

INDICE

1. Introduzione	3
2. Stato dell'arte	9
2.1 – Tecnica della nanoprecipitazione.....	9
2.2 – Fluorofori	9
2.2.1 – Sulfurodamina B	10
2.2.2 – Atto carbossi 655.....	11
2.2.3 – Nile red.....	12
2.3 – Obiettivi	13
3. Materiali e metodi	14
3.1 – Materiali	14
3.2 – Metodi	15
3.2.1 – Formulazione NP.....	15
3.2.2 – Caratterizzazione delle nanoparticelle	16
3.2.3 – Resa	17
4. Risultati e discussione	19
4.1 – NP caricate con la sulfurodamina B.....	19
4.2 – NP caricate con l'atto carbossi 655.....	20
4.3 – NP caricate con il nile red.....	21
5. Conclusioni e prospettive future	23
6. Riferimenti	24

1. Introduzione

Nell'ambito delle terapie antitumorali avanzate, le strategie di direccionamento dei farmaci sono di importanza cruciale in quanto i farmaci antitumorali generalmente hanno un'azione aspecifica e non possono discriminare le cellule normali e quelle tumorali. Pertanto, gli effetti benefici dei farmaci antitumorali sono quasi sempre accompagnati da effetti tossici, con vari livelli di gravità.

Negli ultimi decenni, le terapie contro il cancro basate sulle nanoparticelle (NP) hanno attirato un grande interesse poiché, ingegnerizzando opportunamente la loro formulazione, possono incapsulare virtualmente qualunque farmaco antitumorale. Inoltre, le NP possono essere formulate in modo da controllare la cinetica di rilascio dei farmaci caricati e, quando possibile, il sito bersaglio (Brigger *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2008). Quest'ultimo è un aspetto particolarmente interessante dello sviluppo di NP che vengono progettate per regolare la biodistribuzione dei farmaci caricati e limitare i loro effetti collaterali sistematici (Blanco *et al.*, 2011; Farokhzad *et al.*, 2009).

Ad oggi, le NP possono essere dotate di proprietà di direccionamento passivo e attivo. Nel primo caso, l'accumulo delle NP nel sito tumorale bersaglio può essere favorito sfruttando l'effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (*Enhanced Permeability and Retention Effect*, EPR) dei tessuti tumorali. Infatti, tramite l'utilizzo di NP è possibile raggiungere ~82% dell'accumulo totale all'interno della massa tumorale in un arco di tempo di una sola emivita (Ngoune *et al.*, 2016). Tale effetto è dovuto al fatto che i tumori solidi presentano un'architettura vascolare generalmente caotica che favorisce il ristagno linfatico. Inoltre, i capillari afferenti ai tumori sono generalmente immaturi e presentano fenestrature di elevato diametro, generalmente di dimensioni superiori rispetto ai tessuti sani (Yuan *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 2002; Hida *et al.*, 2018); questa caratteristica è

correlata all'aumentata permeabilità vascolare di molti tessuti tumorali, ed è necessaria affinché sia supportata l'elevata crescita tumorale che richiede un adeguato supplemento di ossigeno e nutrienti (Maeda H *et al.*, 2000). In questo contesto, nanoparticelle che presentino in superficie un materiale idrofilo come il polietilenglicole (*polyethylene glycol*, PEG), se somministrate per via parenterale possono eludere la captazione da parte dei macrofagi e quindi circolare per tempi prolungati (Biondi *et al.*, 2013; Vonarbourg *et al.*, 2006; Torchilin, 2006). Questo aumenta la probabilità che le NP caricate con i farmaci si depositino nel sito tumorale bersaglio (Bae *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005). Nonostante il direccionamento passivo sia tuttora considerato basilare nell'ottica di un rilascio selettivo di farmaci, la sua efficacia è limitata ad alcuni punti percentuali della dose somministrata (Bae *et al.*, 2011). Questo può essere ascritto a una possibile mancata internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule bersaglio e/o ad un indesiderato rilascio del farmaco caricato prima dell'assorbimento delle nanoparticelle (Choi *et al.*, 2010).

Quindi, la selettività delle NP verso i tumori può essere aumentata dotando NP che possono sfruttare l'effetto EPR di proprietà di direccionamento attivo (Blanco *et al.*, 2011; Ferrari, 2005). Grazie alla presenza di anticorpi (Lukyanov *et al.*, 2004; Sapra & Allen, 2002), acidi nucleici (Farokhzad *et al.*, 2006) o folati (Byrne *et al.*, 2008; Sudimack & Lee, 2000) disposti sulla loro superficie esterna, le NP possono riconoscere specificamente e legare le cellule tumorali, in modo da sfruttare a loro vantaggio anche il processo di endocitosi recettore mediata ed essere efficacemente internalizzate (Byrne *et al.*, 2008; Peer *et al.*, 2007; Torchilin, 2006). Tra le molecole citate, gli anticorpi rappresentano quelle con la maggior capacità di riconoscere specificatamente il proprio target, data la presenza di una regione variabile strutturata per il proprio antigene. Purtroppo, per ridurre la massa delle immunoglobuline, affinché restino localizzate nella superficie esterna delle NP, queste sono private della regione costante e ciò può indurre

a un'indesiderata interazione con altre cellule o a una fagocitosi prematura. A ciò si aggiungono sia problemi di immunogenicità sia una ridotta specificità derivante dalla coniugazione delle immunoglobuline al PEG (Byrne *et al.*, 2008). Quindi, per ridurre la possibilità dell'attivazione di una risposta immunitaria in seguito alla somministrazione delle NP, la loro funzionalizzazione con molecole endogene è una strada preferibile. Infatti, molti studi sono stati incentrati sui folati, in particolar modo sull'acido folico, che è una vitamina idrosolubile del gruppo B necessaria per tutte le reazioni di sintesi, riparazione e metilazione del DNA. Le NP rivestite con acido folico presentano un'elevata selettività nei confronti dei tessuti neoplastici, in quanto questi sovraesprimono il recettore specifico per l'acido folico, necessario per supportare l'elevato tasso di crescita delle cellule tumorali (Byrne *et al.*, 2008; Sudimack & Lee, 2000).

