

PREMESSA

Le problematiche associate al trattamento di patologie legate al malfunzionamento o alla perdita di funzionalità di organi e tessuti hanno orientato, negli ultimi anni, l'interesse della ricerca scientifica alla medicina rigenerativa, che prevede la riparazione del tessuto danneggiato. Si sono aperti, così, diversi scenari tra cui la possibilità di inserire fattori di crescita nel sito danneggiato, in modo da stimolare le cellule a rigenerare il tessuto, o alternativamente coltivare *in vitro* un tessuto che, una volta rigenerato, può essere impiantato *in vivo*. In entrambi i casi è essenziale la presenza di una matrice tridimensionale (*3D-scaffold*), cellule staminali o specifiche del tessuto, e molecole segnale, che stimolino le cellule alla proliferazione e differenziamento.

Un punto cruciale nelle strategie di ingegneria tissutale è l'impiego di un *3D-scaffold* capace di mimare la matrice extracellulare e guidare attivamente il processo di rigenerazione tissutale. La capacità dello *scaffold* di rilasciare molecole segnale e ricreare i gradienti chemotattici è fondamentale ai fini di una corretta e funzionale crescita del tessuto. In tal senso, assume un ruolo primario l'impiego delle molecole segnale, solitamente macromolecole di natura proteica (i.e. fattori di crescita), direttamente coinvolte nella proliferazione cellulare e rigenerazione tissutale. La bioattivazione di un *3D-scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale, può essere ottenuta mediante differenti strategie, come l'incorporazione delle molecole segnale nella matrice polimerica attraverso semplice diffusione o immobilizzazione attraverso interazioni elettrostatiche o legami covalenti. Tali strategie si possono rivelare, però, poco efficienti a causa dell'elevata instabilità delle molecole segnale di natura proteica, velocemente inattivate una volta a contatto con i fluidi biologici, e della necessità di un tempo di contatto, relativamente lungo, con i tessuti, ai fini di ottenere una rigenerazione del tessuto funzionale. Una strategia innovativa per il controllo della concentrazione di molecole segnale all'interno di *3D-scaffold* prevede l'impiego di CRS da disporre

nel supporto tridimensionale al fine di controllare la concentrazione delle molecole segnale durante il processo di crescita del tessuto.

Ad oggi, l'ingegneria tissutale ha raggiunto, numerosi traguardi in applicazioni su tessuti relativamente semplici, quali tessuto cartilagineo, osseo e derma. L'ingegnerizzazione di tessuti ritenuti più complessi presenta, tuttavia, ancora numerosi limiti legati alla difficoltà nel controllo dei numerosi processi che accompagnano la rigenerazione, come la necessità di ottenere una rete di vasi sanguigni *ex novo* o da vasi sanguigni preesistenti (rispettivamente neoangiogenesi ed angiogenesi).

Lo scopo del lavoro è stato, quindi lo sviluppo di sistemi particellari per il rilascio di molecole ad attività proangiogenica, da essere integrati in *scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale. Questo lavoro di tesi si è articolato in due fasi principali. Una fase, svolta presso i laboratori della Professoressa Alonso, Dipartimento di tecnologia Farmaceutica dell'Università di Santiago de Compostela, Spagna, è stata incentrata sullo studio tecnologico di sistemi micro e nanoparticellari a base di una miscela di polimeri biodegradabili (PLGA e polossamero) per la veicolazione di molecole proangiogeniche. In particolare da un lato sono stati sviluppate micro e nanoparticelle contenenti una molecola peptidica di origine sintetica (Poliaminoacido JS-2892b) e dall'altro sistemi nanoparticellari per la veicolazione di due fattori di crescita di natura proteica, fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-BB) e/o fattore di crescita del fibroblasti (FGF-2), la cui associazione risulta in un'azione sinergica in grado non solo di stimolare le cellule endoteliali a riorganizzarsi in forma di vasi sanguigni, ma soprattutto di ottenere una rete vascolare ben organizzata e stabile nel tempo.

Un'altra parte del lavoro, svolta presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, in collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e della Produzione, della nostra Università, è stata focalizzata sullo sviluppo di sistemi integrati 3D-*scaffold* a base di collagene/microsfere biodegradabili a base di PLGA contenenti il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), capace di stimolare le cellule endoteliali alla formazione di vasi sanguigni

INTRODUZIONE GENERALE

1. Sistemi particellari per la veicolazione di molecole di natura proteica

1.1 Rilascio modificato di farmaci

La grande quantità di tecnologie innovative, i nuovi materiali disponibili e l'alta specificità raggiunta dalle tecniche analitiche ha consentito la realizzazione di nuove forme di somministrazione per farmaci a basso ed alto peso molecolare con notevoli vantaggi terapeutici, quali i sistemi a rilascio modificato (*Controlled Release Systems-CRS*).

Il CRS ideale deve possedere alcuni requisiti fondamentali, come realizzare l'efficacia terapeutica con un'unica somministrazione per l'intera durata della terapia, rilasciare il principio attivo al sito d'azione, minimizzando gli effetti collaterali, e permettere il controllo delle concentrazioni del farmaco nello spazio e nel tempo.

Le formulazioni specificamente definite "a rilascio controllato", sono caratterizzate dalla precisione con cui il farmaco viene rilasciato in modo che l'ottenimento della cinetica desiderata, generalmente, ma non necessariamente di ordine zero, non sia più un fatto occasionale, ma una prestazione rigidamente garantita. Nella FU XI Ed. sono più propriamente definite "forme farmaceutiche a rilascio modificato" quelle preparazioni in cui la velocità e/o il sito di rilascio del/dei principi attivi sono differenti da quella di una forma farmaceutica convenzionale somministrata per la stessa via. Questa deliberata modificazione si ottiene con uno speciale progetto di formulazione e/o metodo di produzione. In tal senso, le forme farmaceutiche a rilascio modificato possono essere a rilascio prolungato, ritardato o ripetuto (figura 1). Le *forme farmaceutiche a rilascio prolungato* sono forme di dosaggio a rilascio modificato che mostrano un rilascio della/e sostanze attive più lento di quello di una forma di dosaggio convenzionale somministrata per la stessa via (figura 1A). Le *forme farmaceutiche a rilascio ritardato*, invece, sono forme di dosaggio a rilascio modificato che mostrano un rilascio della/e sostanze attive che è ritardato (i.e., preparazioni gastroresistenti)

(figura 1B), mentre le *forme farmaceutiche a rilascio ripetuto*, o pulsante, sono forme di dosaggio a rilascio modificato che mostrano un rilascio sequenziale ripetuto del/dei principi attivi (figura1C).

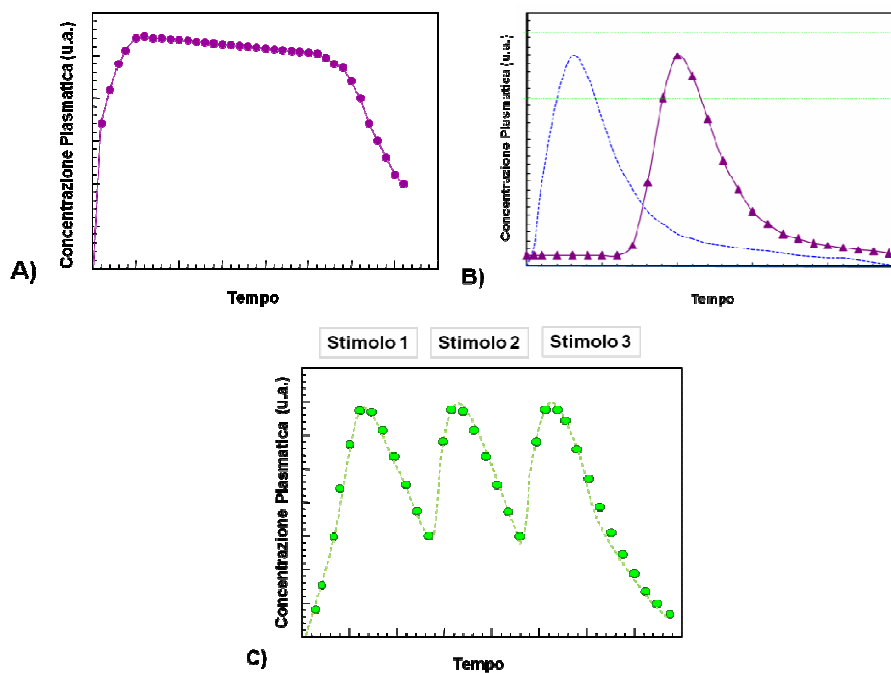


Figura 1 . Profili di rilascio del principio attivo incapsulato da forme farmaceutiche a rilascio modificato: (A) forme a rilascio prolungato; (B) forme a rilascio ritardato; (C) forme a rilascio ripetuto..

In tutti i casi, il più importante vantaggio terapeutico è rappresentato da una medicazione efficace, protratta nel tempo e senza interruzioni per tutta la durata del ciclo programmato. Questo consente l'espressione ottimale del potenziale clinico della sostanza attiva non esponendo il paziente ai periodi di inefficacia, tipici delle forme farmaceutiche convenzionali, in prossimità dei periodi di assunzione. Questi prolungamenti di durata senza soluzione di continuità sono inoltre raggiunti con una dose giornaliera di farmaco generalmente inferiore a quella utilizzata nella terapia con le forme farmaceutiche tradizionali. Studi socio-economici hanno ampiamente dimostrato che il rapporto costo/beneficio è tutto a favore di queste forme di

somministrazione. La possibilità di ridurre il numero delle assunzioni giornaliere è inoltre un fattore importantissimo dal punto di vista della psicologia del paziente (aumento della *compliance*), della maggiore praticità d'uso e della più rigorosa osservanza del regime terapeutico.

I CRS sono costituiti, solitamente, da supporti polimerici di diversa natura chimica. Sfruttando le diverse proprietà fisico-chimiche del biomateriale e le numerose modalità con la quale esso può essere impiegato, è possibile ottenere un CRS capace di modificare il rilascio del farmaco mediante la cinetica desiderata, ottimizzando il profilo di attività (figura 2). Il requisito fondamentale di un biomateriale da impiegare per la preparazione di un CRS, sia esso un materiale non biodegradabile o biodegradabile, è la **biocompatibilità**, ossia l'assenza di tossicità cellulare e tissutale (Biondi *et al.*,2007).

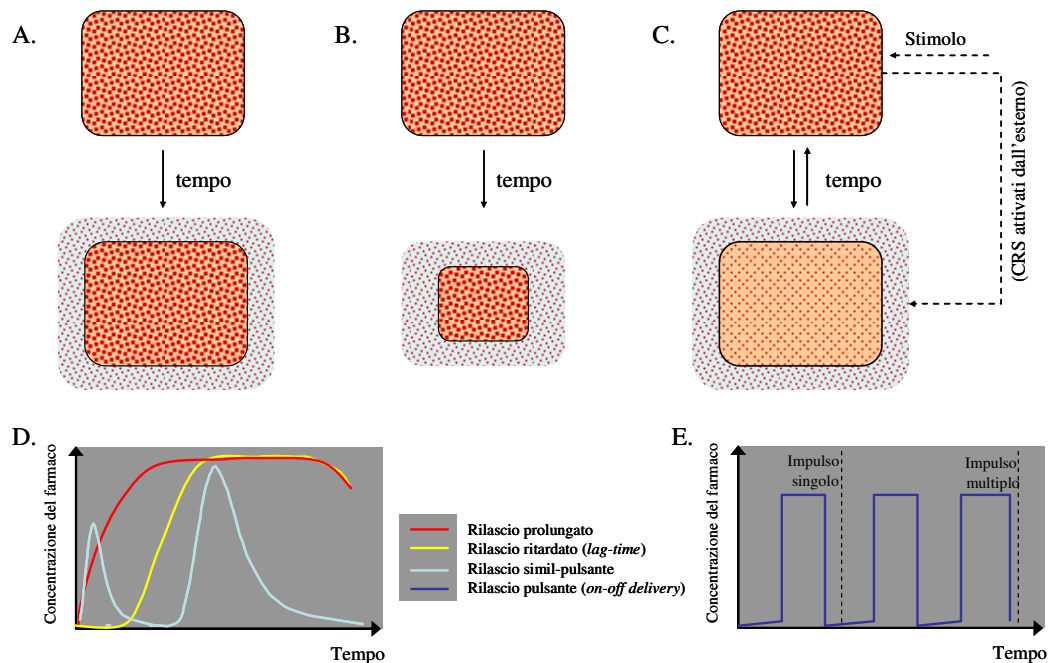


Figure 2. Rilascio di un farmaco (rosso) da un CRS: (A) non biodegradabile; (B) solubile/biodegradabile; (C) pulsante. I primi due possono essere formulati con biomateriali differenti, progettati in forme (e.g., particelle, impianti) ed architetture (i.e., sistemi reservoir o matriciali) diverse al fine di realizzare un rilascio del farmaco prolungato, ritardato o simil-pulsante. Un rilascio pulsante (ad impulso singolo o multiplo) può essere ottenuto nel caso di un sistema a rilascio ripetuto (E).

1.2. Sistemi particellari a base di acido poli(lattico-co-glicolico) per il rilascio modificato di molecole di natura proteica

La possibilità di sviluppare nuove forme farmaceutiche a base di polimeri biocompatibili, in grado di proteggere e rilasciare il principio attivo in tempi prolungati, ha fatto crescere enormemente l'interesse nei confronti delle particelle biodegradabili quali veicoli per peptidi e proteine [Couvreur *et al.*, 1997; Crotts *et al.*, 1998; Walter *et al.* 2001). Tra i materiali biodegradabili più utilizzati nell'allestimento di CRS per proteine e peptidi, i poliesteri a base di acido lattico (PLA) e i loro copolimeri con acido glicolico (PLGA) rivestono un'importanza centrale in virtù della loro ormai accertata biocompatibilità e sicurezza d'uso (Kissel *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998) (figura 3).

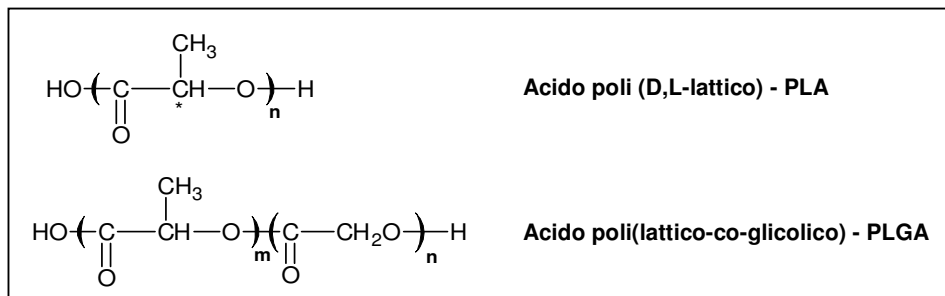


Figura 3. Struttura chimica dei polimeri dell'acido lattico e glicolico.

Si tratta di polimeri approvati per applicazioni cliniche in esseri umani dalla *Food and Drug Administration* (FDA), il cui principale vantaggio è legato alla loro completa biodegradazione in vivo. La bioerosione, infatti, provoca la demolizione dello scheletro polimerico per via chimica, con formazione di derivati idrosolubili a basso peso molecolare che entrano nei normali cicli metabolici dell'organismo, in particolare il ciclo di Krebs (figura 4).

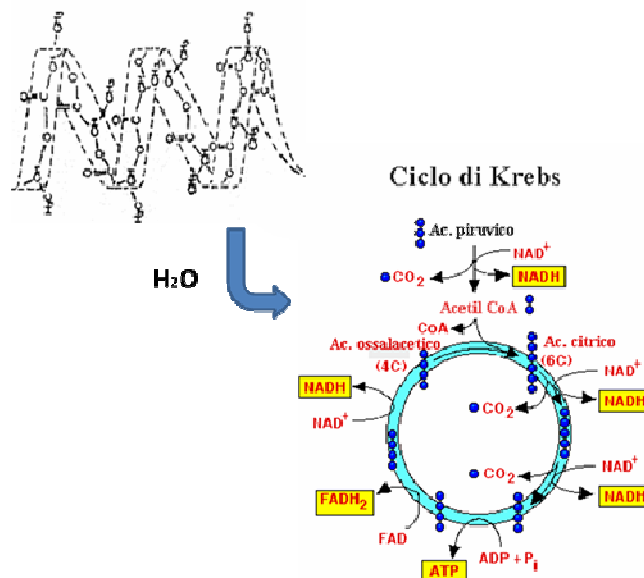


Figura 4. Schema metabolico dell'acido polilattico (PLA).

Tra i polimeri biodegradabili, inoltre, i PLGAs, sono stati oggetto di numerosi studi in ragione della loro elevata versatilità d'impiego. La velocità di rilascio del farmaco veicolato, infatti, può essere facilmente modulata variando la composizione del polimero (i.e. rapporto acido lattico/acido glicolico), peso molecolare e struttura chimica (i.e. estremità carbossi-terminale *capped* o *uncapped*) (Sharif *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997).

