *J. Microencapsul.* 13 (1996) 245–255.
- Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune JJ., Jallet P., *Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution*. *J. Microencapsul.* 13 (1996) 245–255.

BIBLIOGRAFIA

- Coessens V., Pintauer T., Matyjaszewski K., *Functional polymers by atom transfer radical polymerization*. Prog. Polym. Sci. 26 (2001) 337–377.
- Cooper EL., *From Darwin and Metchnikoff to Burnet and beyond*. Contrib. Microbiol. 15 (2008) 1–11.
- Corot C., Robert P., Idee JM., Port M., *Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging*. Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (2006) 1471–1504.
- Craparo EF., Ognibene MC., Casaletto MP., Pitarresi G., Teresi G., Giammona G., *Biocompatible polymeric micelles with polysorbate 80 for use in brain targeting*. Nanotechnology 19 (2008) 48563-48575.
- Craparo EF., Teresi G., Ognibene MC., Cataletto MP., Bondi ML., Cavallaro G. *Nanoparticles based on novel amphiphilic polyaspartamide copolymers*. J. Nanopart. Res. 12 (2010) 2629-2644.
- Cuatrecasas P., Roth TF., editors. *Receptor-mediated endocytosis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1983 [Hardbound, ISBN 0-412-24820-4].
- Danhier F., Feron O., Pr at V., *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. J. Control. Release 148 (2010) 135-146
- Dash PR., Read ML., Fisher KD., Howard KA., Wolfert M., Oupicky D., Subr V., Strohalm J., Ulbrich K., Seymour LW., *Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin*. J. Biol. Chem. 275 (2000) 3793-3802.
- Dehouck B., Dehouck MP., Fruchart J. C., Cecchelli R., *Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes*. J. Cell. Biol. 126 (1994) 465-473.
- Denizot B., Tanguy G., Hindre F., Rump E., Jeune J., Jallet P., *Phosphorylcholine coating of iron oxide nanoparticles*. J. Coll. Interf. Sci. 209 (1999) 66–71.
- Dobson J., *Magnetic nanoparticles for drug delivery*. Drug Dev. Res. 67 (2006) 55–60.
- Doche de Laquintane B., Dousset V., Solanilla A., Petry KG., Ripoche J., *Iron particle labeling of haematopoietic progenitor cells: an in vitro study*. Biosci Rep 22 (2002) 549–554.
- Dormer K., Seeney C., Lewelling K., Lian G., Gibson D., Johnson M., *Epithelial internalization of superparamagnetic nanoparticles and response to external field*. Biomaterials 26 (2005) 2061–2072.

BIBLIOGRAFIA

- Douziech-Eyrolles L., Marchais H., Herve K., Munnier E., Soucé M., Linassier C., Dubois P., Chourpa I., *Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Int J Nanomedicine 2 (2007) 541–550.
- Dufresne MH., Fournier E., Jones MC., Ranger M., Leroux JC., *Block copolymer micelles-engineering versatile carriers for drugs and biomacromolecules*. R.Gurney (Ed.), B.T. Gattefossè, Gattefossè, Saint-Priest 96 (2003) 87-102.
- Elnakat H., Ratnam M., *Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy*. Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 1067-1084.
- Fadeel B., Garcia-Bennett AE., *Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications*. Adv Drug Deliv Rev. 62 (2010) 362–374.
- Faraday M., *Experimental relations of gold (and other metals) to light*. Philos. Trans. R. Soc. London, (1857) 147-145.
- Ferrucci JT., *Iron oxide enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first five years*. Keio J.Med. 40 (1991) 206–214.
- Frank JA., Miller BR., Arbab AS., Zywicke HA., Jordan EK., Lewis BK., Bryant H., Bulte JWM., *Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents*. Radiology 228 (2003) 480–487.
- Freeman MW., Arrott A., Watson JHL., *Magnetism in medicine*. J. Appl. Phys. 31 (1960) S404.
- Gao F., Yan Z., Zhou J., Cai Y., Tang J., *Methotrexate-conjugated magnetic nanoparticles for thermochemotherapy and magnetic resonance imaging of tumor*. J. Nanopart. Res. 14 (2012) 1160-1170.
- Gao Z., Eisenberg A., *A model of micellization for block copolymers in solutions*. Macromolecules 26 (1993) 7353–7360.
- Gao ZG., Fain HD., Rapoport N., *Controlled and targeted tumor chemotherapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound*. J. Control. Release 102 (2005) 203-222.
- Garin-Chesa P., Campbell I., Saigo P., Lewis J., Old L., Rettig W. *Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein*. Am. J. Pathol. 142 (1993) 557-567.
- Giammona G., Carlisi B., Palazzo S., *Reaction of $\alpha\beta$ -poly(N-hydroxyethyl)DL-aspartamide with derivatives of carboxylic acids*. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 25 (1987) 2813-2818.