In quest'ottica, l'acido ialuronico (HA), che è un polisaccaride anionico ubiquitario nel tessuto connettivo di tutti i mammiferi (Almond, 2007; Maltese *et al.*, 2006), ha attratto una significativa attenzione nella ricerca per il targeting tumorale, in virtù della sua elevata biocompatibilità e non-immunogenicità (Choi *et al.*, 2010; Ossipov, 2010). Inoltre, l'HA è una molecola fortemente idrofila che può specificatamente legare i recettori CD44 e RHAMM (Toole, 2004), che sono sovraespressi nelle popolazioni cellulari di molti tessuti tumorali (Gotte & Yip, 2006; Toole, 2004).

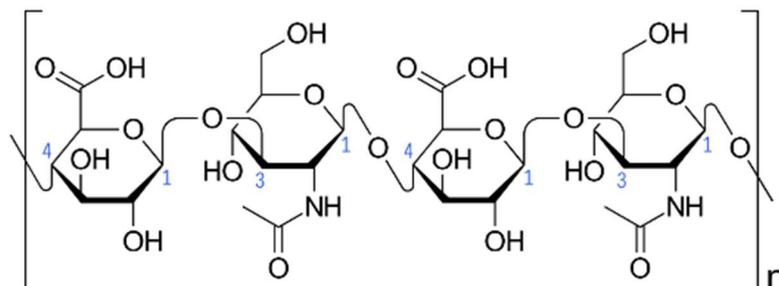


Fig. 1. Due unità ripetute di disaccaride dell'acido ialuronico (HA)

polianione. Questi, si dispongono strato su strato intorno al nucleo delle NP mediante interazione ione-controione. Ripetendo l'operazione, le NP vengono rivestite dai polianioni alternati. Tale tecnica è vantaggiosa poiché permette di ottenere NP dotate di un rivestimento esterno molto stabile sfruttando proprio l'interazione ionica. D'altra parte, il rivestimento con numerosi strati di polielettroliti implica inevitabilmente un aumento delle dimensioni delle NP. Inoltre, la natura multistep del processo comporta tempi lunghi di preparazione (Ai *et al.*, 2003; Ramasamy *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2019).

Pertanto, l'obiettivo di questo lavoro è stato la produzione di NP biodegradabili a base di acido polilattico-co-glicolico (PLGA) esternamente decorate con HA mediante interazioni fisiche. Il PLGA è stato scelto perché è un materiale d'elezione nella produzione di dispositivi di rilascio controllato di farmaci in virtù della sua ben nota biodegradabilità, biocompatibilità e non-immunogenicità, e per il fatto che in vivo si degrada in acido lattico e acido glicolico, che sono composti endogeni e vengono normalmente escreti attraverso il ciclo di Krebs (Makadia *et al.*, 2011).

In particolare, il PLGA, che è idrofobo, è stato legato all'HA, che è idrofilo, sfruttando i polossameri come molecole ponte tra l'HA e il PLGA (Fig. 3). I polossameri sono copolimeri triblocco formati da segmenti di poli(etilene ossido)-poli(propilene ossido)-poli(etilene ossido) (PEO-PPO-PEO), che mostrano proprietà anfifiliche grazie alla presenza nello scheletro polimerico dei segmenti idrofilici di PEO e intercalati da quelli di PPO, che sono idrofobici. Grazie a tale architettura della catena polimerica, i polossameri sono anfifilici, e questo gli permette di essere affini sia a molecole idrofile che idrofobe (Mayol *et al.*, 2015).

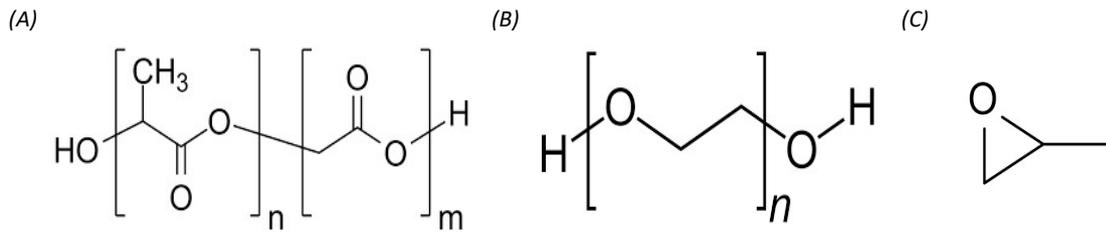


Fig. 3. Da sinistra a destra, formule di struttura di: PLGA (A), polietilenossido (B) e ossido di propilene (C)

Un aspetto cruciale delle NP è la loro possibilità di essere visibili in fluorescenza, allo scopo di visualizzare la loro localizzazione in esperimenti *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. A questo scopo, in questo lavoro di tesi è stato studiato il caricamento di tre diversi fluorofori, ovvero la sulforodamina B, l'atto carbossi 655 e il Nile red nelle NP formulate. Le NP sono state preparate mediante la tecnica della nanoprecipitazione con delle leggere modifiche. Per ogni fluoroforo, sono state preparate tre differenti formulazioni: in particolare, sono state prodotte: i) NP controllo, costituite da di solo PLGA (NP_P); NP dotate di sole proprietà di direccionamento passivo, costituite da PLGA e polossameri (NP_PP); iii) NP decorate con HA, dotate di proprietà di direccionamento attivo e passivo (NP_HA).