Le proprietà fisico-chimiche del polimero, come il peso molecolare e l'indice di polidispersità, influenzano la stabilità del polimero e le potenzialità d'impiego nella formulazione di CRS (Kitchell *et al.*, 1985; Lewis *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1995), con particolare riferimento ai tempi di biodegradazione ed idrolisi (Kitchell *et al.*, 1985; Wu *et al.*, 1995; Rajeev, 2000). Il PLA presenta un'idrofobicità più spiccata rispetto al PLGA, ed un aumento progressivo della componente idrofila (i.e., una riduzione del rapporto lattico/glicolico) determina un maggior richiamo d'acqua e una riduzione nei tempi di degradazione (Jalil *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1994). Per questo motivo, PLGAs caratterizzati da tempi di degradazione *in vivo* che possono variare

da 3 settimane fino a raggiungere un massimo di un anno, sono attualmente disponibili in commercio.

1.2.1 Sistemi micro e nanoparticellari a base di PLGA

L'importanza dei PLA e dei copolimeri PLGA è notevolmente aumentata in conseguenza della possibilità di preparare da essi sistemi particellari per la veicolazione di farmaci. I vantaggi d'impiego dei sistemi particellari includono, infatti, la possibilità di somministrare il farmaco direttamente nel sito d'azione dove il sistema costituisce un deposito da cui il principio attivo può essere liberato ed agire per un periodo di tempo prolungato (Davis *et al.*, 1988; Ravi Kumar, 2000).

Tra i sistemi particellari distinguiamo due categorie principali che differiscono per dimensioni: sistemi **microparticellari** e **nanoparticellari**.

Si definiscono sistemi **microparticellari**, particelle con dimensioni comprese tra 1 e 1000 μm , anche se le dimensioni delle microparticelle di maggior interesse sono generalmente comprese nell'intervallo 1-200 μm . Il principio attivo incapsulato in un sistema microparticellare può essere localizzato in cavità interne al sistema (i.e., *microcapsule*), o finemente disperso nella matrice polimerica (i.e. *microsfere*), a seconda della tecnica di produzione e/o della formulazione di partenza (figura 5).

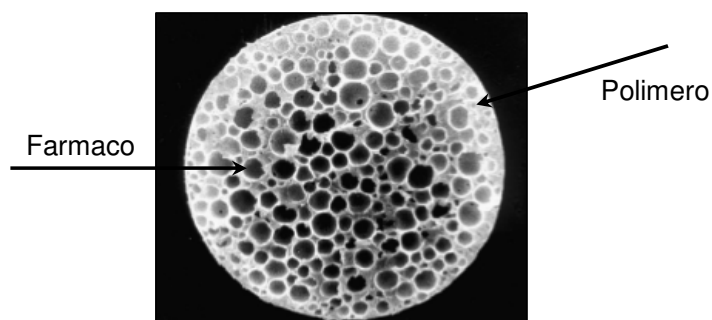


Figura 5. Microsfere biodegradabili: tipico sistema reservoir.

Il rilascio del principio attivo da microsfeere a base di polimeri biodegradabili è regolato principalmente dalla diffusione del principio attivo incapsulato attraverso la matrice polimerica e dalla biodegradazione del polimero (Washington, 1996). Nel meccanismo accoppiato diffusione-erosione un ruolo importante è svolto dall'attività dell'acqua nell'ambiente di rilascio. La microsfera, a contatto con l'ambiente acquoso, si idrata (fase di idratazione) e l'acqua che penetra all'interno solubilizza il farmaco, che inizia a diffondere attraverso i macropori propri del PLGA, che hanno dimensioni comprese tra angstrom e nanometri, e attraverso la struttura macroporosa delle particelle, che è conseguenza del processo di preparazione (i.e., tecnica dell'emulsione multipla). Nel caso di macromolecole, il rilascio del farmaco, quindi, è impedito dalla microporosità del sistema fino al crescere delle dimensioni dei micropori. In seguito alla degradazione del polimero, infatti, si sviluppa un graduale aumento delle dimensioni dei micropori, che evolvono in mesopori e, quindi, macropori con una conseguente diminuzione della resistenza della matrice polimerica alla diffusione del farmaco (Batycky *et al.*, 1997) (figura 6).

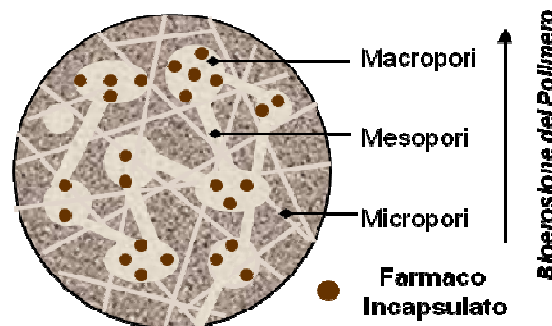


Figura 6. Architettura interna delle microparticelle a base di PLGA.

Impiegando tecniche di preparazione differenti, il PLGA può essere impiegato anche per la produzione di sistemi dalle dimensioni nanometriche, caratterizzate da proprietà quali diverse rispetto alle microparticelle (Astete *et al.*, 2006; Biondi *et al.*, 2007). Le nanoparticelle presentano generalmente dimensioni comprese fra i 10 ed i 1000 nm. A seconda della tecnica di preparazione utilizzata, è possibile ottenere

sistemi nanoparticellari con architetture differenti (i.e.; nanocapsule, nanosfere, nanoparticelle). In particolare, le nanocapsule sono caratterizzate da un *core* interno costituito dal farmaco circondato da uno strato polimerico, mentre sono definite nanoparticelle e nanosfere i sistemi matriciali in cui il farmaco è disperso più o meno finemente (figura 7).

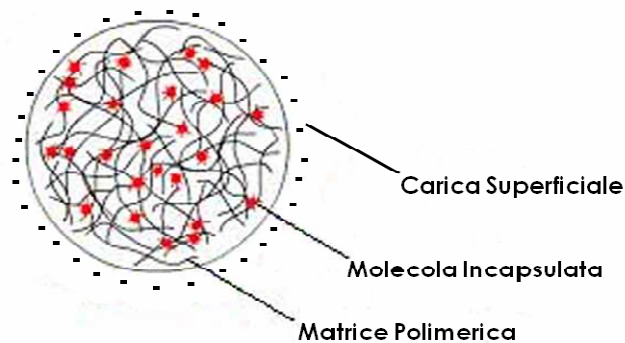


Figura 7. Struttura tipica di nanoparticelle biodegradabili.

Come descritto sopra per le microparticelle, anche la velocità di rilascio del farmaco incapsulato in nanoparticelle polimeriche dipende da due processi fondamentali: diffusione attraverso la matrice polimerica e bioerosione del polimero (Soppimath *et al.*, 2001).

Un parametro di notevole interesse nella caratterizzazione delle nanoparticelle è la carica superficiale, definita come potenziale ζ . Nel caso di nanoparticelle polimeriche a base di PLGA la carica superficiale sarà negativa a causa dei gruppi carbossilici dell'acido. Una carica superficiale lontana dal valore neutro provoca la formazione di interazioni con componenti dei fluidi biologici, in particolare le proteine plasmatiche. Tali molecole adsorbite sulla superficie delle nano particelle possono, interagendo con proteine cellulari, favorire la fagocitosi da parte delle cellule quali i macrofagi, fenomeno possibile anche grazie alle dimensioni nanometriche delle particelle (Panyam *et al.*, 2003; Lecaroz *et al.*, 2007). D'altra parte è possibile applicare delle modifiche superficiali alle particelle tali da

minimizzare la fagocitosi da parte delle cellule o, al contrario, rendere l'azione del *carrier* mirata ad una specie cellulare in particolare (Perez et al., 2001).

Alla luce degli innumerevoli vantaggi che presentano, i sistemi a base di PLGA, sia micro che nanoparticellari, sono stati ampiamente impiegati per lo sviluppo di *carrier* per macromolecole di natura instabile, in particolar modo proteine e peptidi. In particolare, microsfeere a base di PLGA per il rilascio controllato di molecole di natura proteica rappresentano ormai una realtà del mercato farmaceutico (e.g. Lupron Depot[®], Nutropin Depot[®], Sandostatin LAR[®]). D'altra parte, nanoparticelle a base di PLGA per la veicolazione di peptidi e proteine sono state oggetto di numerosi studi, in ragione della loro capacità di oltrepassare le barriere fisiche dell'organismo, come dimostrato in lavori sull'impiego di tali sistemi nella vaccinazione mucosale, orale e nasale (Alonso, 2004; Galindo-Rodriguez *et al.*, 2005; Garinot *et al.*, 2007). Tali studi suggeriscono la possibilità di incapsulare peptidi e proteine in sistemi nanoparticellari senza comprometterne l'integrità strutturale, che è strettamente correlata all'attività biologica di tali macromolecole (Biondi *et al.*, 2007). Inoltre, le dimensioni nanometriche delle nanoparticelle possono rappresentare un parametro fondamentale per la veicolazione di farmaci all'interno delle cellule (Ankola *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2007), o in terapia genica (Vila *et al.*, 2002).

1.3 Incapsulazione di peptidi e proteine in particelle a base di PLGA: problematiche formulative

Le tecniche di preparazione di micro e nanoparticelle per il rilascio controllato di proteine e peptidi sono svariate, ma la tecnica più opportuna deve essere selezionata in base alle proprietà chimico fisiche della molecola da incapsulare nonché all'impiego cui le particelle sono destinate (De Rosa *et al.*, 2008, Benoit *et al.*, 1996). L'incapsulazione di peptidi e proteine, la cui attività farmacologica è strettamente dipendente dall'integrità chimica e conformazionale della molecola, ha rappresentato e rappresenta tutt'oggi una delle principali sfide in campo tecnologico-farmaceutico. La tecnica prescelta deve infatti consentire un'efficiente

incapsulazione della proteina nel suo stato nativo nonché la realizzazione di un sistema che permetta un rilascio controllato della macromolecola integra ed attiva nel tempo.

Tutte le più comuni metodiche di micro e nano-incapsulazione di farmaci di natura proteica prevedono la realizzazione di tre successive tappe sperimentali: 1) la preparazione della formulazione iniziale proteina/polimero; 2) la formazione delle particelle; 3) l'essiccamento del prodotto. Ciascuna di queste tappe può rappresentare un punto critico ai fini del mantenimento dell'integrità strutturale della macromolecola e, quindi, della sua attività biologica

1.3.1 Potenziali cause di inattivazione delle proteine durante la fase di preparazione delle particelle e di rilascio del farmaco

Sono state, ad oggi, identificate la maggior parte delle possibili cause di inattivazione delle proteine durante la fase di preparazione delle particelle e durante la fase di rilascio (Van de Weert *et al.*, 2000)

La denaturazione delle proteine, e la conseguente perdita di attività biologica, può essere associata alla formazione di forze di taglio e forze cavitazionali, che caratterizzano le tecniche più comuni di preparazione di micro e nanoparticelle, quali le tecniche di dispersione del solvente (i.e. sonicazione, omogenizzazione). Inoltre, la formazione di un'interfaccia acqua/olio, durante la fase di emulsione, può ridurre la mobilità della proteina provocandone l'aggregazione, generalmente favorita anche dalle interazioni proteina/polimero. In teoria una dispersione della proteina nel solvente organico (i.e. dispersione solido/solvente organico) può portare ad una minore flessibilità conformazionale della macromolecola, preservando la struttura tridimensionale e minimizzando la denaturazione. D'altra parte, tuttavia, una dispersione omogenea della proteina in una fase organica, è generalmente ottenuta in seguito a precisi processi di spray-freeze drying o di liofilizzazione. Generalmente tali processi prevedono fasi di congelamento, variazioni del pH e

perdita dell'acqua di idratazione, che possono potenzialmente indurre la perdita della struttura tridimensionale e la denaturazione delle proteine.

Assicurarsi che la proteina sia incapsulata in forma integra non è sufficiente a garantirne l'attività biologica. L'efficacia del sistema a rilascio controllato dipenderà anche dalla sua capacità di preservare l'integrità della macromolecola durante l'intera fase di rilascio. Infatti, sono numerose le fonti possibili di inattivazione delle proteine anche nelle fasi successive all'incapsulazione.

Il processo più comune è la lenta reidratazione della proteina conseguente alla penetrazione dell'acqua all'interno della matrice. Molte proteine (tra cui albumina di siero bovino, insulina, tossina tetanica) formano, infatti, aggregati insolubili quando la polvere liofilizzata è esposta a piccole quantità di acqua o ad elevati livelli di umidità. Tale aggregazione non si verifica per aggiunta alla polvere liofilizzata di quantità di acqua maggiori (Liu *et al.*, 1991). La denaturazione della proteina durante la fase di rilascio può anche aver luogo per la presenza di superfici idrofobiche (Van der Weert *et al.*, 2000). Le proteine possono adsorbirsi su superfici idrofile ed idrofobe; nel primo caso, l'adsorbimento è in genere reversibile, mentre nel secondo si verificano spesso variazioni conformazionali irreversibili. La stabilità della proteina a temperatura fisiologica è un requisito fondamentale per un rilascio in tempi lunghi e tale aspetto deve essere valutato già nella fase di progettazione della forma farmaceutica.

Il microclima acido o basico che si genera nella microsfera durante la degradazione del polimero è un altro fattore determinante per l'integrità della proteina rilasciata. Nel caso di polimeri come il PLGA, ad esempio, la bioerosione porta alla scissione dei legami chimici con liberazione di gruppi acidi e diminuzione del pH interno alla matrice. La riduzione del pH può causare l'*unfolding* della proteina o, spesso, la sua inattivazione via degradazione chimica (Burke, 2000). Interazioni specifiche polimero/proteina rappresentano un'altra importante causa di rilascio incompleto della proteina dalle microsfele. Alcuni polimeri biodegradabili, infatti, sono in grado di reagire con alcune proteine dando talora vita a legami covalenti; gruppi -NH₂ terminali o appartenenti a catene laterali di lisine, sono

infatti potenziali reattivi nucleofili. Nel caso specifico dei PLGAs le interazioni che si instaurano sono per lo più di natura idrofobica e/o elettrostatica, pertanto, la chimica del polimero prescelto, nel senso soprattutto del numero di gruppi carbossilici liberi reattivi (i.e. PLGA *end-capped* o PLGA non *end-capped*), ne costituirà il determinante principale.

1.3.2 Strategie di stabilizzazione di peptidi e proteine in sistemi particellari a base di PLGA

La scelta dell'opportuna strategia di stabilizzazione e/o dell'impiego di un agente stabilizzante è un passaggio critico, che deve tenere considerazione sia della tecnica di preparazione delle particelle sia della natura della molecola incapsulata. Diversi approcci di stabilizzazione di peptidi e proteine durante l'incapsulazione e il rilascio da particelle biodegradabili sono riportati in letteratura (tabella 1).

L'utilizzo di "lioprotettori" (e.g. zuccheri, amminoacidi) che incrementano il contenuto di acqua nella polvere liofilizzata può aumentare la stabilità delle proteine durante la fase di rilascio (Costantino *et al.*, 1995). In altri casi, anche alcuni tensioattivi non ionici hanno mostrato lo stesso effetto stabilizzante, dovuto, tra l'altro, alla schermatura delle interazioni farmaco-polimero. La degradazione della proteina causata dal microclima acido generato dalla degradazione del polimero può essere evitata aggiungendo alla formulazione iniziale composti basici dalle proprietà tampone, quali alcuni sali inorganici solubili in acqua (e.g. bicarbonato di sodio, idrossido di magnesio).

Va sottolineato che l'uno o l'altro approccio di stabilizzazione sarà sempre condizionato alla particolare proteina (o peptide), la cui storia personale, in termini di proprietà chimico-fisiche (quali peso molecolare, composizione e/o comportamento in soluzione) va sempre tenuta in considerazione.

Tabella 1. Rappresentazione schematica degli approcci comunemente adottati per stabilizzare peptidi/proteine durante l'incapsulazione ed il rilascio dalle particelle.