- Gittlemann J.I., Abeles B., Bosowski S., *Superparamagnetism and relaxation effects in granular Ni-SiO₂ and Ni-Al₂O₃ films*. Phys. Rev. B 9 (1974) 3891.
- Gordon RT., Hines JR., Gordon D., *Intracellular hyperthermia. A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations*. Med. Hypothesis 5 (1979) 83–102.
- Gosk, T.Moos, C. Gottstein, G. Bendas, VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo, Biochim. Biophys. Acta 1778 (2008) 854–863
- Goya GF., Berquo TS., Fonseca FC., *Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles*. J. Appl. Phys. 94 (2003) 3520–3528.
- Gruner BA., Weitman SD. *The folate receptor as a potential therapeutic anticancer target*. Invest. New Drugs 16 (1998) 205-219.
- Gu JL., Xu HF., Han YH., Dai W., Hao W., Wang CY., Gu N., Xu HY., Cao JM., *The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264. 7 cell*. Sci. China Life Sci. 54 (2011) 793–805.
- Gullotti E., Yeo Y., *Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery*. Mol. Pharm. 6 (2009) 1041–1051.
- Guo M., Que C., Wang C., Liu X., Yan H., Liu K. *Multifunctional superparamagnetic nanocarriers with folate-mediated and pH-responsive targeting properties for anticancer drug delivery*. Biomaterials (2011) 185-94.
- Gupta AK., Berry C., Gupta M., Curtis A., *Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis*. IEEE Trans Nanobiosci 2 (2003) 256–261.
- Gupta AK., Curtis ASG., *Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors*. Biomaterials 25 (2004a) 3029–40.
- Gupta AK., Gupta M., *Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles*. Biomaterials 26 (2005b) 1565–1573
- Gupta AK., Gupta M., *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*; Biomaterials 26 (2005a) 3995-4021.
- Gupta AK., Wells S., *Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies*. IEEE Trans Nanobioscience 3 (2004b) 66–73.
- Haley B., Frenkel E., *Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment*. Urol. Oncol. 26 (2008) 57–64.

- Hamley IW., *Nanotechnology with soft materials*. Angew. Chem. Int. Ed. 42 (2003) 1692–1712.
- Handgretinger R., Lang P., Schumm M., Taylor G., Neu S., Koscielnak E., Niethammer D., Klingebiel T., *Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting*. Bone Marrow Transplant 21 (1998) 987–993.
- Hanini A., Schmitt A., Kacem K., Chau F., Ammar S., Gavard J., *Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility*. Int J. Nanomedicine 6 (2011) 787–794.
- Harada A., Kataoka K., *Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core. Preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium*. Macromolecules 31 (1998) 288-294.
- Harris JM., Chess RB., *Effect of pegylation on pharmaceuticals*. Nat. Rev. Drug Discov. 2 (2003) 214–221.
- Heldin CH., Rubin K., Pietras K., Ostman, A., *High interstitialfluid pressure-an obstacle in cancertherapy*. Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 806–813.
- Hofmann-Antenbrink M., Hofmann H., Montef X., *Superparamagnetic nanoparticles - a tool for early diagnostics*, S.M.W. (2010) 1-2.
- Horák D., Babič M., Jendelová P., Herynek V., Trchová M., Pientka Z., Pollert E., Hájek M., Syková E., *D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling*. Bioconj Chem. 18 (2007) 635–644.
- Horoszewicz JS., Leong SS., Kawinski E., Karr JP., Rosenthal H., Chu TM., Mirand EA., Murphy GP., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. Cancer Res. 43 (1983) 1809-1818.
- Huang X, Li L, Liu T, Hao N., Liu H., Chen D Tang F., *The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo*. ACS Nano 5 (2011) 5390–5399.
- Hwang KJ., *Liposome pharmacokinetics*. M. Ostro (Ed.), Liposomes, Biophysics to Therapeutics, Marcel Dekker, New York (1987) 109–156.
- Inoue T., Chen G., Nakamae K., Hoffman A. S., *An AB block copolymers of oligo(methyl methacrylate) and poly(acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs*. J. Control. Release 51(1998) 221-229.
- Iyer AK., Khaled G., Fang J., Maeda H., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumortargeting*. Drug Discov. Today 11 (2006) 812–818.