2. Stato dell'arte

2.1 – *Tecnica della nanoprecipitazione*

Le NP sono state formulate tramite la tecnica della nanoprecipitazione, che è una tecnica di produzione che permette di ottenere nanovettori di dimensioni ridotte (< 100 nm) in un unico step. La tecnica della nanoprecipitazione consiste nel caricare un'emulsione o una soluzione in una siringa e nel far precipitare tale carico in una fase disperdente, solitamente acquosa, sotto agitazione. Tale fase è non-solvente del contenuto della siringa. La formazione delle nanoparticelle avviene per estrazione e successiva evaporazione del solvente. La stabilità delle NP può essere promossa utilizzando opportuni surfattanti, che riducono la tensione superficiale favorendo così una più efficace suddivisione delle NP. Per la formazione delle NP è importante la velocità di agitazione a cui è sottoposta la fase disperdente, in quanto influisce sulle dimensioni e sulla polidispersità della popolazione delle NP (Menon *et al.*, 2012; Markwalter *et al.*, 2019).

2.2 – *Fluorofori*

I fluorofori sono molecole che emettono fluorescenza dopo aver assorbito fotoni a una specifica lunghezza d'onda. A ciascun fluoroforo sono associati specifici spettri di assorbimento e di emissione, e possono essere individuati e quantificati mediante analisi spettrofluorimetrica scegliendo opportunamente le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione. I fluorofori sono utilizzati come sonde per lo studio di un ampio ventaglio di sistemi fisico-chimici, biochimici e biologici grazie alla loro elevata sensibilità e specificità delle tecniche analitiche basate sull'analisi della fluorescenza (Valeur B., 2001).

2.2.1 – Sulforodamina B

La sulforodamina B è un colorante idrofilo con un peso molecolare di 606,71 Da, comunemente utilizzato per la misura delle proteine cellulari in virtù della sua capacità di interagire con i residui basici delle proteine (Santa Cruz Biotechnology, www.scbt.com).

Nel caso delle NP, la sulforodamina B è stata caricata nella fase acquosa interna usata per produrle, dopo averla solubilizzata in etanolo.

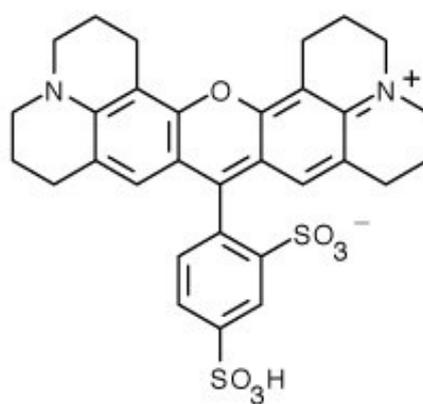


Fig 2.1. Formula di struttura della sulforodamina B (fonte: www.thermofisher.com)

La figura 2.2 riporta gli spettri di eccitazione/emissione della sulforodamina B, che presentano i picchi di eccitazione/emissione a 586 e 605 nm, rispettivamente.

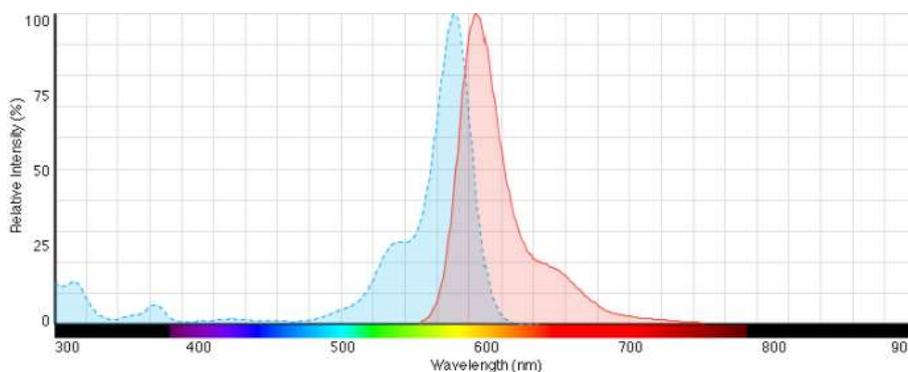


Fig 2.2. Spettro della sulforodamina B (immagine presa da www.thermofisher.com)

2.2.2 – Atto carbossi 655

L'atto carbossi 655 è un fluoroforo idrosolubile zwitterionico dal peso molecolare di 634 Da, che è in grado di interagire con il DNA (Atto-Tec, www.atto-tec.com). La formula di struttura del fluoroforo è riportata in Fig. 2.3. Nell'ambito delle attività di questo lavoro di tesi, è stato inserito nella fase acquosa interna realizzata per l'allestimento delle NP. In particolare, l'atto carbossi 655 è stato solubilizzato in PBS a pH 7.4.