	Fonte di inattivazione	Approccio di stabilizzazione	Meccanismo di stabilizzazione
Preparazione delle particelle	Interfaccia A/O	Zuccheri, polialcoli, PEG Incremento della quantità di proteina incapsulata Proteine come additivi Evitare l'emulsione Pre-incapsulazione della proteina	Incremento dell'energia libera di Gibbs dell' <i>unfolding</i> Riduzione del rapporto interfaccia/proteina Competizione all'interfaccia Assenza d'interfaccia A/O Protezione dall'interfaccia
	Interazioni PLGA/proteina	Proteine come additivi Pre-incapsulazione della proteina	Competizione per il PLGA Protezione dal PLGA
	Forze di taglio	Tensioattivi Riduzione del tempo di omogeneizzazione Evitare l'ultrasonificazione	Competizione all'interfaccia Esposizione allo stress minimizzata Assenza di forze di cavitazione
	Essiccamento	Lioprotettori Metodi di essiccamento alternativi alla liofilizzazione	Incremento dell'energia libera di Gibbs dell' <i>unfolding</i> Assenza della fase di congelamento
Rilascio dalle particelle	Microclima acido Interazioni PLGA/proteina	Composti basici Proteine come additivi Tensioattivi Zuccheri	Azione tampone Competizione per il PLGA Protezione dal PLGA Incremento dell'energia libera di Gibbs dell' <i>unfolding</i>

Tra i diversi eccipienti impiegati ai fini della stabilizzazione delle proteine durante la fase di incapsulazione e rilascio, è stata recentemente focalizzata l'attenzione sui derivati del polietilenossido (PEO) (Tobío *et al.*, 1999.; Csaba *et al.*, 2005). In tal senso, un approccio promettente della ricerca prevede l'impiego dei derivati polietilenossido-polipropilenossido-polietilenossido, o polossameri, da utilizzarsi in miscela al PLGA durante l'allestimento dei sistemi (Csaba *et al.* 2006 Sanchez *et al.*, 1999). I polossameri sono eccipienti polimerici GRAS (*Generically Recognized as Safe*) già largamente impiegati in tecnica farmaceutica

nell'allestimento di numerose forme farmaceutiche attualmente in commercio. Nel caso di sistemi particellari per il rilascio di molecole di natura proteica, tali polimeri possono efficacemente interagire con la proteina da incapsulare, esercitando un'azione di protezione sia durante la fase di incapsulazione che di rilascio. In particolare il Polossamero 188 induce una diminuzione delle interazioni della macromolecola con i residui carbossilici liberi del PLGA ed, inoltre, riduce gli effetti della diminuzione del pH nel microambiente della particella (Csaba *et al.* 2006; Tobio *et al.*, 1999).

2. Rilascio modificato di proteine in applicazioni di ingegneria tissutale

2.1 Ingegneria tissutale: generalità

Il trattamento di patologie legate al malfunzionamento o alla perdita di funzionalità di organi e tessuti prevede l'impiego di due principali strategie: l'introduzione di protesi artificiali e il trapianto di organi. L'approccio tradizionale attraverso l'utilizzo di protesi artificiali presenta dei limiti intrinseci che, malgrado i notevoli progressi circa il recupero di alcune funzioni, sembrano comunque insuperabili. La strategia di base secondo cui è possibile sostituire una parte di un sistema vivente estremamente complesso con un sistema artificiale è, forse, troppo semplicistica. Un diverso approccio è quello del trapianto che, nonostante consenta di recuperare integralmente le funzionalità dell'organo da sostituire, presenta due grandi problemi: il primo è il rigetto, ossia una risposta immunitaria negativa dell'organismo nei confronti dell'organo trapiantato, ed il secondo è la scarsissima disponibilità di organi.

Da un lato la richiesta crescente di organi artificiali e supporti protesici, dall'altro i progressi raggiunti sia nelle metodologie di coltura cellulare che nello sviluppo di nuovi biomateriali, hanno orientato l'interesse della ricerca scientifica alla medicina rigenerativa e, in tale ambito, l'ingegneria tissutale, che prevede la riparazione del tessuto danneggiato. Si sono aperti così diversi scenari tra cui la possibilità di inserire fattori di crescita nel sito danneggiato, in modo da stimolare le cellule a rigenerare il tessuto, o alternativamente coltivare *in vitro* un tessuto che, una volta rigenerato, può essere impiantato *in vivo*.

In entrambi i casi è essenziale la presenza di una matrice tridimensionale (*scaffold*), cellule staminali o specifico del tessuto, e molecole segnale, che stimolino le cellule alla proliferazione e differenziamento (figura 8).

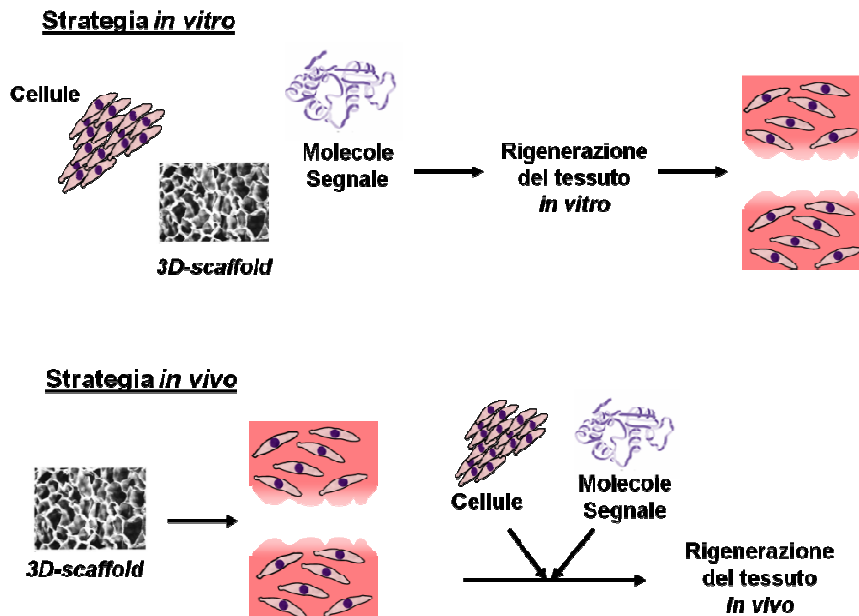


Figura 8. Strategie di Ingegneria Tissutale *in vitro* ed *in vivo*. I due approcci prevedono una rigenerazione del tessuto *in vitro* che sarà successivamente impiantato *in vivo* o l'impianto diretto dello scaffold funzionalizzato con cellule e molecole segnale al fine di stimolare la rigenerazione tissutale *in vivo*.

2.2 Scaffold tridimensionali per ingegneria tissutale in grado di mimare la matrice extracellulare

Lo scaffold tridimensionale deve possedere caratteristiche di biocompatibilità, in quanto ha, prima di tutto, lo scopo di sostituire temporaneamente la matrice extracellulare, rispondendo agli specifici requisiti biologici e meccanici. In particolare, il supporto polimerico ha il compito di indurre una risposta cellulare che stimoli la ricrescita del tessuto. In tal senso, assume un ruolo primario l'impiego delle molecole segnale, solitamente macromolecole di natura proteica (i.e. di fattori di crescita e citochine), direttamente coinvolte nella proliferazione cellulare e rigenerazione tissutale.

2.2.1 La matrice extracellulare (ECM)

La matrice extracellulare (ECM) è il mezzo naturale di crescita, differenziazione e migrazione cellulare (Meredith *et al.*, 1993; Bosman *et al.*, 2003). L'interazione cellule-ECM è specifica e biunivoca. Le cellule sono capaci di sintetizzare, assemblare e degradare i componenti della ECM in seguito a stimoli chimici specifici, mentre la ECM guida e controlla le specifiche funzioni cellulari. Questa interazione costante tra cellule ed ECM è fondamentale nello sviluppo e nella rigenerazione dei tessuti. I principali componenti della ECM e i rispettivi ruoli e localizzazioni, sono rappresentati in tabella (tabella 2).

Tabella 2: Schematizzazione dei principali componenti della ECM, funzione e localizzazione.

Componente	Funzione	Localizzazione
Collagene	Forza di tensione, interazioni cellula-ECM, interazioni cellula-cellula, attivazione dei fibroblasti	Ubiquitario
Proteoglicani	Fibrillazione del collagene, resistenza alle forze di compressione, trasporto dei nutrienti, proliferazione dei fibroblasti e condrociti, migrazione e proliferazione delle cellule	Ubiquitario
Acido Ialuronico	Trasporto di metaboliti e nutrienti, resistenza del tessuto alle forze di compressione, migrazione e proliferazione delle cellule	Ubiquitario
Laminine	Segnali intracellulari, differenziazione e migrazione delle cellule	Membrane basali
Fibronectina	Adesione cellulare alla ECM, migrazione e proliferazione delle cellule	Ubiquitario
Fattori di crescita	Molecole segnale	Ubiquitario

La ECM è una matrice densa principalmente composta da proteine secrete localmente dalle cellule e da polisaccaridi, che formano una intricata rete molecolare di maglie e gel, strettamente interconnessa alle cellule mediante proteine segnale presenti nella matrice. L'organizzazione e la concentrazione di tali molecole varia per tipi di tessuti e, durante i processi di sviluppo e rigenerazione tissutale, varia per resistenza alle forze di tensione e compressione e per proprietà di trasporto delle molecole segnale. Le proprietà dinamiche della ECM sono regolate dall'attività di proteoglicani e molecole segnale, tra cui i fattori di crescita (GFs)

che svolgono un ruolo fondamentale nel controllo delle interazioni cellula-ECM e cellula-cellula.

2.2.2. Interazioni ECM-GF: ruolo nella crescita e rigenerazione dei tessuti

I GFs sono molecole di natura proteica coinvolte nella regolazione delle proprietà dinamiche della ECM, mediante interazioni specifiche con recettori di superficie (Flaumenhaft *et al* 1992., Gumbiner *et al.*, 1996; Taipale *et al*, 1997). Durante la genesi del tessuto, i GFs vengono secreti dalle cellule al fine di stimolare la proliferazione, il differenziamento e la migrazione cellulare. I GFs sono prodotti dalle cellule in forma latente come molecole legate alla membrana cellulare o come precursori ad alto peso molecolare, che successivamente subiscono la conversione in forma attiva mediante idrolisi. Inoltre i GFs tendono comunemente a formare legami con molecole presenti nella matrice extracellulare, quali ad esempio glicosaminoglicani (i.e. eparina). Tali interazioni possono alterare le proprietà dei GF, modificandone le proprietà di trasporto e regolandone il passaggio dalla forma attiva alla forma latente.

Durante la genesi del tessuto i GFs liberi guidano le cellule nella formazione ed organizzazione del neotessuto. L'integrazione in forma latente di GFs all'interno della ECM è necessaria per ottenere una rapida trasduzione del segnale, in modo da contrastare la perdita di molecole segnale libere dovuta alla degradazione extracellulare. Inoltre, i gradienti di concentrazione dei GFs svolgono un ruolo cruciale nell'organizzazione della ECM, in quanto sono in grado di guidare l'adesione, la migrazione e la differenziazione cellulare ed organizzano l'architettura delle cellule in complesse strutture (i.e. rete di vascolarizzazione, rete nervosa) (Babensee *et al.*, 2000; Boontheekul *et al.*, 2003; Saltzman *et al.*, 2002). Quindi, la conformazione spaziale del tessuto è dettata sia dalla struttura tridimensionale della ECM che dai gradienti di concentrazione nello spazio e nel tempo delle molecole segnale (Chen *et al.*, 2003).

2.2.3. *ECM-Mimicking scaffolds*

Studi volti all'identificazione delle proprietà meccaniche e biologiche della ECM, hanno permesso di identificare i requisiti fondamentali affinché uno *scaffold* polimerico tridimensionale possa essere efficacemente impiegato in applicazioni di ingegneria tissutale. Un 3D-*scaffold* ideale deve fornire: i) integrità al tessuto, agendo da supporto meccanico per la sua ricrescita; ii) una guida per la risposta biologica attraverso la promozione di interazioni dinamiche con il tessuto circostante; iii) una promozione del trasporto dei nutrienti e metaboliti, ottimizzando la risposta biologica o farmacologia; iv) adeguata biocompatibilità e biodegradazione, al fine di minimizzare la tossicità sia a livello del neo-tessuto sia a livello sistemico; v) tecniche di preparazione facili ed accessibili.

La scelta del biomateriale di partenza è un passaggio chiave nella produzione dello *scaffold*. per applicazioni di ingegneria tissutale. Diversi materiali sono stati sino ad ora oggetto di studio, in funzione del tipo di tessuto da rigenerare (i.e., tessuto molle, tessuto connettivo) e dalla funzione svolta all'interno dell'organismo. Alcune scelte possibili sono rappresentate in tabella (tabella 3).

Una grande quantità di materiali può essere impiegata per la produzione di *scaffold* tridimensionali, tenendo sempre in considerazione la necessità di utilizzare materiali biocompatibili che non diano luogo a reazioni secondarie indesiderate.

Ad oggi, mediante l'impiego di tali biomateriali è stato possibile ottenere numerosi risultati positivi, soprattutto nella rigenerazione di tessuti relativamente poco complessi, quali tessuto epiteliale, osseo e cartilagineo (Ungaro *et al.*, 2005). Nella rigenerazione di tessuti più complessi (e.g., tessuti epatici, muscolo liscio, tessuti altamente vascolarizzati), tuttavia, uno dei punti cruciali è il controllo della concentrazione delle molecole segnale all'interno dello *scaffold*, capaci di stimolare e guidare la differenziazione e la proliferazione delle cellule, orientando opportunamente la ricrescita del tessuto.

Tabella 3: Schematizzazione dei principali materiali impiegati nella produzione di *scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale.

Materiali		Caratteristiche ed applicazioni	Bibliografia
Origine naturale	Collagene	Idrogeli	(Pachence;
		Degradazione enzimatica	Sokolsky-
		Rigenerazione tessuti molli	Papkov;
		Differenziazione cellulare	Battista;
		Ingegnerizzazione dei capillari	Hudon)
	Acido Ialuronico(HA) e derivati	Ingegnerizzazione del derma	
		Capacità d'idratazione	(Brun;
		Rigenerazione della pelle e del tessuto cartilagineo	Segura)
	Collagene-HA	Supporto per la crescita cellulare	
		Gel idrofilico	(Xin)
Chitosano	Buone proprietà meccaniche		
	Microsfere a base di chitosano integrate in <i>scaffolds</i>	(Shi; Lee)	
Fibrina	Rigenerazione tessuto cartilagineo		
	Ingegnerizzazione dei vasi sanguigni	(Ye; Jeon)	
	Rilascio di fibroblasti		
Gelatina	Ingegnerizzazione della trachea	(Okamoto;	
		Ito)	
Sintetici	Spugne a base di gelatine	Rilascio controllato di BMP-2	
		Rilascio di molecole che controllano l'adesione cellulare	
	Alginato	Ingegnerizzazione dei vasi sanguigni	(Perets)
	Acido poli-glicolico (PGA)	Poliestere biodegradabile	(Lutolf)
	Acido poli-lattico (PLA)	Ingegnerizzazione muscolo scheletrico	
	Acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA)	Rigenerazione del tessuto cartilagineo	
	Supporti tubolari a base di PLGA	Ingegnerizzazione fibrovascolare.	(Day)
	Poli (ϵ -caprolattone) (PCL)	Poliestere degradabile mediante idrolisi	(Ng)
		Rigenerazione della pelle	
Polyetilenglicole (PEG);	Idrogeli sintetici	(Lutolf)	
	Rigenerazione del tessuto osseo.		
Inorganici	Fosfato tricalcico, Idrossiapatite	Sostituiscono il tessuto osseo	(Holland)
Semi- sintetici	HA tiolato poly(PEG) diacrilato legato con poli(PEG)diacrilato	Rigenerazione corde vocali	(Paul)

2.3 Controllo della concentrazione di molecole segnale nello scaffold

Durante la genesi di un tessuto, la presenza di GF solubili è necessaria per stimolare l'attività cellulare ed orientare e guidare la formazione del neotessuto (Teo *et al.*, 2006; Guarino *et al.*, 2007; Langer *et al.*, 2004). Quindi la capacità di controllare la concentrazione di specifici GF in uno *scaffold* mediante rilascio da CRS o sistemi cellulari, può ottimizzare il processo di ingegnerizzazione di un nuovo tessuto, in entrambe le strategie di ingegneria tissutale (*in vitro* ed *in vivo*). Ad oggi, l'impiego di GF in strategie di ingegneria tissutale ha portato a risultati molto promettenti in diverse applicazioni, tra cui la rigenerazione del tessuto osseo, terapie di lesioni e neovascolarizzazione (Gurdon *et al.*, 1994; Tanabe *et al.*, 1996).

La genesi e lo sviluppo di un tessuto e la conversione in un sostituto funzionale, tuttavia, è un processo complesso e multifasico, in cui è fondamentale l'azione e la naturale sequenza dei segnali biologici, che deriva dalla presenza dei gradienti chemotattici. Tali gradienti sono fondamentali ai fini di un'ottimale crescita del tessuto, non solo perchè sottopongono le cellule a un continuo ed appropriato stimolo ma anche perchè, creando veri e propri flussi all'interno della matrice, orientano la crescita del tessuto nello spazio. Una coordinazione a livello spaziale, quindi, è importante per mantenere un equilibrio pseudo-stazionario-dinamico tra i tempi di diffusione ed azione ed i tempi di metabolizzazione e degradazione dei GF. Creando e mantenendo tali gradienti stabili per il periodo di tempo richiesto è possibile ottimizzare la formazione di un neo-tessuto (Boontheekul *et al.*, 2003) (figura 9).