- Jendelová P., Herynek V., DeCroos J., Glogarová K., Andersson B., Hájek M., Syková E., *Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles*. Magn Reson Med. 50(2003) 767–776.
- Johnson SD., Anderson JM., Marchant RE., *Biocompatibility studies on plasma polymerized interface materials encompassing both hydrophobic and hydrophilic surfaces*. J. Biomed. Mater. Res. 26 (1992) 915-935.
- Jones M., Leroux J., *Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 48 (1999) 101-111.
- Jule E., Nagasaki Y., Kataoka K., *Lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity toward a protein bed simulating a cell surface. A surface plasmon resonance study*. Bioconjug. Chem., 14 (2003) 177-186.
- Kabanov AV., Kabanov VA., *Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects*. Adv. Drug Deliv. Rev. 30 (1990) 49-60.
- Katayose S. and Kataoka K., *Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer*. J. Pharm. Sci. 87 (1998) 160-163.
- Khalafalla SE., Reimers GW., *Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids*. IEEE Trans. Magnet. 16 (1980) 178–183.
- Kim DK., Toprak M., Mikhailova M., Zhang Y., Bjelke B., Kehr J., Muhammed M., *Surface modification of superparamagnetic nanoparticles for in-vivo biomedical applications*. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 704 (2002) W11.2.1–W11.2.6.
- Kreute J., Alyautdin RN., Kharkevich DA., Ivanov AA., *Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles)*. Brain Res. 674 (1995) 171-174.
- Kreuter J., *Nanoparticulate system for brain delivery of drug*. Adv. Drug Deliv. Rev. 47 (2001) 65-81.
- Kreuter J., Petrov VE., Kharkevich DA., Alyautdin RN. *Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood–brain barrier using surfactant-coated nanoparticles*. J. Control. Release 49 (1997) 81-87.
- Kreuter J., Shamenkov D., Petrov V., Cychutek K., Koch-Brandt C., Alyautdin R. *Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood brain barrier*. J. Drug Target. 10 (2002) 317-325.
- Kumar MV., Tindall DJ., *Transcriptional regulation of the steroid receptor genes*. Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 59 (1998) 289–306.

- Kwon G.S., *Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds*. Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. 20 (2003) 357-403.
- Kwon G.S., Kataoka K., *Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles*. Adv. Drug Deliv. Rev. 16 (1995) 295–309.
- Langer R., *Drug delivery and targeting*. Nature 392 (1998) 5–10.
- Langer R., Peppas N.A., *Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology*. AIChE J. 49 (2003) 2990–3006.
- Leamon C.P., Low P.S. *Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 5572-5576.
- Leamon C.P., DePrince R.B., Hendren R.W., *Folate-mediated drug delivery: effect of alternative conjugation chemistry*. J. Drug Target. 7 (1999) 157-169.
- Leamon C.P., Low P.S. *Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery*. Research Focus 6 (2001) 44-50.
- Lee H., Shao H.P., Huang Y.Q., Kwak K.B., *Synthesis of MRI contrast agent by coating superparamagnetic iron oxide with chitosan*. IEEE Trans. Magn. 41 (2005) 4102–4104.
- Levy M., Lagarde F., Maraloiu V.A., Blanchin M.G., Gendron F., Wilhelm C., Gazeau F., *Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties*. Nanotechnology 21 (2010) 395103.
- Li J.K., Wang N., Wu X.E., *A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery*. J. Pharm. Sci. 86 (1997) 891–895.
- Liaw J., Chang S.F., Hsiao F.C., *In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (peo-ppo-peo) polymeric micelles*. Gene Ther. 8 (2001) 999-1004.
- Licciardi M., Campisi M., Cavallaro G., Azzolina A., Giammona G., *Synthesis and characterization of polyaminoacidic polycations for gene delivery*. Biomaterials 27 (2006) 2066-2075.
- Licciardi M., Craparo E.F., Giammona G., Armes S.P., Tang Y., Lewis A.L., *In vitro Biological Evaluation of Folate-Functionalized Block Copolymer Micelles for Selective Anti-Cancer Drug Delivery*. Macromol. Biosci. 8 (2008) 615–626.
- Licciardi M., Cavallaro G., Di Stefano M., Pitarresi G., Fiorica C., Giammona G., *New self-assembling polyaspartylhydrazide copolymer micelles for anticancer drug delivery*. Int. J. Pharm. 396 (2010) 219-228.