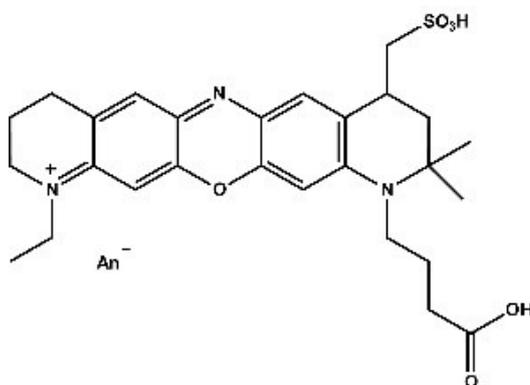


Fig 2.3. Formula di struttura dell'atto carbossi 655 (immagine presa da www.atto-tec.com)

In figura 2.4 sono riportati gli spettri di assorbimento ed emissione, che mostrano un picco a 640-660 e 680 nm, rispettivamente.

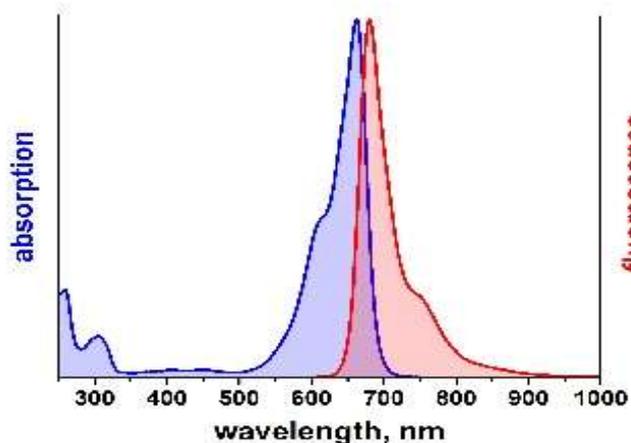


Fig 2.4. Spettro dell'atto carbossi 655 (fonte: www.atto-tec.com)

2.2.3 – Nile red

Il nile red è un colorante lipofilo dal peso molecolare di 318,37 Da, che viene utilizzato per localizzare e quantificare componenti lipidiche (Thermo Fisher, www.thermofisher.com). La sua formula di struttura è mostrata in figura 2.5. Nel presente lavoro di tirocinio, in virtù della sua elevata lipofilia, il nile red è stato inserito nella fase organica utilizzata per produrre le NP, dopo averlo solubilizzato in acetone.

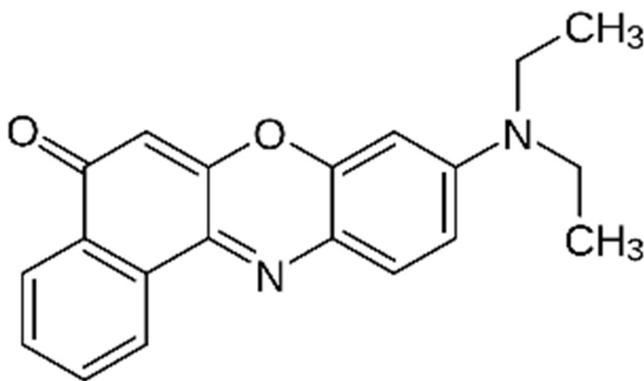


Fig 2.5. Formula di struttura del nile red (immagine presa da www.thermofisher.com)

Gli spettri di eccitazione ed emissione del nile red sono mostrati in Fig. 2.6 e mostrano i picchi di eccitazione ed emissione a 552 e 636 nm, rispettivamente.

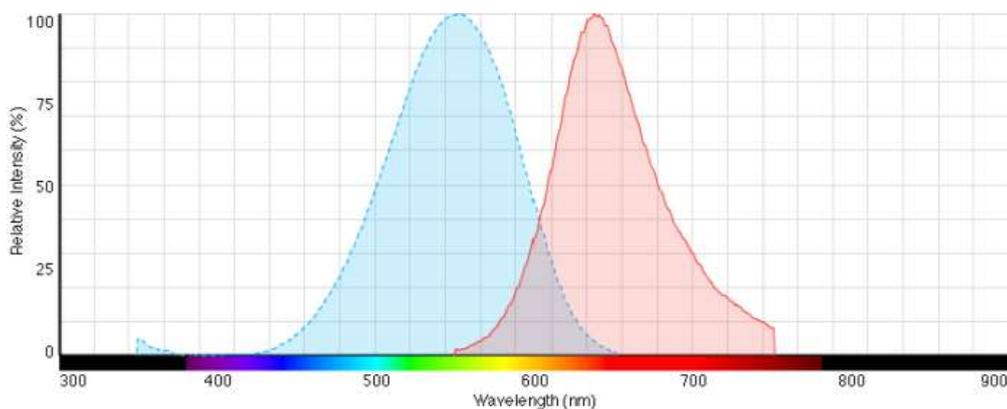


Fig 2.6. Spettro del nile red (immagine presa da www.thermofisher.com)

2.3 – Obiettivi

Nell'ambito delle attività di questo lavoro di tesi, sono state esplorate le attività di formulazione tali da poter caricare le NP oggetto di questo lavoro con alcuni fluorofori è correlata alla necessità di poter studiare il comportamento delle NP negli studi *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, senza che questo influisca sulle proprietà chimico-fisiche delle stesse NP. Infatti, le NP sono state sottoposte ad analisi dimensionali ed è stata anche verificata la loro stabilità tramite il controllo del potenziale zeta. Pertanto, per i nostri studi, è preferibile un fluoroforo che emetta nello spettro del rosso, affinché le NP siano facilmente distinguibili dalla struttura cellulare negli esperimenti citati.