Impiegando strategie che permettano di rilasciare in modo controllato i GF all'interno del 3D-*scaffold* è possibile ricreare i gradienti chemotattici, al fine di creare un supporto che possa mimare al meglio il naturale ambiente extracellulare e ottimizzare, così, la crescita e lo sviluppo del neo-tessuto. Le strategie che permettono di raggiungere concentrazioni efficaci dei GFs (i.e. nella forma bioattiva, nelle appropriate concentrazioni, per tempi necessari a scaturire una risposta cellulare), rimangono un obiettivo di fondamentale importanza in ingegneria tissutale (Saltzman *et al.*, 2002).

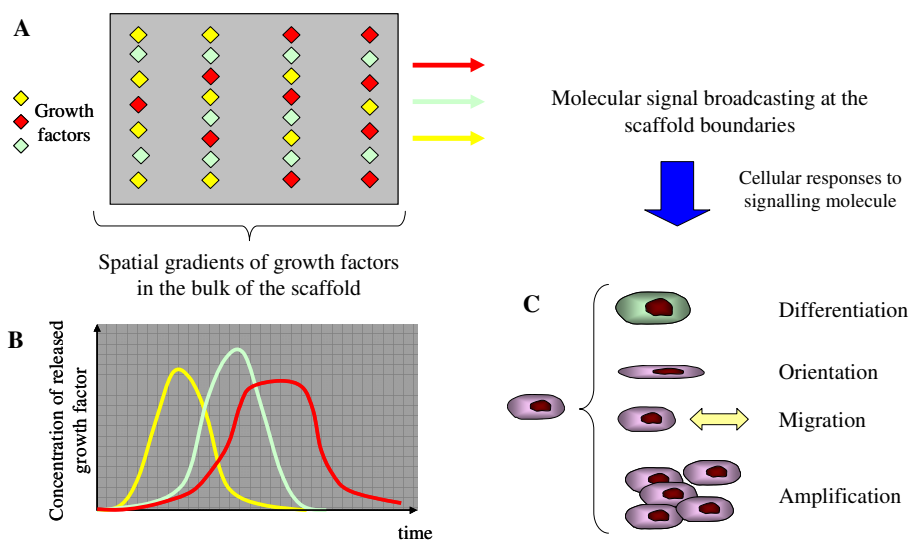


Figura 9. Scaffold multifunzionali per applicazioni di ingegneria tissutale, basati sul del rilascio controllato di molecole segnale. Scaffold tridimensionali o idrogeli (A) che rilasciano GFs secondo cinetiche e gradienti spazio-temporali predeterminati, in seguito all'incapsulazione delle macromolecole in CRS o anche alla semplice dispersione nello scaffold. E' possibile in tal modo ottenere un rilascio dei GFs ad intervalli di tempo distinti (B) al fine di riprodurre *in vitro* l'appropriata sequenza di stimoli chimici per la risposta cellulare.

2.4 Scaffold bioattivati con molecole segnale

La bioattivazione di un 3D-scaffold per applicazioni di ingegneria tissutale, può essere ottenuta mediante differenti strategie. Le strategie principali prevedono l'incorporazione delle molecole segnale nella matrice polimerica attraverso semplice diffusione o immobilizzazione attraverso interazioni elettrostatiche o legami covalenti (Biondi *et al.*, 2008) (figura 10).

Quando direttamente dispersi all'interno della matrice, il rilascio dei GFs segue una cinetica regolata dalle proprietà fisico-chimiche del materiale di cui è costituito lo scaffold e, generalmente, non può essere controllata. Dall'altro lato, le strategie di immobilizzazione dei GFs, devono tenere in debita considerazione la struttura tridimensionale e il sito d'azione del GF, al fine di immobilizzare la macromolecola senza però comprometterne l'attività (Biondi *et al.*, 2008; Dinbergs *et al.* 1996). Inoltre, in entrambe le strategie, l'attività della macromolecole può

essere seriamente compromessa durante il processo di produzione dello *scaffold*, oltre a non essere opportunamente protetta dalla degradazione enzimatica una volta a contatto con il microambiente biologico *in vivo*.

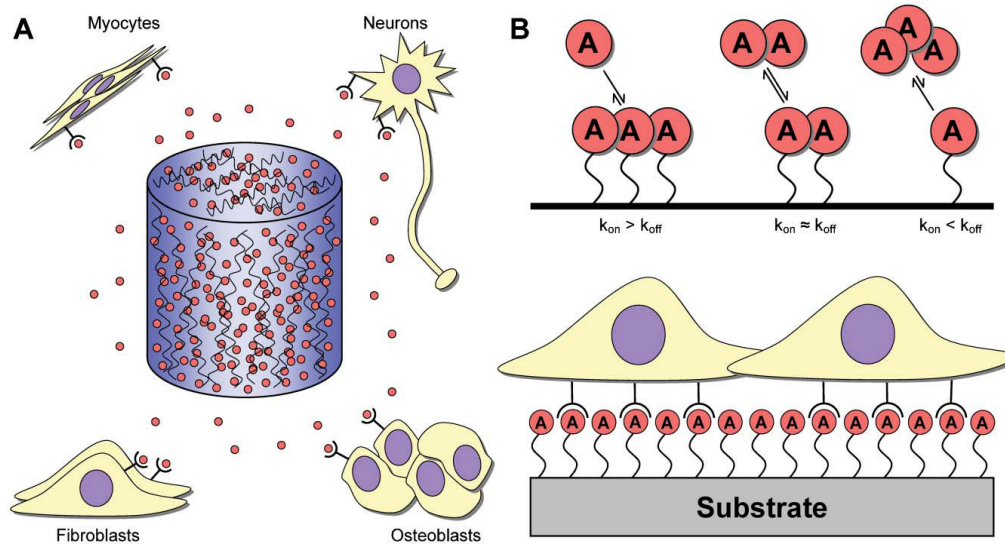


Figura 10. Comuni meccanismi di bioattivazione degli *scaffold*. (A) Dispersione e successiva diffusione delle molecole segnale (punti rossi) dalla matrice polimerica. (B) Immobilizzazione nella matrice polimerica delle molecole segnale attraverso interazioni elettrostatiche o legami covalenti.

Una strategia innovativa per il controllo della concentrazione di molecole segnale all'interno di 3D-*scaffold* prevede l'impiego di CRS per il rilascio di GFs da disporre nel supporto tridimensionale (figura 11).

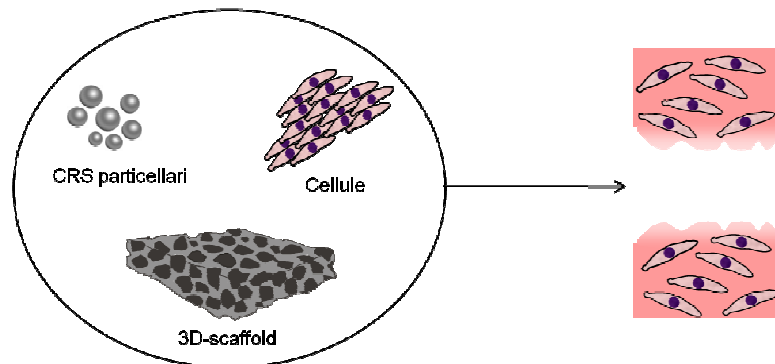


Figura 11: Sistemi integrati *scaffold*/CRS di natura particellare per il rilascio di molecole segnale all'interno del supporto polimerico tridimensionale.

I CRS possono essere impiegati per l'incapsulazione sia di segnali macromolecolari (i.e., GFs) che di molecole a basso peso molecolare, e possono circoscrivere il rilascio della molecola segnale in un'area specifica e ad intervalli di tempo ottimizzabili (Chen et al., 2003; Saltzman et al., 2002). I CRS offrono alla molecola incapsulata una protezione adeguata, preservando l'attività del segnale fino a completo rilascio. Inoltre, i CRS permettono un controllo sulla dose di GF rilasciato in funzione del tempo, rendendo semplice il raggiungimento ed il mantenimento delle concentrazioni efficaci necessarie. L'impiego di sistemi a rilascio controllato offre, infine, l'opportunità di rilasciare più molecole segnale a differenti intervalli di tempo, impiegando distinti CRS ed ottimizzando i profili di rilascio in funzione della specifica applicazione. In tal senso, appare particolarmente promettente, tra i diversi CRS, l'impiego di sistemi particellari.

3. Micro e nanoparticelle per il rilascio modificato di molecole segnale in applicazioni di ingegneria tissutale: stato dell'arte

Sistemi particellari (i.e. micro e nanoparticelle) sono stati largamente studiati ed ottimizzati come veicoli per GFs. In particolare, in letteratura sono riportati numerosi esempi di incapsulazione di tali molecole segnale di natura proteica in sistemi particellari a base di PLGA. Ad oggi, è stata dimostrata la validità di microsfeere a base di PLGA per il rilascio controllato di fattori di crescita proangiogenici, quali il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Cleland *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002), per stimolare l'angiogenesi a livello locale. Differenti formulazioni di microparticelle a base di PLGA sono state sviluppate e ottimizzate per la veicolazione del NGF (*Nerve Growth Factor*), per la terapia di patologie neuronali (Saltzman *et al.*, 1999; Pean *et al.*, 2000), IGF-I per terapie di rigenerazione del tessuto osseo (Meinel *et al.*, 2001) ed EGF, impiegato al fine di stimolare l'attività di epatociti in seguito a trapianto (Mooney *et al.*, 1996). Sistemi particellari a base di PLGA poly(etilengliole) (PEG), hanno permesso di incapsulare efficacemente il TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*), al fine di ottenere una risposta cellulare modulata durante la fase di rigenerazione del tessuto osseo. Per rigenerazioni del tessuto osseo sono state sviluppate nanoparticelle a base di PLGA contenenti BMP-2 (*bone morphogenetic protein*) (Chung *et al.*, 2007)

In letteratura sono, inoltre, presenti riferimenti a strutture integrate CRS-*scaffold*, per applicazione di ingegneria tissutale. Anche in tal caso, i CRS maggiormente impiegati sono sistemi particellari a base di PLGA, come nel caso di microparticelle integrate in uno *scaffold* a base di alginato per la veicolazione del FGF (Fibroblast Growth Factor), al fine di stimolare l'organizzazione delle cellule endoteliali in vasi sanguigni (i.e. angiogenesi) (Perets *et al.*, 2003) Nell'ingegnerizzazione del tessuto cartilagineo, l'impiego di microparticelle contenenti TGF- β 1, inglobate in *scaffold* a base di chitosano, ha permesso di ottenere un'ottimizzazione della rigenerazione di tale tessuto. Risultati incoraggianti sono

stati ottenuti anche dall'associazione di CRS contenenti GF differenti, come nel caso del rilascio combinato di VEGF e PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) in *scaffolds* per ingegneria tissutale (Richardson *et al.*, 2001), e IGF-I (*Insulin-like Growth Factor*) e TGF- β 1 (Elisseff *et al.*, 2001), per la rigenerazione di tessuto cartilagineo.

CAPITOLO I

**Nanosistemi a base di PLGA/Polossamero
per il rilascio controllato
di fattori di crescita PDGF-BB e FGF-2**

1.Introduzione

Negli ultimi anni, è stata valutata l'importanza dei fenomeni di angiogenesi e neoangiogenesi in applicazioni di ingegneria tissutale. Infatti, tale strategia rigenerativa ha già raggiunto, oggi, numerosi traguardi in applicazioni su tessuti relativamente semplici, quali tessuto cartilagineo, osseo e derma. L'ingegnerizzazione di tessuti ritenuti più complessi presenta, tuttavia, ancora numerosi limiti legati alla difficoltà nel controllo dei numerosi processi che accompagnano la rigenerazione, come la necessità di ottenere una rete di vasi sanguigni *ex novo* o da vasi sanguigni preesistenti (rispettivamente neoangiogenesi ed angiogenesi) che garantisca la normale crescita del tessuto mediante il rifornimento di ossigeno e sostanze nutritive e l'eliminazione dei residui metabolici.

La formazione di nuovi vasi sanguigni è un fenomeno piuttosto complesso a cui partecipano numerose molecole segnale, che sono state individuate in seguito a studi approfonditi sui fenomeni di angiogenesi e neoangiogenesi. Tra i fattori proangiogenici identificati, un ruolo importante è svolto dai GFs, con particolare riferimento al fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) ed il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) (figura 1).

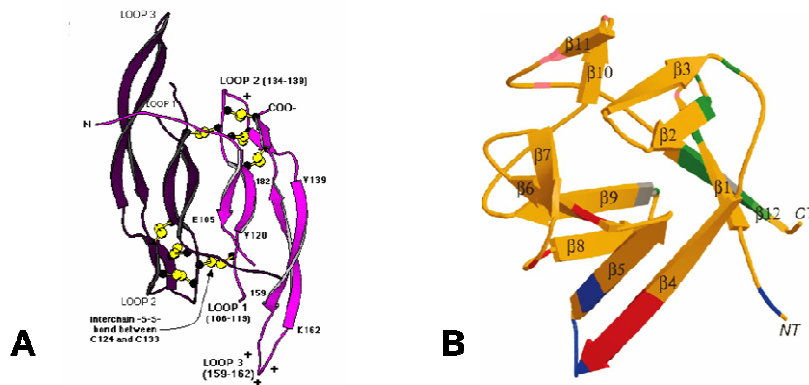


Figura 1. Struttura tridimensionale del PDGF-.BB (A) e FGF-2 (B).

La famiglia dei fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF), è composta da quattro isoforme, codificate dallo stesso gene per *splicing* alternativi dello stesso RNA messaggero, differenti per numero di residui aminoacidici (PDGF-A 211 a.a., PDGF-B 241 a.a., PDGF-C 345 a.a., PDGF-D 370 a.a.). Le quattro isoforme presentano motivi strutturali comuni, come le sequenze coinvolte nella regolazione delle proprietà biologiche di tali fattori. In particolare sul dominio amino-terminale è localizzata la sequenza responsabile dell'interazione con i recettori ad attività tirosino-chinasica, mentre il dominio carbossi-terminale presenta un'alta concentrazione di residui aminoacidici di natura basica che favoriscono le interazioni elettrostatiche con eparina e proteine plasmatiche (Fredriksson *et al.*, 2004). E' stato individuato, inoltre, il dominio (*knot motif*) costituito da circa 100 residui aminoacidici che, comune a numerosi fattori di crescita, risulta essere coinvolto nella dimerizzazione delle due subunità. Le quattro differenti catene peptidiche possono, infatti, formare omo- o etero-dimeri mediante la formazione di ponti disolfuro. L'omodimero costituito da due catene PDGF-B (PDGF-BB), risulta essere l'isoforma più attiva (Heldin *et al.*, 2004), in quanto è in grado di interagire ed attivare le tre differenti isoforme del recettore del PDGF (PDGFR $_{\alpha\alpha}$, PDGFR $_{\beta\beta}$ e PDGFR $_{\alpha\beta}$). Per tali motivi l'interesse nel campo dell'ingegnerizzazione dei tessuti è stato rivolto al fattore di crescita nella sua forma omo-dimerica (PDGF-BB)

La famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti è ancora più numerosa. Sono stati identificati, infatti, fino a 23 isoforme di FGF. Tutti presentano un peso molecolare compreso tra i 17 ed i 34 kDa, e un core centrale che rappresenta il dominio di interazione con i recettori (Faham *et al.* 1996.). Studi sulla struttura dei fattori effettuati sulle isoforme FGF-1 ed FGF-2 (Zhu *et al.*, 1991) hanno permesso di identificare 12 filamenti β antiparalleli, (Ornitz, 2000). due tra i quali, (β_{10} e β_{11}), costituiscono il sito di legame con l'eparina (*heparin binding domain*). La regione coinvolta nell'interazione con l'eparina risulta essere vicina, ma nettamente distinta, al dominio di interazione con i recettori del GF (FGFR) (Plotnikov *et al.*, 2000). Tra le isoforme del FGF conosciute e studiate, l'isoforma FGF-2, nota anche come FGF

basic o bFGF per un'elevata presenza di residui aminoacidi di natura basica, si presenta come uno dei fattori di crescita ad attività proangiogenica più attivi (Zhu *et al.*, 1991).

Studi recenti, hanno dimostrato che l'associazione FGF-2/PDGF-BB può risultare in un'azione sinergica dei due segnali, in grado non solo di stimolare le cellule endoteliali a riorganizzarsi in forma di vasi sanguigni, ma soprattutto di ottenere una rete vascolare ben organizzata e stabile nel tempo (Cao *et al.*, 2003). Come precedentemente sottolineato, tuttavia, l'impiego dei GFs di natura proteica è fortemente limitato dalla breve emivita *in vivo* e dall'instabilità chimica e fisica di tali macromolecole. Tali fenomeni possono minare la struttura nativa di entrambi il PDGF-BB e FGF-2, che abbiamo visto svolgere un ruolo fondamentale nelle interazioni al sito d'azione e, quindi, nella regolazione dell'attività angiogenica. Al fine di ottimizzare l'attività biologica, un approccio interessante della ricerca nel settore prevede l'impiego di CRS particellari che garantiscano la stabilità della macromolecola, direzionino l'azione terapeutica e minimizzino gli effetti collaterali.