- Licciardi M., Di Stefano M., Craparo EF., Amato G., Cavallaro G., Fontana G., Giammona G., *PHEA-graft-polybutylmethacrylate copolymer microparticles for delivery of hydrophobic drugs*. Int. J.Pharm. 433 (2012) 16-24.
- Licciardi M., Scialabba C., Cavallaro G., Sangregorio C., Fantechi E., Giammona G., *Cell Uptake Enhancement of Folate Targeted Polymer Coated Magnetic Nanoparticles*. J. Bio. Nanotech. 9 (2013) 1–16.
- Liggins RT., Burt HM., *Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations*. Adv. Drug Deliv. Rev. 54(2002) 191–202.
- Lin J., Zhu J., Chen T., Lin S., Cai C., Zhang I., Zhuang Y., Wang X., *Drug releasing behaviour of hybrid micelles containing polypeptide triblock copolymer*. Biomaterials 30 (2009) 401-407.
- Lin MM., Kim DK., El Haj A., Dobson J., “*Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) for Translation to Clinical Applications*”. Nanobioscience 7 (2008) 299-302.
- Lipinski C.A., *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 44 (2000) 235-249.
- Liu SY., Han Y., Yin LP., Long L., Liu R., *Toxicology studies of a superparamagnetic iron oxide nanoparticle in vivo*. Adv. Mater. Res. 47 (2008) 1097–1100.
- Liz-Marza'n LM., Kamat PV., *Nanoscale Materials*. Boston: Kluwer Academic Publishers (2003).
- Lu Y., Low PS. *Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents*. Adv. Drug Deliv. Rev. 54 (2002) 675-693.
- Luck M. *Plasmaproteinadsorption als möglicher Schlüsselfaktor für eine kontrollierte Arzneistoffapplikation mit partikulären Trägern*. Ph.D. thesis. Berlin: Freie Universität (1997).
- Luppi B., Orienti I., Bigucci F., Cerchiara T., Zuccari G., Fazzi S., Zecchi V., *Poly(vinylalcohol-co-vinylolate) for the preparation of micelles enhancing retinyl palmitate transcutaneous permeation*. Drug Deliv. 9 (2002) 147-152.
- Lyon JL., Fleming DA., Stone MB., Schiffer P., Williams ME., *Synthesis of Fe oxide core/Au shell nanoparticles by iterative hydroxylamine seeding*. Nano Lett. 4 (2004) 719–723.
- Maeda H., Bharate GY., Daruwalla J., *Polymeric drugs for efficient tumor targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 71 (2009) 409–419.

- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics*. J. Contr. Rel. 65 (2000) 271–284.
- Mahmoudi M., Laurent S., *Controlling the Burst Effect of a Drug by Introducing Starch in the Structure of Magnetic Polyurethane Microspheres Containing Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*. Scientia Nanotechnology 17 (2010) 43–51.
- Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surfacemodification and applications in chemotherapy*. Adv. Drug Delivery Rev. 63 (2011) 24–46.
- Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy*. Adv. Drug Deliv. Rev. 63 (2011) 24–46.
- Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Haifeli UO., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with rigid cross-linked polyethylene glycol fumarate coating for application in imaging and drug delivery*. J. Phys. Chem. C. 113 (2009b) 8124–8131.
- Mahmoudi M., Simchi A., Milani AS., Stroeve P., *Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. J. Colloid Interface Sci. 336 (2009a) 510–518.
- Mahmoudi M., Simchi A., Vali H., Imani M., Shokrgozar MA., Azadmanesh K., Azari F., *Cytotoxicity and cell cycle effects of bare and oly (vinyl alcohol)-coated iron oxide nanoparticles in mouse fibroblasts*. Adv. Eng. Mater. 11 (2009c) B243–B250.
- Mailänder V., Lorenz MR., Holzapfel V., Musyanovych A., Fuchs K., Wiesneth M., Walther P., Landfester K., Schrezenmeier H., *Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents*. Mol Imaging Biol. 10 (2008) 138–146.
- Malam Y., Loizidou M., Seifalian AM., *Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer*. Trends Pharmacol. Sci. 30 (2009) 592–599.
- Marchasin S., Wallerstein RO., *The treatment of iron-deficiency anemia with intravenous iron dextran*. Blood 23 (1964) 354–358.
- Marques C.M., *Bunchy micelles*. Langmuir 13 (1997) 1430–1433.
- Martin A., Physical Pharmacy, 4th Edition, Williams and Wilkins. Baltimore, MD, (1993), 396–398
- Massart R., *Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media*. IEEE Trans Magn. 17 (1981) 1247–1248.