3. Materiali e metodi

3.1 – Materiali

I polossameri (PEO_a-PPO_b-PEO_a) utilizzati in questo lavoro sono copolimeri triblocco anfifilici caratterizzati da un numero variabile di unità di ossido di etilene (a) e ossido di propilene (b). I polossameri F127 (a = 100 e b = 65) e F68 (a = 76 e b = 29) sono stati acquistati da Lutrol (BASF, Germania).

L'acido polilattico-co-glicolico (PLGA) è un poliesteri sintetizzato a partire da due monomeri, l'acido glicolico e l'acido lattico, ed è solubile in diversi solventi, tra cui l'acetone e diclorometano. Variando il numero dei monomeri costitutivi è possibile modificare le proprietà chimico-fisiche del copolimero in questione. Il PLGA (Resomer® RG505H, PM 40 kDa, viscosità inerente 0.5 dL/g) è stato acquistato da Evonik (Germania).

L'acido ialuronico (HA) (PM = 1600 kDa), proveniente da Altergon S.r.l. (Italia), è un polisaccaride anionico costituito da unità disaccaridiche ripetute di acido β-1,4-D-glucuronico e β-1,3-N-acetil-D-glucosammina.

I sali necessari a produrre il PBS (cloruro di sodio, cloruro di potassio e fosfato disodico), il Nile Red, la sulforodamina B, l'acetone e l'etanolo sono stati comperati da Sigma-Aldrich (USA), mentre l'acido carbossi 655 è stato ottenuto da Atto-Tech (USA).

Per tutte le formulazioni è stata utilizzata acqua bidistillata.

Tutti i materiali sono stati utilizzati come ricevuti senza nessun tipo di purificazione.

3.2 – Metodi

3.2.1 – Formulazione NP

Le NP sono state formulate tramite la tecnica della nanoprecipitazione, leggermente modificata per permettere il caricamento del fluoroforo (Serri *et al.*, 2017). In breve, è stata preparata una fase acquosa interna (W_0) (640 μ l). Nel caso delle NP caricate con sulforodamina B, la fase W_0 è costituita da una soluzione di sulforodamina B in etanolo (0.5 mg/ml). Per le NP caricate con l'atto carbossi 655, la fase W_0 è costituita da una soluzione di atto carbossi 655 in PBS a pH 7.4 (1 mg/ml). Nel caso delle NP caricate con Nile red, la fase W_0 è formata da 640 μ l di etanolo.

Per tutte le formulazioni, la fase W_0 è stata emulsionata utilizzando una sonda microtip 419 (3000 sonicator, Misonix, USA; 5 min, 4W) con 5 ml di una fase organica (O) costituita da una soluzione al 3% p/v di polimeri in acetone. Nel caso delle NP_P, la parte solida della fase O era costituita da 150 mg di PLGA mentre, per le formulazioni NP_P e NP_HA, sono stati solubilizzati 75 mg di PLGA e 37.5 mg dei polossameri F68 e F127. Per le NP caricate con Nile red il volume di 5 ml della fase O è ottenuto aggiungendo 10 μ l di una soluzione Nile red in acetone (1 mg/ml).

L'emulsione primaria W/O così ottenuta è stata successivamente fatta precipitare da una siringa (diametro interno: 11.99 mm; diametro interno dell'ago: 0.547 mm) in una fase acquosa di 40 ml (fase W_1), posta sotto agitazione magnetica tramite *Syringe Pump* (Fig. 3.1) utilizzando su una portata volumetrica di 333.3 μ l/min. La fase W_1 è costituita da una soluzione acquosa e dei due polossameri, F68 e F127, prelevati da una soluzione 0.5% p/v. Nel caso delle NP_HA, nella fase W_1 sono solubilizzati 30mg di HA (PM = 1600kDa).



Figure 3.1. *Syringe Pump.*

Per la formazione delle NP, il sistema è stato posto sotto agitazione *overnight* per l'evaporazione del solvente. Successivamente, la sospensione di NP così ottenuta è stata suddivisa in eppendorf da 2 ml e centrifugata per tre volte (Hettich Zentrifugen, Germany; 10000 rpm, 10 min). Dopo le prime due centrifughe, 1 ml di surnatante è stato eliminato e rimpiazzato con un ugual volume di acqua bidistillata. Dopo l'ultima centrifuga, sono stati eliminati 1.5 ml di surnatante, che sono poi stati sostituiti con 0.5 ml di una soluzione di trealosio in acqua bidistillata (20% p/v). Il trealosio è stato aggiunto solo nel 50% di ogni formulazione.

Successivamente, le sospensioni così ottenute sono state filtrate, congelate a -80°C e liofilizzate (Telstar Lyoquest, $p = 0.1$ mbar, $T = -80^{\circ}\text{C}$).