Questa parte del lavoro di tesi, svolta presso i laboratori di tecnologia farmaceutica della Prof.ssa Maria José Alonso, fa capo ad un progetto europeo, Vascuplug, inserito nel 6th Framework Program of the European Community 3-NMP (Nanotechnologies and nano-sciences, knowledge-based multifunctional materials and new production processes and devices), il cui scopo finale è lo sviluppo di *scaffold* tridimensionali funzionalizzati per applicazioni di ingegneria tissutale. In particolare, la necessità di ricreare le condizioni fisiologiche (i.e., stimoli chimici) necessarie al fine di ottenere la formazione di vasi sanguigni funzionali, prevede l'impiego di sistemi biodegradabili capaci di controllare nel tempo la concentrazione di molecole segnale *in situ*. In tale ambito, la ricerca ha previsto la progettazione e lo sviluppo di nanoparticelle biodegradabili a base di *blends* di PLGA/Polossamero per il rilascio controllato di due principali fattori responsabili della neoangiogenesi del tessuto, PDGF-BB e FGF-2.

2. Materiali e Metodi

2.1 Materiali

L'acido poli (D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA) 50:50 (Resomer® RG 503, i.v. 0.32 - 0.44 dl/g) è stato acquistato presso la Boehringer Ingelheim (Germania). Il polossamero188 (Pluronic® F68), Mw 8400, HLB 29), albumina da siero bovino (BSA), eparina sale sodico (Hp), il substrato liquido ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfurico) ed il tampone fosfato (0.01 M Na₂HPO₄, 0.0027 M KCl e 0.137 M NaCl, pH 7.4). sono stati acquistati presso la Sigma Aldrich (USA). I fattori di crescita PDGF-BB ed FGF-2, con i rispettivi kit ELISA per la determinazione quantitativa, sono stati forniti dalla Peprotech (New Jersey, USA). Tutti i solventi utilizzati sono di grado analitico e per HPLC e sono stati forniti da Merck (USA). L'acqua impiegata è stata filtrata mediante filtri 0,22 µm (Millipore, USA).

2.2 Nanoparticelle a base di PLGA e Polossamero contenenti PDGF o FGF

2.2.1 Preparazione delle nanoparticelle

Le nanoparticelle, costituite da una miscela polimerica (*blend*) a base di PLGA e polossamero (ratio 1:1 p/p), sono state preparate mediante la tecnica di diffusione del solvente (Csaba *et al.*, 2005). In particolare, sono state realizzate due differenti formulazioni di nanoparticelle contenenti rispettivamente PDGF-BB (*Nano BHP*) e FGF-2 (*Nano BHF*). Per entrambi i GF, l'incapsulazione teorica è stata fissata allo 0,01% (mg di GF per 100 mg di nanoparticelle). Quali agenti stabilizzanti sono stati incapsulati BSA ed Hp con un'incapsulazione teorica rispettivamente pari a 0,01% e 1%.

Una soluzione acquosa del fattore di crescita (200 µl), contenente BSA e Hp, è stata emulsionata mediante vortex (2400 min⁻¹, Heidolph, Germania) con 2 ml di una soluzione di PLGA (1% p/v) e polossamero 188 (1% p/v) in diclorometano.

L'emulsione ottenuta è stata addizionata a 12,5 ml di etanolo, mantenuti sotto moderata agitazione elettromagnetica, allo scopo di ottenere la immediata precipitazione del polimero in forma di nanoparticelle. La sospensione di nanoparticelle è stata diluita con 12,5 ml di acqua filtrata e l'agitazione elettromagnetica è stata mantenuta per 10 minuti, per favorire la evaporazione del solvente organico. Infine, le nanoparticelle sono state concentrate sotto vuoto a 30°C, mediante Rotavapor® (Heidolph VV 2000, Germania), fino a raggiungere un volume di 10 ml. Le nanoparticelle sono state successivamente isolate mediante centrifugazione a 8000 rcf, 5°C per 1 ora, il supernatante prelevato e le nanoparticelle risospese in acqua filtrata.

Nanoparticelle di controllo bianche (*Nano Bianche*), contenenti solo Hp (*Nano H*), BSA ed Hp (*Nano BH*) e Hp e PDGF (*Nano HP*) sono state preparate nelle stesse condizioni formulative.

2.2.2 Morfologia, Dimensioni e Potenziale ζ delle Nanoparticelle

a) Osservazione al microscopio a trasmissione elettronica (TEM)

La morfologia delle nanoparticelle è stata analizzata mediante Microscopia Trasmissione Elettronica (TEM) (CM 12 Philips, Eindhoven, Olanda). Brevemente, 10 μ l di una sospensione di nanoparticelle (3 mg/ml) sono stati adagiati su un rete metallica, supporto specifico per analisi mediante TEM. Le nanoparticelle sono state in seguito trattate con acido fosforico (2% p/v), il supporto è stato essiccato a temperatura ambiente ed analizzato.

b) Analisi delle dimensioni e del potenziale ζ

Le dimensioni ed il potenziale ζ delle nanoparticelle sono stati determinati mediante a Zetasizer® 3000HS (Malvern Instruments, UK). In particolare le dimensioni sono state valutate mediante la tecnica Photon Correlation Spettroscopy (PCS), analizzando la sospensione di nanoparticelle opportunamente diluita in acqua. L'analisi del potenziale ζ delle particelle è stata effettuata mediante Laser

Doppler Anemometry (LDA), diluendo opportunamente il campione con una soluzione salina KCl 1N.

2.2.3 Analisi quantitativa dei fattori di crescita PDGF-BB e FGF-2

La quantità di GF incapsulata e rilasciata dalle microsferi è stata quantificata mediante saggio immunoenzimatico specifico ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) secondo la procedura consigliata dal produttore (Peprotech, USA). Brevemente, 100 µl di soluzione acquosa dell'anticorpo monoclonale d'analisi specifico per il GF (1 µg/ml), vengono aggiunti a ciascun pozzetto della piastra (96-well plates, Immulon 4HBX, Thermo). La piastra è incubata a temperatura ambiente per tutta la notte e successivamente ciascun pozzetto è lavato 4 volte con PBS pH 7,4 contenente Tween-20 allo 0,05% (p/v) (*Wash Buffer*) (300 µl/pozzetto). Si bloccano i siti attivi rimasti liberi con una soluzione di BSA 1% (p/v) in PBS pH 7,4 (*Block Buffer*) incubando la piastra per circa 1 ora. Dopo lavaggio si aggiungono le soluzioni standard del GF o i campioni da analizzare, opportunamente diluiti (100 µl per pozzetto) e si incubano la piastra per 2 ore a temperatura ambiente. In seguito ad un ulteriore lavaggio con *Wash Buffer*, si aggiungono ad ogni pozzetto 100 µl di una soluzione di anticorpo policlonale specifico per il GF (0,25 µg/ml), necessario per la quantificazione e si incubano nuovamente la piastra per 2 ore a temperatura ambiente. Ad un successivo lavaggio della piastra con *Wash Buffer*, segue l'aggiunta ad ogni pozzetto di 100 µl di una soluzione dell'enzima avidina perossidasi. La piastra è, quindi, incubata a temperatura ambiente per 30 minuti, lavata 4 volte con *Wash Buffer*, e successivamente si aggiungono ad ogni pozzetto 100 µl di ABTS, capace di interagire con l'avidina perossidasi e dar luogo ad una reazione colorimetrica. La placca è, quindi, analizzata mediante spettrofotometro per piastre multiwell (Wallac 1420 Victor 3, PerkinElmer Instruments, USA) ad una lunghezza d'onda di 405 nm e una di riferimento di 650 nm. La variazione di assorbanza osservata è proporzionale alla concentrazione di GF analizzata.

2.2.4. Efficienza d'incapsulazione delle nanoparticelle

La determinazione delle quantità di PDGF-BB e FGF-2 incapsulate nelle nanoparticelle è stata effettuata mediante degradazione del *blend* polimerico per idrolisi basica. La sospensione di nanoparticelle è stata diluita ad 1 mg/ml in una soluzione basica per NaOH 0,05 N. La sospensione così ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione elettromagnetica per circa 1 ora a temperatura ambiente, fino a completa degradazione della matrice polimerica. Le soluzioni ottenute sono state opportunamente diluite ed analizzate per il contenuto di GF mediante saggio immunospecifico ELISA, come precedentemente descritto. I risultati sono stati espressi come incapsulazione reale percentuale o *actual loading* (mg di GF incapsulato per mg di nanoparticelle) ed efficienza di incapsulazione (mg reali di GF incapsulati / mg di GF teorici X 100) \pm la deviazione standard (D.S.) della misura effettuata su quattro differenti lotti.

2.2.5. Cinetiche di rilascio in vitro

Gli studi di rilascio *in vitro* di PDGF-BB e FGF-2 dalle nanoparticelle sono stati realizzati portando la concentrazione finale della sospensione di nanoparticelle a di 1 mg/ml, in PBS a pH 7,4. I campioni ottenuti sono stati incubati a 37°C in condizioni statiche per mimare le condizioni di rilascio delle nanoparticelle disperse in uno *scaffold*. Ad intervalli regolari di tempo, le nanoparticelle sono state isolate mediante centrifugazione a 8000 rcf, a 5°C, per 1 ora, risospese in una soluzione basica NaOH 0,05% e mantenute sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 1 ora, fino a completa degradazione del *blend* polimerico. Come precedentemente descritto, le soluzioni ottenute sono state analizzate, in seguito ad opportuna diluizione, mediante ELISA. Si determina così la quantità di GF residuo nelle nanoparticelle e, per differenza, la quantità rilasciata dalle particelle ad ogni intervallo di tempo considerato.

I risultati sono stati espressi come percentuale di GF, rispettivamente PDGF-BB per la formulazione Nano BHP e FGF-2 per la formulazione Nano BHF,

rilasciato dalle nanoparticelle in funzione del tempo \pm la deviazione standard (D.S.) della misura effettuata su tre differenti lotti.

2.2.6. Stabilità delle nanoparticelle in mezzo di coltura cellulare

Tenendo in considerazione l'applicazione finale delle nanoparticelle è stato ritenuto necessario effettuare uno studio sulla loro stabilità in mezzo di coltura cellulare per assicurare che i nanosistemi mantengano costanti le proprie caratteristiche a seguito dell'integrazione negli *scaffold* polimerici contenenti le cellule. Il saggio di stabilità è stato condotto valutando nel tempo le dimensioni delle nanoparticelle sospese nel mezzo di coltura cellulare costituito da terreno minimum essential medium Eagle (Eagle's MEM) contenente Earle's BSS, 2mM L-glutamina, 1mM sodio piruvato (mezzo completo ATCC) 10% FCS (fetal calf serum) ed 1% Penicillina/Streptomicina. La concentrazione utilizzata delle nanoparticelle è tale da poter rendere possibile l'analisi dimensionale mediante PCS. I campioni sono stati incubati a 37°C ed analizzati per il diametro medio ad intervalli di tempo regolari fino ad un massimo di 48 ore.

2.2.7. Citotossicità delle nanoparticelle su linee cellulari epatiche

La citotossicità delle nanoparticelle a base di PLGA/Polossamero non cariche è stata valutata su una linea cellulare epatica (C3a). Per questo tipo di esperimento, le nanoparticelle bianche sono state preparate in condizioni asettiche e sospensioni acquose, differenti per concentrazione di particelle (0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml and 1,5 mg/ml), sono state testate sulle cellule. L'esperimento è stato condotto sia su colture cellulari che formavano uno strato non confluento (*subconfluent layer*), sia su cellule che formavano uno strato continuo (*confluent layer*). La vitalità cellulare è stata valutata dopo 24 ore di esposizione delle cellule alle nanoparticelle mediante saggio colorimetrico XTT (2,3-Bis (2- metossi- 4-nitro- 5-sulfofenil) -2H-tetrazol- 5-carbossanilide), basato sull'attività di respirazione mitocondriale delle cellule.

2.2.8. Studi di liofilizzazione delle nanoparticelle

Le nanoparticelle a base di PLGA, generalmente, sono caratterizzate da una stabilità limitata nel tempo sia in sospensioni acquose che in presenza di mezzi a forza ionica maggiore, quali PBS o mezzo di coltura cellulare. Per poter garantire una stabilità maggiore e più duratura nel tempo sono stati effettuati studi di liofilizzazione in presenza di agenti crioprotettori. Studi preliminari sono stati effettuati con due differenti crioprotettori, quali il saccarosio e trealosio. Alla luce dei risultati ottenuti, si è deciso di impiegare il trealosio per studi più approfonditi.

Una sospensione di nanoparticelle (2 mg/ml) in una soluzione acquosa di trealosio 5% (w/v) è stata congelata a -80°C e sottoposta ad un ciclo di liofilizzazione di circa 48 ore. La polvere liofilizzata è stata risospesa in acqua filtrata ed opportunamente diluita per poter essere analizzata mediante PCS, al fine di valutarne la dimensione e l'indice di polidispersità (I.P.).

3. Risultati e Discussione

3.1. Proprietà delle Nanoparticelle contenenti GF proangiogenici: PDGF, FGF

Nanoparticelle a base di *blend* di PLGA/Polossamero, contenenti rispettivamente PDGF-BB e FGF-2, sono state preparate mediante la tecnica di emulsione/diffusione del solvente (Csaba *et al.*, 2004). Tale tecnica, una tra le più impiegate per la produzione di nanoparticelle, può tuttavia presentare rischi per la stabilità di macromolecole di natura proteica, quali i GFs incapsulati. Infatti, la formazione di un'emulsione tra la fase acquosa contenente il principio attivo e la fase organica contenente la miscela di polimeri, può favorire la localizzazione del GF all'interfaccia acqua/olio, minimizzando la mobilità della molecola e favorendo, così, fenomeni di aggregazione. D'altra parte, la biodegradazione del PLGA comporta la formazione di derivati idrosolubili di natura acida, responsabili della caduta del valore di pH all'interno delle nanoparticelle. Inoltre, la natura anionica del PLGA impiegato nella preparazione di tali nanosistemi può favorire la formazione di interazioni indesiderate polimero/proteina. Tali fenomeni non solo influenzano le caratteristiche di controllo del rilascio del principio attivo, ma possono alterare la struttura nativa della macromolecola portando ad una perdita dell'attività dei GFs.

Al fine di minimizzare i rischi di denaturazione e perdita della bioattività dei GF, le formulazioni sviluppate hanno previsto l'impiego di una matrice polimerica a base di PLGA e polossamero, un eccipiente ampiamente utilizzato in tecnologia farmaceutica. Tra i diversi polossameri, l'attenzione è stata focalizzata sul polossamero 188. Particolarmente interessante è il ruolo svolto da tale polossamero nell'incapsulazione di proteine in sistemi microparticellari a base di PLGA, con particolare riguardo alla loro stabilizzazione all'interno del sistema. Studi precedenti hanno dimostrato che il polossamero 188 esercita un effetto stabilizzante sulla tossina tetanica durante l'incapsulazione in microparticelle preparate mediante la tecnica di estrazione del solvente (Tobio *et al.*, 1999). Il polossamero, inoltre, può

interagire con la tossina minimizzando le interazioni con i residui carbossilici e riducendo gli effetti della diminuzione del pH nel microambiente della microparticella dovuto alla degradazione del PLGA (Sanchez *et al.*, 1999). Il polossamero 188, infine, è stato impiegato nella preparazione di nanoparticelle a base di PLGA per il rilascio controllato di acidi nucleici (Csaba *et al.*, 2006). In tal caso è stata notata, oltre ad un'azione stabilizzante sulla molecola incapsulata, anche un'influenza sulla carica superficiale delle nanoparticelle ottenute. La presenza di polossamero sulla superficie della nanoparticella, infatti, determina una riduzione delle cariche negative di superficie che risulta in una diminuzione dei fenomeni di aggregazione delle particelle e della fagocitosi da parte dei macrofagi (Csaba *et al.*, 2006).

Accanto all'impiego del polossamero 188, quale ulteriore strategia stabilizzante, sia PDGF-BB che FGF-2 sono stati incapsulati contestualmente a due additivi, BSA e Hp. La BSA è stata individuata come agente stabilizzante perché, grazie alle sue proprietà anfifiliche, preserva il fattore di crescita dall'aggregazione all'interfaccia acqua/olio durante il processo di emulsione (*sacrificial lamb approach*) (Ungaro *et al.*, 2005.; Borselli *et al.*, 2008). La Hp, invece, interagendo con lo specifico dominio di legame presente sui fattori di crescita (*Hp binding domain*), stabilizza la struttura tridimensionale attiva della macromolecola e favorisce la sua interazione con recettori specifici localizzati sulle membrane cellulari (Tessler *et al.*, 1994; Borselli *et al.*, 2008).