- Massia SP., Stark J., Letbetter DS., *Surface immobilized dextran limits cell adhesion and spreading*. Biomaterials 21 (2000) 2253–2261.
- Mendichi R., Schieroni A.G., Cavallaro G., Licciardi M., Giammona G., *Molecular characterization of α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide derivatives as potential self-assembling copolymers forming polymeric micelles*. Polymer 44 (2003) 4871-4879.
- Meresse S., Delbart C., Fruchart J.C., Cecchelli R., *Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries*. J. Neurochem. 53 (1989) 340-345.
- Millan A., Urtizbera A., Silva NJO., Palacio F., Amaral VS., Snoeck V., Serin V., *Surface effects in maghemite nanoparticles*. J. Magn. Mater. L5 (2007) 312.
- Miller E., Peppas NA., Winslow DN., *Morphological changes of ethylene/vinyl acetate based on controlled delivery systems during release of water-soluble solutes*. J. Memb. Sci. 14 (1983) 79–92.
- Miyoshi S., Flexman JA., Cross DJ., Maravilla KR., Kim Y., Anzai Y., Oshima J., Minoshima S., *Transfection of neuroprogenitor cells with iron nanoparticles for magnetic resonance imaging tracking: cell viability, differentiation, and intracellular localization*. Mol. Imaging. Biol. 7 (2005) 286–295.
- Moghimi S.M., *Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: towards development of stealth and target-specific nanocarriers*. Biochim. Biophys. Acta. 1590 (2002) 131-139.
- Mulder WJM., Strijkers GJ., van Tilborg GAF., Griffioen AW., Nicolay K., *Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging*. NMR Biomed. 19 (2006) 142–164.
- Muller RH., *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*. WissenschaftlicheVerlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany, and CRC Press, Boca Raton, FL (1991).
- Murakami M., Ushio Y., Morino Y., Ohta T., Matsukado Y. *Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in human glial neoplasms*. J. Clin. Invest. 82 (1988) 177-188.
- Muranishi N., Takagi N., Muranishi S., Sezaki H., *Effect of fatty acids and monoglycerides on permeability of lipid bilayer*. Chem. Phys. Lipids 28 (1981) 269–279.
- Muzzarelli RAA., Muzzarelli C., “*Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences,*” in *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use*. Adv. Polym. Sci. 186 (2005) 151–209.