3.2.2 – *Caratterizzazione delle nanoparticelle*

3.2.2.1 – *Diametro medio, distribuzione dimensionale e potenziale zeta (potenziale ζ)*

Il diametro medio, la distribuzione dimensionale e il potenziale ζ delle NP sono stati ottenuti tramite *laser dynamic light scattering (DLS)* (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK).

Il *DLS* è una tecnica routinariamente usata per determinare la distribuzione delle dimensioni di piccole particelle in sospensione o di polimeri in soluzione. Nelle misure

DLS, il campione viene investito da un raggio laser, e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal *detector* sono generate dal movimento browniano delle particelle all'origine della dispersione del fascio di luce. A parità di temperatura e di viscosità, le particelle piccole si muovono rapidamente, creando delle rapide fluttuazioni dell'intensità di diffrazione; al contrario, le particelle di dimensioni maggiori si muovono più lentamente, generando così delle variazioni d'intensità lente (Unibo, chimica-industriale.unibo.it). Le analisi sono state effettuate a temperatura ambiente su una sospensione di NP in acqua filtrata a una concentrazione pari a 0.01% v/v. Le stesse analisi sono state svolte in triplicato e i risultati indicati come media e deviazione standard.



Figure 3.3. *Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments.*

3.2.3 – Resa

La massa iniziale attesa delle NP_P e NP_PP è pari a 150 mg, corrispondenti al peso dei polimeri nella fase organica usata per l'emulsione. Nel caso delle NP_HA, invece, la massa attesa è pari a 180 mg.

La resa effettiva è stata calcolata gravimetricamente, pesando le NP ottenute a valle del processo di liofilizzazione e rapportando questa massa alla massa attesa. In dettaglio, la resa è stata calcolata pesando il contenuto di 5 eppendorf.

La resa percentuale è stata calcolata con la seguente formula:

$$resa \% = \frac{resa\ effettiva}{massa\ attesa} * 100$$

4. Risultati e discussione

Negli ultimi anni, la ricerca è stata indirizzata nello sviluppo di nanovettori dotati di capacità di direzionamento attivo verso la massa tumorale solida, con l'intento di ridurre gli effetti collaterali sistemici dei farmaci antitumorali caricati al loro interno. (Choi *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2011). In questo lavoro di tesi, la formulazione di NP rivestite con HA possiede proprietà di direzionamento attivo. Affinché sia possibile la loro localizzazione negli studi *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, all'interno delle NP sono state caricate differenti sonde fluorescenti.

4.1 – NP caricate con la sulforodamina B

Nella Tabella 1 troviamo i valori delle analisi effettuate in seguito alla terza centrifuga delle NP caricate con la sulforodamina B. Per tutte e tre le formulazioni abbiamo ottenuto dimensioni < 200 nm con un indice di polidispersività < 0.2. Il valore di potenziale ζ è simile per le NP_P e NP_HA1600 (-31.1 ± 1.13 e -32.8 ± 0.884 mV rispettivamente), mentre è meno negativo per le NP_PP (-16.3 ± 1.26 mV). La differenza di potenziale ζ tra le NP_PP e NP_HA1600 è molto significativa, e questo conferma la presenza del polianione HA sulla superficie delle NP, che conferisce una maggiore carica negativa.

Formulazione	Diametro medio (nm)	Indice di polidispersività	Potenziale ζ
NP_P	189.9 ± 15.5	0.125 ± 0.064	-31.1 ± 1.13
NP_PP	169.1 ± 7.41	0.111 ± 0.063	-16.3 ± 1.26
NP_HA1600	197.7 ± 22.4	0.103 ± 0.044	-32.8 ± 0.884

Tabella 1

Le tre formulazioni sono state congelate, liofilizzate e di seguito analizzate. I dati sono indicati in tabella 2. I risultati indicano che le NP congelate in azoto liquido e congelate in presenza di trealosio hanno dimensioni inferiori rispetto alle NP congelate senza il crioprotettore direttamente a -80°C . Inoltre, il valore di potenziale ζ delle

NP_HA1600_TN80 (-34.3 ± 4.74 mV), quasi invariato dopo il processo di congelamento e liofilizzazione, conferma la presenza dell'HA sulla superficie delle NP.

Formulazione	Diametro medio (nm)	Indice di polidispersività	Potenziale ζ
NP_P_NOTN80	1030 \pm 719	0.865 \pm 0.064	-3.7 \pm 1.42
NP_P_NOT80	817 \pm 199	0.811 \pm 0.260	-11.6 \pm 3.9
NP_P_TN80	277 \pm 29	0.207 \pm 0	-24.8 \pm 2.68
NP_P_T80	405 \pm 107	0.477 \pm 0.012	-23 \pm 12.1
NP_PP_NOTN80	761 \pm 184	0.679 \pm 0.152	-5.82 \pm 9.65
NP_PP_NOT80	1224 \pm 4.24	0.872 \pm 0.087	-8.38 \pm 3.52
NP_PP_TN80	342 \pm 12.1	0.358 \pm 0.012	-23.3 \pm 3.08
NP_HA1600_NOTN80	1524 \pm 667	1 \pm 0	-9.74 \pm 6.62
NP_HA1600_NOT80	3848 \pm 1378	1 \pm 0	-33.1 \pm 4.72
NP_HA1600_TN80	351 \pm 51.1	0.250 \pm 0.25	-34.3 \pm 4.74
NP_HA1600_T80	616 \pm 424	0.643 \pm 0.643	-22.3 \pm 3.76