Le proprietà delle formulazioni di nanoparticelle prodotte sono indicate in tabella 4. Come si può osservare, oltre alle formulazioni contenenti entrambi gli agenti stabilizzanti ed il GF rispettivamente PDGF-BB (*Nano BHP*) o FGF-2 (*Nano BHF*), sono state preparate formulazioni di controllo, quali nanoparticelle bianche (*Nano Bianche*), contenenti solo Hp (*Nano H*), contenenti Hp e PDGF-BB (*Nano HP*), contenenti BSA e Hp (*Nano BH*).

Tabella 1. Proprietà delle nanoparticelle a base di *blend* di PLGA/Polossamero.

	Molecole Incapsulate	Dimensioni (nm±D.S. ^a)	P.I.	Potenziale ζ (mV±D.S. ^a)	Resa di Produzione (%±D.S. ^a)	Efficienza di incapsulazione (%±D.S. ^a)	Actual loading
<i>Nano Bianche</i>	-	148 ± 1	0.118-0.142	-23.2 ± 7.5	77 ± 2	-	-
<i>Nano H</i>	Hp	147 ± 1	0.128-0.156	-37.1 ± 5.4	76 ± 2	-	-
<i>Nano HP</i>	Hp e PDGF	158 ± 1	0.129-0.157	-27.0 ± 1.9	74 ± 4	35 ± 2	0.0047 ± 0.0002
<i>Nano BH</i>	BSA e Hp	150 ± 1	0.136-0.150	-23.6 ± 5.3	72 ± 6	-	-
<i>Nano BHP</i>	BSA, Hp e PDGF	154 ± 1	0.118-0.142	-25.2 ± 1.1	73 ± 2	87 ± 2	0.012 ± 0.001
<i>Nano BHF</i>	BSA, Hp e FGF	165 ± 1	0.113-0.171	-26,2 ± 1.4	73 ± 2	63 ± 2	0,008 ± 0.001

^aDeviazione standard controllata su tre differenti lotti di nanoparticelle

Dai risultati riportati in tabella 4 è possibile osservare che le particelle non presentano differenze significative nei valori di diametro medio, indice di polidispersità e resa di produzione, che risultano in tutti i casi concordi con le proprietà di nanoparticelle a base di PLGA/Polossamero preparate mediante la stessa tecnica formulativa (Csaba *et al.*, 2005). Tali sistemi, infatti, mostrano generalmente diametri medi inferiori ai 300 nm, ed indici di polidispersità di circa 0,1.

Le nanoparticelle studiate presentano un potenziale ζ negativo, pari a circa -25 mV, ragionevolmente attribuibile alla presenza dei gruppi carbossilici del PLGA, E' possibile osservare un incremento della carica negativa superficiale solo nel caso della formulazione *Nano H*, contenente la sola Hp (-37 mV). La spiccata carica negativa della formulazione *Nano H* può essere giustificata dalla carica negativa propria della Hp incapsulata. Appare, tuttavia, evidente che, in presenza del PDGF-

BB (formulazioni *Nano HP* e *Nano BHP*), tale carica viene ridotta. Questa differenza è particolarmente interessante in quanto suggerisce l'effettiva presenza di Hp legata al PDGF-BB a seguito dell'interazione di tipo elettrostatico con il dominio specifico presente sui GF (*Hp binding domain*).

L'efficienza d'incapsulazione del PDGF-BB nelle nanoparticelle dipende dalle condizioni formulative adottate ed, in particolare, dagli eccipienti impiegati. Mentre la formulazione *Nano HP*, contenente solo Hp e PDGF-BB, mostra un'efficienza d'incapsulazione pari a circa il 35%, la formulazione *Nano BHP*, contenente anche la BSA, permette di incapsulare circa il 90% della quantità iniziale di PDGF-BB aggiunta alla formulazione (tabella 4). L'incremento dell'efficienza di incapsulazione in presenza di BSA può essere ragionevolmente attribuito alle proprietà tensioattive della proteina che tendono a limitare l'esposizione del GF all'interfaccia acqua/olio durante la prima emulsione, minimizzando di conseguenza la diffusione del PDGF-BB verso la fase esterna. Alla luce di tali risultati, il fattore FGF-2 è stato incapsulato direttamente con entrambi gli agenti stabilizzanti, BSA e Hp (*Nano BHF*). I risultati confermano una buona efficienza d'incapsulazione, pari a circa il 65% della quantità iniziale (tabella 1).

Le formulazioni *Nano BHP* e *Nano BHF* sono state oggetto di studi più approfonditi, quali l'analisi della morfologia mediante Microscopia a Trasmissione elettronica (TEM). Le immagini in figura 2 dimostrano che le nanoparticelle preparate sono sferiche, caratterizzate da una morfologia regolare ed una superficie liscia, in accordo con particelle solitamente ottenute mediante tale tecnica di preparazione. Tale aspetto è di particolare importanza pensando alla prospettiva d'impiego dei nanosistemi nell'integrazione in *scaffold* tridimensionali per applicazioni di ingegneria tissutale.

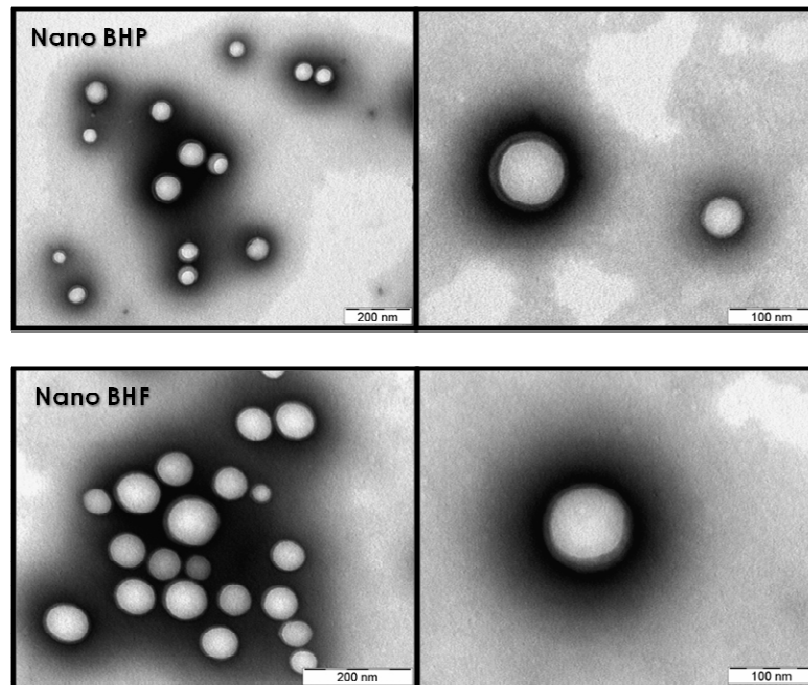


Figura 2. Analisi morfologica delle formulazioni *Nano BHP* e *Nano BHF* mediante microscopia a trasmissione elettronica (TEM)

3.2. Cinetiche di rilascio di PDGF-BB ed FGF-2 dalle nanoparticelle

I profili di rilascio di PDGF-BB ed FGF-2, rispettivamente dalle formulazioni *Nano BHP* e *Nano BHF*, sono stati ottenuti sospendendo le nanoparticelle in PBS pH 7,4 e incubando i campioni a 37°C in condizioni statiche.

I profili di rilascio del PDGF-BB e del FGF-2 risultano essere molto simili, probabilmente in ragione della loro omologia strutturale (figura 3). Entrambe le formulazioni mostrano un rilascio iniziale del GF (*burst*) pari a circa il 40 % della quantità totale incapsulata nelle nanoparticelle. *Burst* così elevati sono tipici di formulazioni a base di PLGA dalle dimensioni nanometriche (Csaba *et al.*, 2005). La prima fase di rilascio è dominata, infatti, dalla dissoluzione nel mezzo di rilascio della proteina localizzata sulla superficie della particella e/o dei macropori interni ad essa. Trattandosi di sistemi nanometrici, la superficie esposta al mezzo di rilascio

è particolarmente estesa, di conseguenza la diffusione del GF è favorita, raggiungendo così percentuali piuttosto elevate nelle prime ore di incubazione. Al *burst* iniziale, tuttavia, segue un rilascio sostenuto per oltre un mese sia del PDGF-BB che del FGF-2.

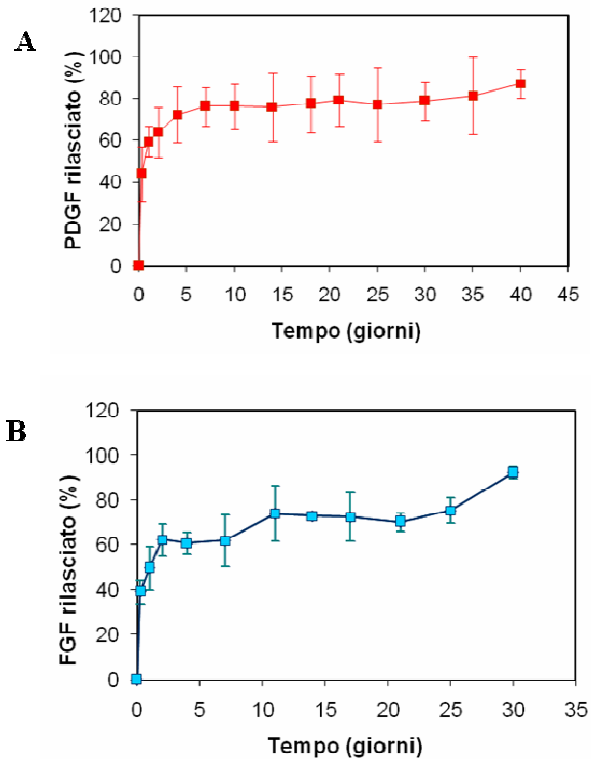


Figura 3. .Profili di rilascio del PDGF-BB (A) e FGF-2 (B) da nanoparticelle a base di *blend* di PLGA/Polossamero a 37°C, in PBS pH 7,4, in condizioni statiche.

3.3. Stabilità delle nanoparticelle in mezzo di coltura cellulare

L'applicazione finale di tali sistemi nanoparticellari è l'integrazione in *scaffold* polimerici per la rigenerazione dei tessuti. Risulta, quindi, essenziale verificare la stabilità di tali sistemi in fluidi biologici, quali ad esempio mezzi di coltura cellulare. In particolare, un'alterazione significativa delle dimensioni delle

nanoparticelle può essere indice di un fenomeno di aggregazione delle nanoparticelle, con perdita delle principali caratteristiche del sistema di rilascio.

Sospensioni di nanoparticelle non cariche (*Nano Bianche*) sono state incubate a 37°C ed analizzate ad intervalli regolari di tempo, mediante PCS, come descritto in precedenza. La variazione delle dimensioni in funzione del tempo è rappresentata in figura 4.

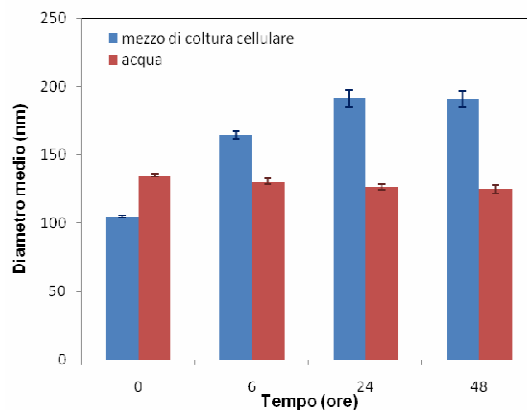


Figura 4. Analisi della variazione del diametro medio di nanoparticelle sospese in mezzo di coltura cellulare o in acqua in funzione del tempo.

Come si può osservare, le dimensioni delle nanoparticelle sospese in mezzo di coltura cellulare, in un primo momento, diminuiscono rispetto a quelle misurate in acqua. Tale comportamento è attribuibile ad un effetto osmotico, dovuto ai sali presenti in soluzione. Dopo 6 ore di incubazione, tuttavia, è possibile notare un incremento del diametro delle particelle, probabilmente dovuto all'adsorbimento di proteine e agenti nutrizionali presenti nel mezzo. In ragione della loro carica negativa superficiale, infatti, le nanoparticelle sono in grado di interagire con le cariche positive delle molecole di natura proteica presenti nel mezzo. È importante sottolineare, tuttavia, che tale incremento delle dimensioni appare limitato e costante fino a 48 ore, escludendo un fenomeno di aggregazione progressivo delle nanoparticelle. Non è stato, in ogni caso, possibile condurre lo studio per tempi più lunghi a causa delle interferenze del mezzo di coltura stesso, che tende a coprire i segnali relativi alle nanoparticelle.

3.4. Citotossicità delle nanoparticelle

Obiettivo finale del progetto Vascuplug, a cui fa riferimento questa parte del lavoro di tesi, è la rigenerazione di un tessuto complesso, mediante strategie di ingegneria tissutale. Come primo tessuto modello è stato individuato il tessuto epatico, in quanto, sebbene le cellule epatiche sono particolarmente sensibili a stimoli rigenerativi, trattasi di un tessuto complesso che necessita di un'efficiente ed estesa rete di vascolarizzazione. Studi preliminari sui nanosistemi da impiegare nella strategia di ingegnerizzazione di tali tessuti devono prevedere la completa assenza di citotossicità delle nanoparticelle sulle cellule di interesse. E' stata, pertanto, valutata la citotossicità di nanoparticelle non cariche (*Nano Bianche*), su una linea cellulare epatica (C3a) da impiegarsi nella fase successiva della ricerca.

Le cellule sono state incubate in presenza di nanoparticelle, preparate in condizioni asettiche in modo da evitare interferenze, a 37°C per 24 ore. I risultati dell'analisi, condotta sia su *subconfluent layer*, sia su *confluent layer*, sono rappresentati in figura 5. Dai grafici si osserva una vitalità cellulare pressochè del 100% in tutti i campioni analizzati, anche se in alcuni casi la vitalità cellulare dei campioni analizzati è addirittura superiore al controllo. Tale risultato è particolarmente interessante in quanto è stato dimostrato che il polossamero 188, componente fondamentale della matrice polimerica dei nanosistemi sviluppati, può stimolare la respirazione mitocondriale delle cellule (Kirillova *et al.*, 1993). Poiché la vitalità delle cellule è quantificata mediante saggio colorimetrico XTT, che valuta appunto la respirazione cellulare, è possibile ipotizzare che tale effetto sia proprio legato al polimero impiegato in miscela con il PLGA nell'allestimento di tali sistemi.

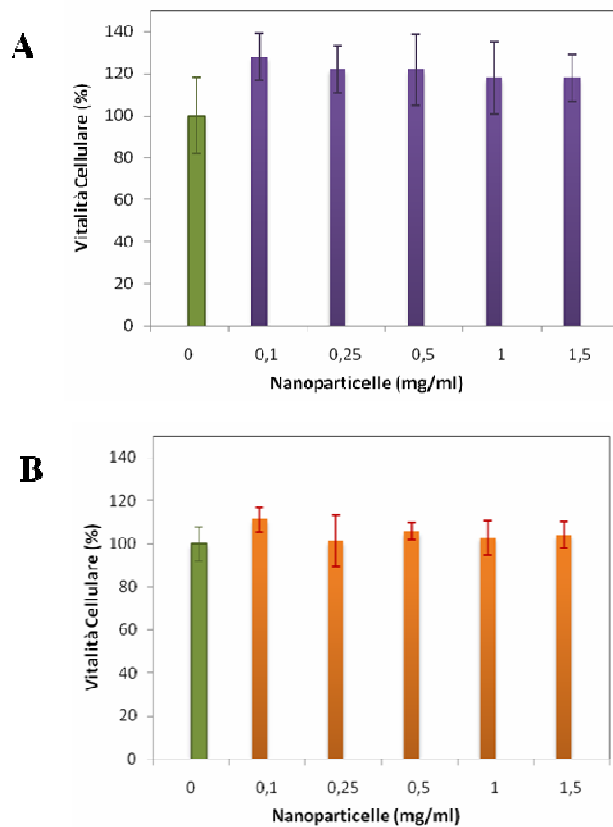


Figura 5. Vitalità delle cellule epatiche C3a in presenza di nanoparticelle a base di PLGA/Polossamero. (A): *Subconfluent layer*. (B): *Confluent layer*.

Tali risultati dimostrano che le nanoparticelle a base di *blend* di PLGA/Polossamero, non esercitando un'azione citotossica sulle cellule di natura epatica C3A e sono, pertanto, particolarmente promettenti per la rigenerazione del tessuto epatico, oggetto delle fasi successive del progetto.