- Nagarajan R., Ganesh K., *Block Copolymer Self-Assembly in Selective Solvents: Theory of Solubilization in Spherical Micelles*. *Macromolecules* 22 (1989) 4312-4325.
- Nakashima-Matsushita N., Homma T., Yu S., Matsuda T., Sunahara N., Nakamura T., Tsukano M., Ratnam M., Matsuyama T. *Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum.* 42 (1999) 1609-1616.
- Néel, L., *Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites*. *Ann. Geophys.* 5 (1949) 99.
- Ochekpe NA., Olorunfemi PO., Ngwuluka NC. *Nanotechnology and drug delivery part 1: Background and applications*. *Trop. J. Pharmac. Res.* 8 (2009) 265-274.
- Ognibene MC., Rocco F., Craparo EF., Picone P., Ceruti M., Giammona G., *Biocompatible micelles based on squalene portions linked to PEGylated polyaspartamide as potential colloidal drug carriers*. *Current Nanoscience* 7 (2011) 747-756.
- Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K., *Pegylated nanoparticles for biological and pharmaceutical application*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 403-419.
- Paciotti GF., Kingston DGI., Tamarkin L., *Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors*. *Drug Dev. Res.* 67 (2006) 47-54.
- Palma A., Alvarez LA., Scholz D., Frimannsson DO., Grossi M., Quinn SJ., O'Shea DF. *Cellular uptake mediated off/on responsive near-infrared fluorescent nanoparticles*. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 19618-19621.
- Pankhurst QA., Connolly J., Jones SK., Dobson J., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. *J. Phys. D-Appl. pphys.* 36 (2003) R167-R181.
- Pardoe H., Chua-anusorn W., St Pierre TG., Dobson J., *Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol*. *J. Magn. Mater.* 225 (2001) 41-46.
- Peppas NA., *Intelligent therapeutics: biomimetic systems and nanotechnology in drug delivery*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1529-1531.
- Petri-Fink A., Chastellain M., Juillerat-Jeanneret L., Ferrari A., Hofmann H., *Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells*. *Biomaterials* 26 (2005) 2685-2694.
- Pirollo KF., Chang EH., *Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake?*. *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 552-558.

BIBLIOGRAFIA

- Pitarresi G., Saiano F., Cavallaro G., Mandracchia D., Palumbo F.S., *A new biodegradable and biocompatible hydrogel with polyaminoacid structur.*, Intern. J. of Pharm. 335 (2007) 130-137.
- Ramaswamy M., Zhang X., Burt H., Wasan KM., *Human plasma distribution of free paclitaxel and paclitaxel associated with diblock copolymers.* J. Pharm. Sci. 86 (1997) 460-464.
- Rao BM., Srinivasu MK., Kumar KP., Bhradwaj N., Ravi R., Mohakhud PK., Reddy GO., Kumar PRA., *stability indicating LC method for rivastigmine hydrogen tartrate.* J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 57–63.
- Reddy JA., Low PS. *Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers.* Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 15 (1998) 587-627.
- Reddy LH., Couvreur P., *Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy.* Adv. Drug Del. Rev. 61 (2009) 1412-1426.
- Riemer J., Hepken H. H., Czerwinska H., Robinson S. R., Dringen R. *Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in culture cells.* Anal. Biochem. 331 (2004) 370-375.
- Rosengart AJ., Kaminski MD., Chen H., Caviness PL., Ebner AD., Ritter JA., *Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: a novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery.* J. Magn. Mater. 293 (2005) 633–638.
- Ross JF., Chaudhuri PK., Ratnam M., *Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines – Physiologic and clinical implications.* Cancer 73 (1994) 2432-2443.
- Ruiz JM., Benoit JP., *In vivo peptide release from poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer 50/50 microspheres.* J. Cont. Rel. 16 (1991) 177–186.
- Sahoo SK. and Labhasetwar V., *Nanotech approaches to drug delivery and imaging.* Drug Discov. Today 8 (2003) 1112-1120.
- Salzman EW., *Polyethyleneglycol oxide as a biomaterial.* Am. J. Soc. Artif. Intern. Organs 6 (1983) 60–72.
- Scherer F., Anton M., Schillinger U., Henke J., Bergemann C., Kruger A., Gansbacher B., Plank C., *Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo.* Gene Ther. 9 (2002) 102–109.
- Schieber MM., *Iron oxides and their compounds In Experimental Magnetochemistry.* Wohlfarth, E. P. Ed.; North-Holland Publishing Company: Amsterdam (1967).