Tabella 2

NOT= senza trealosio; T=con trealosio; N= congelate in azoto; 80=congelate a -80°C

4.2 – NP caricate con l'atto carbossi 655

Nella tabella 3 sono indicate le dimensioni e i potenziali ζ delle NP caricate con l'atto carbossi 655. Le analisi sono state effettuate sulla sospensione di NP al termine del processo di centrifugazione. I risultati mostrano una probabile incompatibilità dell'atto carbossi 655 come sonda per le NP. Sebbene i valori di potenziale, < -30 mV, dimostrino un'elevata stabilità delle NP, le dimensioni non sono quelle desiderate. Infatti, NP con dimensioni > 200 nm rischierebbero di non essere internalizzate efficacemente nel tessuto tumorale bersaglio (Yuan *et al.*, 1995). Per questo motivo è stato deciso di non procedere oltre con questo tipo di formulazione.

Formulazione	Diametro medio (nm)	Indice di polidispersività	Potenziale ζ
NP_P	283.4 \pm 27.4	0.343 \pm 0.216	-30.5 \pm 1.30
NP_PP	416.9 \pm 167	0.354 \pm 0.172	-30.2 \pm 0.95
NP_HA1600	430 \pm 87	0.38 \pm 0.169	-33.2 \pm 3.35

Tabella 3

4.3 – NP caricate con il Nile red

Nella tabella 4 sono presentate le analisi delle NP, in cui è stato inserito il Nile red, dopo la terza centrifugazione. La sonda mostra una notevole compatibilità con la formulazione, tutte le NP hanno una dimensione < 200 nm con indici di polidispersività < 0.2, e ciò indica quindi una stretta distribuzione dimensionale. Sebbene i valori del potenziale ζ non siano < -30 mV come è necessario per garantire la stabilità delle NP in sospensione, esiste una significativa differenza di potenziale ζ tra le NP_PP e NP_HA1600 (-20.2 ± 3.62 e -26.2 ± 1.74 mV rispettivamente) ad indicare la presenza del polianione sulla superficie delle NP.

Formulazione	Diametro medio (nm)	Indice di polidispersività	Potenziale ζ
NP_P	178.5 ± 2.97	0.058 ± 0.041	-24.7 ± 0.79
NP_P_NOT	177.9 ± 2.54	0.04 ± 0.021	-25.3 ± 2.09
NP_PP	126.1 ± 7.78	0.143 ± 0.034	-20.2 ± 3.62
NP_PP_NOT	125.6 ± 4.99	0.106 ± 0.019	-20 ± 5.75
NP_HA1600	158.7 ± 11.3	0.065 ± 0.036	-26.2 ± 1.74

Tabella 4

NOT= senza trealosio

La formulazione è stata successivamente congelata e liofilizzata seguendo i protocolli mostrati nella sezione 3.2.1. In tabella 5 sono stati inseriti i risultati delle analisi effettuate sul liofilizzato risospeso in acqua filtrata. Dai valori si può notare come la presenza del trealosio sia fondamentale per mantenere stabili le dimensioni delle NP, sia per le NP_P che per le NP_PP.

Formulazione	Diametro medio (nm)	Indice di polidispersività	Potenziale ζ
NP_P	184.2 ± 0.848	0.058 ± 0.016	-23.8 ± 0.911
NP_P_NOT	5339 ± 1477	0.863 ± 0.087	-23.25 ± 4.58
NP_PP	129.1 ± 2.54	0.163 ± 0.052	-25.8 ± 2.85
NP_PP_NOT	165.7 ± 5.5	0.088 ± 0.038	-25.9 ± 3.23

Tabella 5

Sulla stessa formulazione è stata calcolata la resa.

Per le NP_P la resa è del 25.3%, per le NP_PP è dell'11.9%, mentre per le NP_HA1600 è del 3.84%.

5. Conclusioni e prospettive future

In questo lavoro di tesi di stato lo studio formulativo è indirizzato alla ricerca di alcuni fluorofori adatti per la localizzazione delle NP negli studi *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

La nanoprecipitazione ha permesso di formulare NP con dimensioni < 200 nm nella maggior parte dei casi, caratteristica fondamentale affinché queste possano essere utilizzate per gli studi *in vivo* (Cai *et al.*, 2015).

I risultati ottenuti dimostrano che i fluorofori più adatti per i nostri obiettivi sono la sulforodamina B e il Nile Red. La sulforodamina B durante gli studi citati ha mostrato una variazione indesiderata della lunghezza d'onda d'emissione; pertanto in futuro saranno utilizzate le NP caricate con il Nile Red. Su quest'ultima verrà sicuramente analizzata l'efficienza di caricamento, con metodiche dirette, per verificare la quantità di fluoroforo incapsulato.

6. Riferimenti

Ai H., Jones A.S., Lvov M.Y. (2003).

Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles. *ResearchGate*, 3, 1085- 9195.

Almond A. (2007).

Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci*, 7, 1591-1596.

Atto-Tec: https://www.atto-tec.com/product_info.php?info=p115_atto-655.html

Bae K.H., Chung H.J., Park T.G. (2011).

Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Molecules and Cells*, 11, 295–302.

Bernard Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Application*, Germania, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.

Biondi M., Guarneri D., Yu H., Belli V., Netti P.A. (2013).

Sub-100 nm biodegradable nanoparticles: in vitro release features and toxicity testing in 2D and 3D cell cultures. *Nanotechnology*, 13, 045101.