3.5. Studi di Liofilizzazione delle Nanoparticelle

Le nanoparticelle in soluzione acquosa danno luogo alla formazione di sospensioni colloidali che presentano una stabilità limitata nel tempo. Nonostante le particelle a base di PLGA presentino una stabilità piuttosto elevata in sospensione rispetto ad altri nanosistemi polimerici, dopo periodi di tempo che generalmente non superano un mese, anch'esse danno origine a fenomeni di aggregazione e

perdita delle caratteristiche di colloide. Al fine di prolungare nel tempo la stabilità delle nanoparticelle in sospensione, sono stati condotti studi di liofilizzazione in presenza di crioprotettori. L'impiego di un crioprotettore è fondamentale durante il processo di congelamento e liofilizzazione per evitare fenomeni di aggregazione delle nanoparticelle.(Jeong *et al.*, 2005)

Gli studi di liofilizzazione sono stati condotti sulle formulazioni di nanoparticelle *Nano BHP* e *Nano BHF*, contenenti rispettivamente PDGF-BB e FGF-2, e sulla formulazione di controllo *Nano BH*. Le polveri liofilizzate ottenute sono state sospese in acqua ed analizzate mediante PCS per valutarne le dimensioni e l'indice di polidispersità (I.P.) dopo il processo di liofilizzazione.

I risultati ottenuti sono raffigurati in figura 6. Dagli istogrammi è possibile osservare che le dimensioni e la I.P.delle formulazioni liofilizzate aumentano lievemente rispetto alle formulazioni di controllo. Tali aumenti, però, non sono indice di un fenomeno di aggregazione, suggerendo che le formulazioni liofilizzate mantengono pressoché inalterate le caratteristiche originali. Tale effetto è attribuibile alla presenza di trealosio nella sospensione iniziale. Infatti, a temperature inferiori alla temperatura di transizione vetrosa (-80°C durante la fase di congelamento), il trealosio si organizza in nanostrutture cristalline responsabili dell'azione protettiva nei confronti delle nanoparticelle.

Va sottolineato che, tra i crioprotettori a struttura zuccherina, il trealosio risulta essere uno degli eccipienti più inerti e più utilizzati. Risulta di particolare rilievo l'alta stabilità, legata al fatto che il trealosio non si idrolizza immediatamente per dare origine a reazioni di Maillard con aminoacidi e proteine. Di conseguenza, tale zucchero permette di mantenere le caratteristiche originali dei prodotti anche dopo processi di riscaldamento, prolungata conservazione e ricostituzione. Inoltre, resiste a livelli di umidità relativa fino al 94%, pertanto i prodotti trattati con trealosio possono incrementare la loro stabilità, beneficiando della bassa igroscopicità.

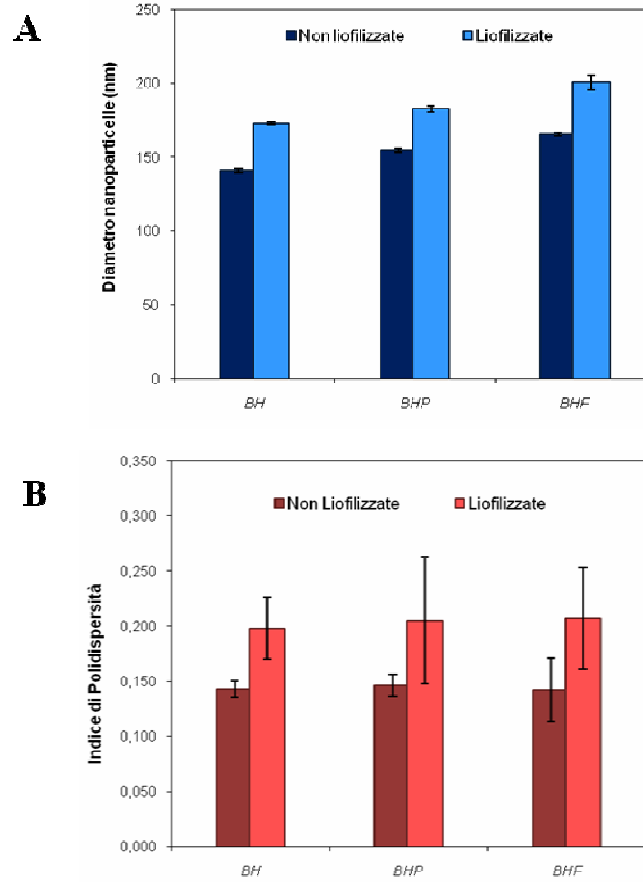


Figura 6. Variazione delle proprietà delle nanoparticelle in seguito al processo di liofilizzazione in presenza di trealosio al 5% (p/v). Analisi del diametro medio (A). Analisi dell'indice di polidispersità (B).

3. Conclusioni

Nanoparticelle a base di una miscela di PLGA e polossamero si sono dimostrate ottimi sistemi per l'incapsulazione di fattori di crescita proangiogenici, quali PDGF-BB ed FGF-2. La scelta di opportune condizioni formulative è essenziale per ottenere un'elevata efficienza d'incapsulazione del GF. In particolare, la presenza della BSA nella formulazione iniziale appare fondamentale al fine di ottenere una buona efficienza d'incapsulazione della macromolecola. Inoltre, le caratteristiche di carica superficiale delle formulazioni suggeriscono un'attiva interazione tra la Hp ed il GF di tipo elettrostatico, essenziale per il mantenimento dell'attività biologica della proteina.

Un limite associato all'impiego di nanoparticelle è da sempre la scarsa stabilità di tali sistemi in sospensione. Gli studi di liofilizzazione effettuati in presenza di trealosio come crioprotettore hanno dimostrato che le nanoparticelle a base di *blend* di PLGA/Polossamero, possono essere efficacemente liofilizzate per facilitarne l'impiego e la conservazione. Pur mantenendo inalterate le proprietà delle nanoparticelle, la polvere liofilizzata ottenuta possiede una stabilità maggiore e più duratura rispetto ad una sospensione colloidale.

Ai fini della futura applicazione in ingegneria tissutale, appaiono di fondamentale importanza la stabilità in mezzi di coltura cellulare e l'assenza di citotossicità delle nanoparticelle sviluppate. Particolarmente interessante, a tal proposito, è la capacità del polossamero di promuovere la vitalità cellulare seppur in modo non significativo.

Capitolo II

**Controllo dei livelli di VEGF in *scaffold* a base
di collagene per la neovascolarizzazione in
ingegneria tissutale:
potenzialità delle microsfere a base di PLGA**

1. Introduzione

Ogni approccio di ingegneria tissutale si basa sullo sviluppo di tessuti funzionali ed organi a partire da una specifica popolazione di cellule in un microambiente appropriatamente ricreato *in vitro* (Langer *et al.*, 1993; Mikos *et al.*, 2006). In tal senso, la matrice extracellulare (ECM), il naturale microambiente di proliferazione cellulare, può essere considerato il modello unico cui ispirarsi (Bosman *et al.*, 2003). E' noto che l'ECM svolge la duplice funzione di fornire un supporto fisico all'adesione e di interagire attivamente con le cellule tramite specifici segnali biologici. Allo stesso modo, uno *scaffold* tridimensionale per applicazioni di ingegneria tissutale che mimi la ECM deve fornire non solo un supporto materiale ma soprattutto deve attivamente stimolare e guidare le cellule alla proliferazione, al differenziamento ed alla migrazione (Langer *et al.*, 1993). Tale scopo può essere raggiunto funzionalizzando lo *scaffold* tridimensionale in modo tale da ottenere una serie di segnali biologici, capaci di innescare e sostenere specifiche risposte cellulari, in dosi ed intervalli di tempi adeguati (Hutmacher, 2001). Tra le molecole segnale della ECM, sicuramente i GF rappresentano la classe di molecole più promettente al fine di ottimizzare la rigenerazione del tessuto indotta dalle cellule (Lutolf *et al.*, 2005).

La bioattivazione dello *scaffold* può essere ottenuta sia mediante la semplice diffusione delle molecole segnale all'interno della matrice polimerica, sia mediante immobilizzazione della molecola per via elettrostatica o covalente. Entrambe le tecniche, però, presentano dei limiti intrinseci (Biondi *et al.*, 2008). Nel caso di una dispersione del GF direttamente all'interno della matrice, il successivo rilascio della macromolecola segue una cinetica dettata dalla natura del polimero che costituisce lo *scaffold* e che risulta difficile da controllare e prevedere. Dall'altro lato, le strategie di immobilizzazione devono tenere in debita considerazione la struttura e il sito d'azione del GF, al fine di immobilizzare la macromolecola senza però comprometterne l'attività (Biondi *et al.*, 2008). Inoltre, in entrambe le strategie, l'attività della macromolecola può essere seriamente compromessa durante il

processo di produzione dello *scaffold*, oltre a non essere opportunamente protetta dalla degradazione enzimatica una volta a contatto con il microambiente biologico *in vivo*. Una strategia innovativa prevede l'impiego di CRS per il controllo della concentrazione di molecole segnale all'interno di 3D-*scaffold* (Ungaro *et al.*, 2005).

Tra i CRS, le microsfeere a base di PLGA appaiono ottimi candidati per la veicolazione di GF in *scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale (Saltzman *et al.*, 2002). Le microsfeere a base di PLGA possono, infatti, proteggere la molecola incapsulata e rilasciarla ad intervalli di tempo specifici (i.e. fattori relazionati rilasciati in tempi differenti), e per lunghi periodi di tempo, durante lo sviluppo del tessuto. Inoltre, il microposizionamento orientato nello spazio possibile delle particelle all'interno dello *scaffold* può rendere possibile il controllo della crescita del tessuto sia nell'estensione, che nella organizzazione.

La presenza di gradienti spazio-temporali dei segnali molecolari è particolarmente importante nella neoangiogenesi del tessuto e, quindi, quando si vogliono rilasciare nello *scaffold* molecole proangiogeniche, quali il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF).

Il VEGF, infatti, è un segnale molecolare che stimola la proliferazione delle cellule endoteliali, induce l'angiogenesi e svolge, pertanto, un ruolo fondamentale nella regolazione della vascolarizzazione di organi e tessuti (Ferrara, 1999). Da un punto di vista strutturale, il VEGF è una glicoproteina esistente in differenti isoforme di VEGF ottenute dallo stesso gene per *splicing* alternativi del RNA messaggero e definite, sulla base della lunghezza della catena aminoacidica, come VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ (Keck *et al.*, 1997).

Solo le forme con peso molecolare più elevato, costituite da 165, 189 e 206 residui amminoacidici presentano il dominio carbossi-terminale di 55 amminoacidi che lega l'eparina e media l'affinità del GF per la proteina plasmatica. Sul dominio ammino-terminale, costituito da 110 amminoacidi, è localizzato il sito di interazione con i recettori ad attività tirosino-chinasica. In particolare è stato recentemente osservato che la forma biologicamente attiva è rappresentata dall'omodimero covalente del VEGF₁₆₅, formato da due monomeri ciascuno costituito da 165 residui

amminoacidici, dal peso molecolare di circa 45 KDa (figura 1) (Goolcharran *et al.*, 1999).

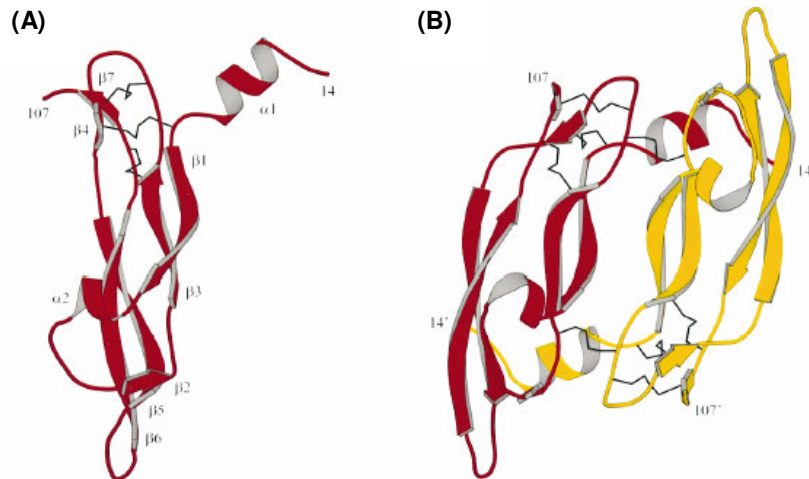


Figura 1. Struttura molecolare del VEGF₁₆₅: (A) la forma monomerica; (B) l'omodimero covalente.

Il ruolo fondamentale svolto dal VEGF nella regolazione dell'angiogenesi, ha fatto crescere notevolmente l'interesse per la molecola quale strumento terapeutico. Per la ricrescita e la sopravvivenza di quasi tutti i tessuti, infatti, è particolarmente critica la fase della vascolarizzazione nella zona adiacente ed interna del neo-tessuto in crescita, essenziale per assicurarne il funzionamento. Nella crescita e proliferazione delle cellule tumorali, in particolare, è indispensabile la presenza di un nuovo supporto vascolare così come nella formazione di metastasi (Ferrara, 1999). La comprensione dei meccanismi che regolano la formazione dei vasi sanguigni, inoltre, è sostanziale anche nell'ottica dell'ingegnerizzazione dei tessuti. Il VEGF, pur funzionando da potente agente proangiogenico *in vivo*, degrada molto velocemente se somministrato direttamente nel sistema circolatorio. La garanzia della stabilità chimica e fisica dell'omodimero è, dunque, essenziale ai fini del mantenimento attività biologica e terapeutica.

Oggetto di questa ricerca è stato lo sviluppo di uno *scaffold* polimerico tridimensionale bioattivato con microparticelle a base di PLGA contenenti VEGF, un potente fattore di crescita proangiogenico, allo scopo di ottenere una matrice capace di stimolare e guidare la formazione di nuovi vasi sanguigni per applicazioni di ingegnerizzazione di tessuti complessi. L'attività del VEGF rilasciato dalle microparticelle è stata valutata mediante saggi *in vitro* su cellule endoteliali HUVEC. *Scaffold* a base di collagene attivati con microsferi contenenti VEGF sono stati testati su membrana corioallantoidea (CAM) di uova di pollo, per valutare l'abilità del sistema ad indurre la formazione di nuovi vasi sanguigni.

2. Materiali e Metodi

2.1 Materiali

Il PLGA (50:50) (Resomer® RG 504 H uncapped, peso molcolare 50 kDa, viscosità 0,5 dl/g) è stato acquistato presso Boehringer Ingelheim (Germania). Il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) ricombinante umano ed il kit ELISA per la determinazione quantitativa del GF sono stati forniti da R&D Systems (USA). Una stock solution di VEGF (10 µg/ml) è stata preparata in condizioni sterili impiegando tampone fosfato (PBS) 1 M, acquistato presso Euroclone, contenente albumina da siero bovino (BSA) all'1% w/v. Il mezzo di coltura cellulare Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), Human Endothelial-SFM Basal Growth Medium, Heat-inactivated Fetal Bovine Serum (HI-FBS), la penicillina G sodica e la streptomina solfato sono state fornite da Gibco (USA). È stato impiegato il collagene di tipo I (Vitrogen®; 3.0 mg/ml; pH 2), acquistato presso Nutacon (Olanda). La BSA coniugata con trimetilrodamina (BSA-Rhod) è stata acquistata presso Molecular Probes Europe BV (The Netherlands), mentre BSA, eparina porcina sale sodico (Hp), eparina coniugata con cumarina (Hp-Cum), il fattore di crescita delle cellule endoteliali (EGF), alcool polivinilico (PVA, Mowiol® 40-88), carbossimetilcellulosa, potassio fosfato monobasico, potassio fosfato bibasico, cloruro di sodio e cloruro di potassio sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (USA). I solventi impiegati, diclorometano ed acido cloridrico, sono di grado analitico e sono stati forniti da Carlo Erba (Italia). L'acqua impiegata negli esperimenti è stata filtrata mediante filtri 0,22 µm (Millipore, USA).

2.2 Microsfere a base di PLGA contenenti VEGF

2.2.1. Preparazione delle Microsfere

Le microsfere a base di PLGA contenenti VEGF sono state preparate mediante la tecnica di emulsione multipla/evaporazione del solvente (A/O/A) ad un'incapsulazione teorica del fattore di crescita di 0,01% (0,01 mg di VEGF per

100 mg di microparticelle). Il VEGF è stato incapsulato in associazione ad agenti stabilizzanti: l'albumina da siero bovino (BSA) ed eparina sale sodico (Hp).

Una soluzione sterile in PBS a pH 7,4, contenente VEGF, Hp e BSA (ratio VEGF/ Hp/BSA 1:1:70 w/w/w) (100 µl), è stata emulsionata mediante omogeneizzazione a 15000 rpm per 2 minuti (Dix 900, sonda 6 G, Heidolph, Germania), in 1 ml di una soluzione di PLGA in diclorometano (10 % w/v). L'emulsione così ottenuta è stata addizionata alla fase esterna costituita da 10 ml di una soluzione acquosa di PVA (0,5 % w/v) (Mowiol® 40-88), ed emulsionata mediante omogeneizzazione a 8000 rpm per 1 minuto (sonda 10F). La doppia emulsione è stata mantenuta sotto agitazione elettromagnetica (MR 3001K, Heidolph, Germania), a temperatura ambiente, al fine di favorire l'evaporazione del solvente organico e la precipitazione del polimero in forma di microparticelle. Dopo tre ore, le microparticelle sono state isolate e lavate con 10 ml di acqua filtrata 3 volte, mediante centrifugazione a 4500 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente (Universal 16R, Hettich Zentrifugen, Germania), e successivamente sottoposte ad un ciclo di liofilizzazione di 24 ore (0,001 atm, -60°C). (Modulo, Edwards, Gran Bretagna).