BIBLIOGRAFIA

- Schoepf U., Marecos E., Jain R., Weissleder R., *Intracellular magnetic labelling of lymphocytes for in vivo trafficking studies*. Bio Techniques 24 (1998) 642–651.
- Schroeder U. Sommerfeld P., Sabel B., *Efficacy of oral dalargin loaded nanoparticle delivery across the blood–brain barrier*. Peptides 19 (1998) 777–780.
- Schulze K., Koch A., Schapf B., Petri A., Steitz B., Chastellain M., Hofmann M., Hofmann H., von Rechenberg B., *Intraarticular application of superparamagnetic nanoparticles and their uptake by synovial membrane: an experimental study in sheep*. J Magn Magn Mater. 293 (2005) 419–432.
- Schwertmann U., Cornell RM., *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. Weinheim, Cambridge: VCH (1991).
- Shen F., Ross JF., Wang X., Ratnam M., *Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity*. Biochemistry, 33 (1994) 1209–1215.
- Shi W., Gould MN., *Induction of cytostasis in mammary carcinoma cells treated with the anticancer agent perillyl alcohol*. Carcinogenesis 23 (2002) 131–142.
- Silverstein SB., Rodgers GM., *Parenteral iron therapy options*. Am. J.Hematol. 76 (2004) 74–78.
- Skouras A., Mourtas S., Markoutsas E., De Goltstein MC., Wallon C., Catoen S., Antimisiaris SG., *Magnetoliposomes with high USPIO entrapping efficiency, stability and magnetic properties*. Nanomedicine 7 (2011) 572–579.
- Steitz B, Hofmann H, Kamau SW, Hassa PO., Hottiger MO., von Rechenberg B., Hofmann-Antenbrink M., Petri-Fink A., *Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: size distribution, colloidal properties and DNA interaction*. J Magn Magn Mater. 311(2007) 300–305.
- Storm G., Belliot SO., Daemen T. Lasic DD., *Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system*. Adv. Drug Deliv. Rev. 17 (1995) 31–48.
- Sugimoto T., Matijevic E., *Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels*. J. Colloid Interface Sci. 74 (1980) 227–243.
- Shukla S., Wu G., Chatterjee M., Yang W., Sekido M., Diop LA., Müller R., Sudimack JJ., Lee RJ., Barth RF., Tjarks W., *Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy*. Bioconjugate Chem. 14 (2003) 158–167.

- Takeda S., Mishima F., Fujimoto S., Izumi Y., Nishijima S., *Development of magnetically targeted drug delivery system using superconducting magnet*. J. Magn. Mater. 311 (2007) 367–371.
- Tartaj P., Morales MP., Gonzalez-Carreno T., Veintemillas-Verdaguer S., Serna CJ., *Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications*. J. Magn. Mater. 290 (2005) 28–34.
- Tevell A., Lennernas H., Jonsson M., Norlin M., Lennernas B., Bondesson U., Hedeland M., *Flutamide metabolism in four different species in vitro and identification of flutamide metabolites in human patient urine by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Drug. Metab. Disp. 34 (2006) 984-992.
- Toffoli G., Cernigoi C., Russo A., Gallo A., Bagnoli M., Boiocchi M. *Overexpression of folate binding protein in ovarian cancer*. Int. J. Cancer 74 (1997) 193-198.
- Toncheva V., Schacht E. Ng SY., Barr J., Heller J., *Use of block copolymers of poly(ethylene glycol) micellar carriers as potential tumour targeting system*. J. Drug Target. 11 (2003) 345-353.
- Torchilin VP., *How do polymers prolong circulation time of liposomes?.* J. Liposome Res. 6 (1996) 99–116.
- Torchilin VP., *Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery system*. J. Control. Release 73 (2001) 137-172.
- Torchilin VP., *Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs*. Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 2549-2559.
- Toyokuni S., *Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation*. Free Radic. Biol. Med. 20 (1996) 553–566.
- Turro NJ., Chung CJ., *Photoluminescent probes for water soluble polymers. Pressure and temperature effect on a polyol surfactant*. Macromolecules 17 (1984) 2123–2126.
- Van Duuren BL., Goldschmidt BM., *Co-carcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis*. J. Natl. Cancer Inst. 56 (1976) 1237-1242.
- Veisheh O., Gunn JW., Zhang M., *Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging*. Adv. Drug Deliv. Rev. 62 (2010) 284–304.
- Viola F., Ceruti M., Cattel L., Milla P., Poralla K., Balliano G., *Rationally designed inhibitors as tools for comparing the mechanism of squalene-hopene cyclase with oxidosqualene cyclase*. Lipids 35 (2000) 297-303.