Blanco E., Hsiao A., Ruiz-Esparza G.U., Landry M.G., Meric-Bernstam F., Ferrari M. (2011).

Molecular-targeted nanotherapies in cancer: enabling treatment specificity. *Molecular Oncology*, 11, 492–503.

Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. (2002).

Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2, 631–651.

Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L. (2008).

Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics.
Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1615–1626.

Cai K., He X., Song Z., Yin Q., Zhang Y., Uckun M.F., Jiang C., Cheng J. (2015).

Dimeric Drug Polymeric Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading and Quantitative Loading Efficiency. *Journal of the american chemical society*, 15, 3458-3461.

Chen S., McClements J.D., Jian L., Han Y., Dai L., Mao L., Gao Y. (2019).

Core-Shell Biopolymer Nanoparticles for Co-delivery of Curcumin and Piperine: Sequential Electrostatic Deposition of Hyaluronic Acid and Chitosan Shells on Zein Core. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 19.

Choi K.Y., Chung H., Min K.H., Yoon H.Y., Kim K., Park J.H., Kwon I.C, Jeong S.Y. (2010).

Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting.
Biomaterials, 10, 106–114.

Choi Y.K., Min H.K., Yoon Y.H., Kim K., Park H.J., Kwon C.I., Choi K., Jeong Y.S. (2011).

PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo.
Biomaterials, 11, 1880-1889.

Davis M.E., Chen Z.G., Shin D.M. (2008).

Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 771–782.

Farokhzad O.C., Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P.W., Richie J.P., Langer R. (2006).

Targeted nanoparticle–aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 6, 6315–6320.

Farokhzad O.C., Langer R. (2009).

Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, 9, 16-20.

Ferrari M. (2005).

Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5, 161–171.

Gotte M., Yip G.W. (2006).

Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: A breast carcinoma perspective. *Cancer Research*, 6, 10233–10237.

Hida K., Maishi N. (2018).

Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression. *Oral Science International*, 18, 1-6.

Lukyanov A.N., Elbayoumi T.A., Chakilam A.R., Torchilin V.P. (2004).

Tumor-targeted liposomes: Doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. *Journal of Controlled Release*, 4, 135–144.

Maeda H., Wu J., Sawa., Matsumura Y., Hori K. (2000).

Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, 0, 271–284.

Maltese A., Borzacchiello A., Mayol L., Bucolo C., Maugeri F., Nicolais L., Ambrosio L. (2006).

Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: Rheological characterization. *Biomaterials*, 6, 5134–5142.

Makadia K.H., Siegel J.S. (2011).

Poly Lactic-*co*-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 11, 1377-1397.

Markwalter E.C., Pagels F.R., Wilson K.B., Ristroph D.K., Prud'homme K.R. (2019).

Flash NanoPrecipitation for the Encapsulation of Hydrophobic and Hydrophilic Compounds in Polymeric Nanoparticles. *Journal of Visualized Experiments*, 19, 3791-58757.

Mayol L., Serri C., Menale C., Crispi S., Piccolo M.T., Mita L., Giarra S., Forte M., Saija A., Biondi M., Mita G.D. (2015).

Curcumin loaded PLGA–poloxamer blend nanoparticles induce cell cycle arrest in mesothelioma cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 15, 37–45.

McDondald M.D., Baluk P. (2002).

Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer. *Cancer Research*, 2, 5381-5385.

Menon U.J., Kona S., Wadajkar., Desai F., Vadla A., Nguyen T.K. (2012).

Effect of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research*, 12, 1998–2005.

Ngoune R., Peters A., Von Elverfeldt D., Winkler K., Pütz G. (2016).

Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. *Journal of Controlled Release*, 16, 58–70.

Ossipov D.A. (2010).

Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10, 681–703.

Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. (2007).

Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 7, 751-760.

Ramasamy T., Tran H.T., Choi Y.J., Cho J.H., Kim H.J., Yong S.C., Choi H.G., Kim J.O. (2014).

Layer-by-layer coated lipid–polymer hybrid nanoparticles designed for use in anticancer drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 14, 653– 661.

Santa Cruz biotechnology: <https://www.scbt.com/fr/p/sulforhodamine-b-sodium-salt-3520-42-1>

Sapra P., Allen T.M. (2002).

Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Research*, 2, 7190–7194.

Serri C., Argirò., Piras L., Mita G.D., Saija A., Mita L., Forte M., Giarra S., Biondi M., Crispi S., Mayol L. (2017).

Nano-precipitated curcumin loaded particles: effect of carrier size and drug complexation with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin on their biological performances. *International Journal of Pharmaceutics*, 17, 21–28.

Sudimack J., Lee R.J. (2000).

Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 0, 147-162.

ThermoFisher:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N1142?SID=srch-srp-N1142>

Toole B.P. (2004).

Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 4, 528–539.

Torchilin V. P. (2006).

Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1532–1555.

Unibo: <http://www.chimica-industriale.unibo.it/it/servizi-e-strutture/strumentazione-scientifica/dynamic-light-scattering-dls>

Wang J., Mongayt D., & Torchilin V. P. (2005).

Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: Preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)–lipid conjugate and positively charged lipids. *Journal of Drug Targeting*, 5, 73–80.

**Yuan F., Dellian M., Fukumura D., Leunig M., Berk A.D., Torchilin P.V., Jain K.R.
(1995).**

Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence
and Cutoff Size. *Cancer Research*, 5, 3752-3756.