BIBLIOGRAFIA

- Walczak P., Kedziorek DA., Gilad AA., Lin S., Bulte JWM., *Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation*. Magn Reson Med. 54 (2005) 769–774.
- Wang S., Lee RJ., Mathias CJ., Green MA., Low PS., *Synthesis, purification, and tumor cell uptake of ⁶⁷Ga-deferoxamine-folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging*. Bioconjugate Chem. 7 (1996) 56-62.
- Wang J., Chen Y., Chen B., Ding J., Xia G., Gao C., Cheng J., Jin N., Zhou Y., Li X., Tang M., Wang XM., *Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice*. Int. J. Nanomedicine 5 (2010) 861–866.
- Wei Q., Li T., Wang G., Li H., Qian Z., Yang M., *Fe₃O₄ nanoparticles-loaded PEG–PLA polymeric vesicles as labels for ultrasensitive immunosensors*. Biomaterials 31 (2010) 7332-7339.
- Weissleder R., Cheng H.C., Bogdanova A., Bogdanov A., *Magnetically labelled cells can be detected by MR imaging*. J. Magn. Reson. Imaging 7 (1997) 258–63.
- Weissleder R., Stark DD., Engelstad BL., Bacon BR., Compton CC., White DL., Jacobs P., Lewis J., *Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity*. AJR 152 (1989) 167–173.
- Williams BR, Nazarians A, Gill MA. *A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor*. Clin. Ther 25 (2003) 1634-1653.
- Winslow RM., Vandegriff KD., Intaglietta M. (Eds.), *Blood Substitutes*. New Challenges, Birkhauser, Boston, MA (1996).
- Wintsch J., Chaignat C.-L., Braun DG., Jeannet M., Stalder H., Abrignani S., Montagna D., Clavijo F., Moret P., Dayer J.M., et al., *Safety and immunogenicity of a genetically engineered human immunodeficiency virus vaccine*. J. Infect. Dis. 163 (1991) 219–225.
- Wu M., Gunning W., Ratnam M. *Expression of folate receptor type alpha in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus and cervix*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 8 (1999) 775-782.
- Xing L., Mattice WL, *Large internal structures of micelles of triblock copolymers with small insoluble molecules in their cores*. Langmuir 14 (1998) 4074–4080.
- Xiong Q., Rocco F., Wilson WK., Xu R., Ceruti M., Matsuda SPT., *Structure and reactivity of the dammarenyl cation: Configurational transmission in triterpene synthesis*. J. Org. Chem. 70 (2005) 5362-5375.
- Yang SY, Jian ZF, Horng HE, Yang HC., Wu CC., Lee YH., *Dual immobilization and magnetic manipulation of magnetic nanoparticles*. J. Magn. Magn. Mater. 320 (2008) 2688–2691.
- Yang X., Hong H., Grailer JJ., Rowland IJ., Javadi A., Hurley SA., *cRGD-functionalized, DOX-conjugated, and ⁶⁴Cu-labeled superparamagnetic iron oxide*

nanoparticles for targeted anticancer drug delivery and PET/MR imaging. Biomaterials 32 (2011) 4151-4160.

- Yellen BB., Forbes ZG., Halverson DS., Fridman G., Barbee KA., Chorny M., Levy R., Friedman G., *Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications.* J. Magn. Magn. Mater. 293(2005) 647–654.
- Ying XY., Du YZ., Hong LH., Yuan H., Hu FQ., *Magnetic lipid nanoparticles loading doxorubicin for intracellular delivery: Preparation and characteristics.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials 323 (2011) 1088-1093.
- Yokoyama M., Miyauchi M., Yamada N., Okano T. Sakurai Y., Kataoka K., Inoue S., *Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(8-ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer.* Cancer Res. 50 (1990) 1693-1700.
- Yokoyama M., *Novel passive targetable drug delivery with polymeric micelles.* T. Okano (Ed), Biorelated polymers and gels, Accademic Press, San Diego, (1998) 193-229.
- Zhang L., Eisenberg A., *Multiple morphologies of ‘crew-cut’ aggregates of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) block copoly-mers.* Science 268 (1995) 1728–1731.
- Zhang X., Burt HM., Mangold G., Dexter D., Von Hoff D., Mayer L., Hunter WL., *Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel.* Anti J. cancer Drugs 8 (1997) 696–701.
- Zhang, ZJ., Song, Q., *Correlation between spin-orbital coupling and the superparamagnetic properties in magnetite and cobalt ferrite spinel nanocrystals.* J.Phys.Chem. B 110 (2006) 11205.
- Zou P., Yu Y., Wang YA., Zhong Y., Welton A., Galba'n C., Wang S., Sun D., *Superparamagnetic iron oxide nanotheranostics for targeted cancer cell imaging and pH-dependent intracellular drug release;* Molecular Pharmaceutics 7 (2010) 1974-1984.