Microsfere fluorescenti contenente il VEGF, la BSA-Rhod e Hp-Cum. Microsfere contenenti solo gli agenti stabilizzanti BSA ed Hp sono state preparate come controllo.

2.2.2. Morfologia e dimensioni delle Microsfere

a) Osservazione al microscopio a scansione elettronica

Le microsfere sono state analizzate dopo liofilizzazione mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) (Leica S440, Germania). Per l'analisi il campione è stato posto su di un supporto metallico e rivestito sotto vuoto con sali d'oro.

b) Analisi granulometrica

Il diametro medio e la distribuzione dimensionale delle particelle è stata determinata utilizzando un granulometro laser (Coulter LS 100Q USA) a partire da microsfere liofilizzate previamente sospese in una soluzione acquosa di PVA allo 0,5% (p/v). Per ciascuna formulazione il diametro medio delle particelle è stato espresso in $\mu\text{m} \pm$ la deviazione standard (D.S.) della misura effettuata su tre differenti lotti di microsfere.

c) Osservazione al microscopio confocale

La distribuzione della BSA-Rhod e della Hp-Cum all'interno delle microsfere è stata valutata mediante analisi al microscopio confocale (CLSM) (LSM 510 Zeiss), con lente Zeiss 20X/3 NA (Carl Zeiss, Germany). L'analisi è stata condotta su microsfere disperse in uno *scaffold* di collagene, impiegando un laser ad argon (λ_{ex} 543 nm/ λ_{em} 572 nm per BSA-Rhod; λ_{ex} 488 nm/ λ_{em} 525 nm per Hp-Cum)

2.2.3. Analisi quantitativa del VEGF

Il VEGF incapsulato e rilasciato dalle microsfere è stato quantificato mediante saggio immunoenzimatico specifico ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), secondo la procedura consigliata dal produttore (Quantikine® Kit, R&D Systems, USA). La soluzione standard di VEGF o il campione da analizzare a concentrazione ignota opportunamente diluito (200 μl) e 50 μl di buffer di diluizione fornito dal produttore (RD1W) sono stati addizionati ad ogni pozzetto della piastra multiwell ricoperte con un anticorpo monoclonale specifico del VEGF. La piastra caricata è stata incubata per 3 ore a temperatura ambiente e successivamente lavata 3 volte con una soluzione di lavaggio (*Wash Buffer*). In seguito al lavaggio, si procede con l'aggiunta dell'anticorpo policlonale specifico del VEGF coniugato all'enzima perossidasi. La placca è mantenuta in incubazione a temperatura ambiente per 2 ore e successivamente, dopo tre lavaggi, ad ogni pozzetto da analizzare si addiziona la soluzione substrato composta da perossido di idrogeno e cromo-tetrametilbenzidina

(ratio 1:1). Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente e successivo lavaggio, la reazione colorimetrica viene bloccata con 50 µl di una soluzione di acido sulfurico 2 N. L'assorbanza ottica è stata misurata mediante spettrofotometro per piastre multiwell (Wallac 1420 VICTOR 3, PelkinElmer) alla lunghezza d'onda $\lambda=450\text{nm}$.

2.2.4. Efficienza d'incapsulazione delle Microparticelle

La quantità di VEGF incapsulata all'interno delle microsfele è stata determinata mediante degradazione della matrice polimerica per idrolisi basica, in una soluzione di idrossido di sodio. Un mg di microsfele è stato sospeso in 1 ml di NaOH 0,05 N e mantenuto a temperatura ambiente per circa 24 ore. Le soluzioni ottenute sono state centrifugate a 4500 rpm per 15 minuti a 4°C, ed il supernatante analizzato per il contenuto di VEGF mediante ELISA, come precedentemente descritto. I risultati sono stati espressi come incapsulazione reale percentuale o *actual loading* (mg VEGF incapsulato per mg di microsfele) ed efficienza di incapsulazione (mg reali VEGF incapsulati/mg VEGF teorici X 100) \pm la deviazione standard (D.S.) della misura effettuata su tre differenti lotti.

2.2.5. Cinetiche di Rilascio in vitro

Gli studi di rilascio *in vitro* del VEGF sono stati realizzati sospendendo 10 mg di microparticelle liofilizzate in 1 ml di PBS pH 7,4, precedentemente filtrato mediante filtri da pori di 0,22 µm di diametro (Millex®, Millipore, USA). I campioni sono stati incubati in bagno termostato a 37°C, in condizioni statiche per mimare le condizioni di rilascio delle microsfele disperse in uno *scaffold* di collagene. Ad intervalli regolari di tempo, i campioni sono stati centrifugati a 4500 rcf per 15 minuti a 4°C e il mezzo di rilascio prelevato e sostituito con lo stesso volume di PBS pH 7,4 fresco. I campioni prelevati sono stati analizzati mediante ELISA, come descritto precedentemente, per determinare la quantità di fattore di crescita rilasciato. I risultati sono stati espressi come ng di VEGF rilasciato per mg

di microparticelle \pm la deviazione standard (D.S.) della misura effettuata su tre differenti lotti.

2.2.6. Bioattività del VEGF incapsulato

Le cellule HUVEC sono state precedentemente preparate e caratterizzate, come descritto in letteratura (Bussolino *et al.*, 1989), in Human Endothelial-SFM Basal Growth Medium in presenza di HI-FBS, fattore di crescita delle cellule endoteliali (EGF) (100 $\mu\text{g/ml}$), Hp (100 $\mu\text{g/ml}$), penicillina sodica e streptomicina solfato (rispettivamente 10.000 U/mL penicillin e 10.000 $\mu\text{g/mL}$ di streptomicina) (Borselli *et al.*, 2008).

Per il saggio di attività proangiogenica del VEGF su matrigel è stata impiegata una piastra da 24 pozzetti. Sono stati addizionati ad ogni pozzetto 230 μl di Matrigel (13 mg/ml) (R&D Systems), la piastra è stata incubata per 30 minuti a 37°C al fine di ottenere la formazione di un gel. Successivamente, le cellule HUVEC sono state stratificate sul gel di Matrigel ad una concentrazione di 8×10^4 cellule/ml di mezzo privo di siero, in presenza di microsfere contenenti VEGF (mg corrispondenti a 20 ng/ml di VEGF rilasciato dopo 6 ore) o del fattore di crescita libero (20 ng/ml). Le cellule, infine, sono state poi incubate a 37°C per favorire l'adesione allo strato di gel. Dopo 6 ore di incubazione, è possibile osservare la formazione di capillari a struttura tubulare mediante microscopio a fase inversa. Le cellule infine sono state fissate con PBS contenente glutaraldeide allo 0,2% (v/v), paraformaldeide 1% (w/v), fotografate e le estensioni analizzate mediante il software Scion Image.

2.3. Attività angiogenica delle microsfere contenenti VEGF *in vitro/in vivo*

2.3.1. Sprouting angiogenesis assay

L'attività angiogenica delle microsfere contenenti VEGF è stata valutata su aggregati di cellule endoteliali HUVEC, noti come sferoidi (Perets *et al.*, 2003) Un monostrato confluyente di cellule HUVEC è stato tripsinizzato e tali cellule (circa 800

per sferoide) sono state sospese in mezzo di coltura cellulare contenente carbossimetilcellulosa allo 0,25% (w/v) e caricate su una piastra da 96 pozzetti a fondo curvo antiaderente (Greiner, Frickenhausen, Germania). Dopo 24 ore d'incubazione a 37°C, 5% di CO₂ e 100% di umidità relativa, gli sferoidi sono stati prelevati, centrifugati per 30 minuti a 800 rpm ed addizionati ad una soluzione di collagene di tipo I (1,2 mg/ ml) in pepsina a pH 7,4. La sospensione ottenuta è stata incubata a 37°C per 1 ora per favorire la formazione di fibrille, e quindi la gelificazione dello *scaffold* a base di collagene. Uno strato di gel di collagene privo di cellule è stato precedentemente stratificato al fine di evitare l'adesione degli sferoidi al fondo della placca. In totale sono stati inglobati nei gel circa 12 sferoidi. Successivamente è stato addizionato ai gel mezzo di coltura cellulare privo di siero, contenente VEGF libero (40 ng/ml) o microsfele contenenti VEGF (pari a 40 ng di VEGF totali). I gel così ottenuti sono stati, infine, incubati a 37°C, 5% di CO₂ e 100% di umidità relativa.

L'angiogenesi *in vitro* è stata osservata dopo 24 e 48 ore mediante microscopio inverso (IX50 Olympus). L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante una misura semiautomatica della somma delle lunghezze di tutti le formazioni tubulari (*sprouts*) originati dal piano centrale di ogni singolo sferoide, utilizzando un software per l'analisi di immagini MetaMorph collegato al microscopio utilizzato. L'analisi statistica della significatività è stata condotta con test ANOVA, per cui valori minori ed uguali di 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

2.3.2. Saggio su membrana corioallantoidea (CAM)

Sistemi integrati *scaffold* a base di collagene/microsfele a base di PLGA contenenti il VEGF, sono stati preparati secondo una procedura precedentemente descritta (Ungaro *et al.*, 2006). Brevemente, i gel sono stati ottenuti diluendo il collagene ad una concentrazione di 1,2 mg/ml con DMEM ed aggiustando il pH a 7,4. Le microsfele sono state disperse in modo omogeneo nella dispersione colloidale di collagene. La dispersione è stata incubata a 37°C per circa 45 minuti,

per indurre la fibrillazione del collagene e la formazione del gel. *Scaffold* a base collagene in assenza di microparticelle Sono stati preparati come controllo.

Il saggio su membrana corioallantoidea (CAM) è stato condotto su uova di pollo, precedentemente incubate a 37°C a livelli di umidità controllati. Dopo 4 giorni di incubazione, viene aperta una finestra nel guscio dell'uovo e, dopo aver rimosso 3-4 ml di albume, la membrana corioallantoidea separata dal guscio. La finestra viene chiusa con una pellicola adesiva e l'uovo incubato nuovamente a 37°C. Al nono giorno di incubazione, sono stati impiantati sulla CAM *scaffold* a base di collagene attivati con VEGF libero (40 ng/ml), o microsfele a base di PLGA caricate con VEGF, (una concentrazione di microparticelle tale da ottenere una quantità totale di VEGF pari a 40 ng/ml). Sono stati impiantati anche *scaffold* privi di microsfele e contenenti microsfele di controllo, caricate con BSA ed Hp. Le uova impiantate sono state incubate a 37°C ed analizzate giornalmente. Al dodicesimo giorno di incubazione le CAM sono state esaminate mediante stereomicroscopio (Olympus SZX9), fotografate con una fotocamera digitale (Olimpus) senza essere state asportate dall'uovo, ed il numero di vasi formati sulla CAM sono stati contati.

3. Risultati e Discussione

3.1. Proprietà delle microparticelle a base di PLGA contenenti VEGF

Microparticelle a base di PLGA contenenti VEGF sono state preparate mediante la tecnica di emulsione multipla/evaporazione del solvente (A/O/A), ampiamente impiegata per la microincapsulazione di proteine e fattori di crescita (Ungaro *et al.*, 2005). Un fattore cruciale da tenere in considerazione, è la necessità di non alterare la forma nativa la macromolecola, e quindi conservarne la bioattività, durante il processo di preparazione delle microparticelle ed in seguito al rilascio. A tal fine, il VEGF è stato incapsulato in associazione con due agenti stabilizzanti: albumina da siero bovino (BSA) ed eparina sale sodico (Hp). La BSA per le sue proprietà anfifiliche preserva il GF dall'aggregazione all'interfaccia acqua/olio durante il processo di emulsione (*sacrificial lamb approach*) (Ungaro *et al.*, 2005), mentre la Hp, interagendo con lo specifico dominio di legame presente sui fattori di crescita (*Hp binding domain*), stabilizza la struttura nativa della macromolecola e favorisce la sua interazione con recettori specifici localizzati sulle membrane cellulari (De Rosa *et al.*, 2008). Le condizioni formulative delle particelle sono state ottimizzate al fine di ottenere particelle dal diametro di $21.5 \pm 1.2 \mu\text{m}$. In tal modo le microparticelle presentano un diametro superiore al diametro delle maglie dello *scaffold*, e possano ritenersi fisse all'interno della matrice polimerica.

Le particelle preparate incapsulando BSA e Hp marcate con sonde fluorescenti, rispettivamente BSA marcata con rodamina (BSA-Rhod) e Hp marcata con cumarina (Hp-Cum), sono state analizzate al microscopio confocale (CLSM), in modo da osservare la distribuzione delle molecole all'interno delle microparticelle. L'analisi al CLSM dello scaffold a base di collagene integrato con microsferiche caricate con BSA-Rhod e Hp-Cum mostra che non c'è segnale di fluorescenza nell'intorno delle microparticelle (figura 2). In figura 2 si può osservare che la BSA-Rhod (segnale in rosso) è distribuita prevalentemente sulla superficie dei

macropori interni alla matrice polimerica (figura 2 A), mentre la Hp-Cum (segnale in verde) è prevalentemente localizzata all'interno di tali cavità (figura 2 B).

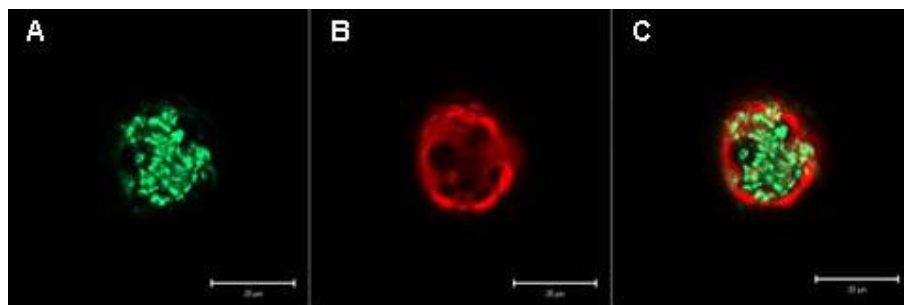


Figura 2. Immagini di microscopia confocale delle microparticelle a base di PLGA contenenti VEGF e le molecole fluorescenti BSA-Rhod ed Hp-Cum inglobate in *scaffold* a base di collagene. A) Canale verde (Hp-Cum); B) Canale rosso (BSA-Rhod); C) Sovrapposizione delle due immagini precedenti, rappresentativa della formulazione

La distribuzione della BSA all'interno della microparticella supporta l'ipotesi che la BSA effettivamente impedisce al VEGF di localizzarsi all'interfaccia, mentre, tenendo in considerazione la forte e specifica interazione tra il VEGF e la Hp (Ono *et al.*, 1999), è ragionevole assumere che il VEGF è localizzato prevalentemente all'interno dei micropori, così come la Hp-Cum.

Le condizioni formulative adottate hanno permesso di ottenere microparticelle capaci di incapsulare VEGF con un'efficienza di incapsulazione di circa il 70% ($71.6\% \pm 10.6$ ng di VEGF per mg di microsferi) (Borselli *et al.*, 2008). Il profilo di rilascio del VEGF dalle microparticelle è riportato in figura 2, espresso come ng di VEGF in forma attiva rilasciato per 1 mg di microsferi in funzione del tempo. Come è possibile osservare dalla figura, le microparticelle mostrano un rilascio iniziale di VEGF, nel primo giorno d'incubazione, piuttosto lento (< 10 ng/mg), seguito da un rilascio controllato di VEGF sostenuto per oltre 80 giorni. In particolare, le particelle sono in grado di garantire un rilascio costante di VEGF di circa 0,6 ng/mg giornalieri per diverse settimane (figura 3).

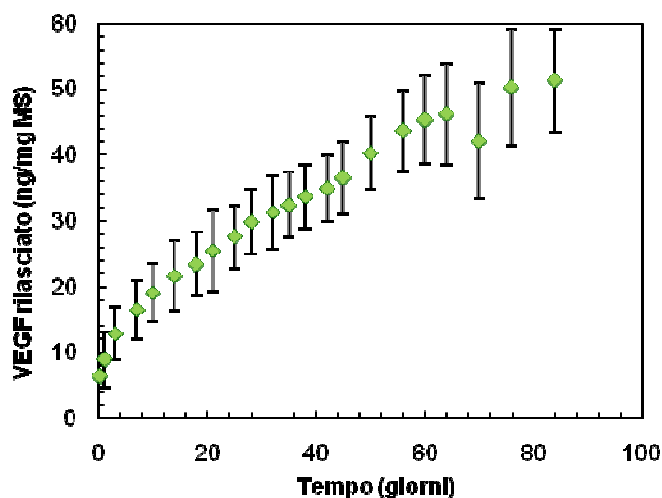


Figura 3: Profilo di rilascio del VEGF da microsfele a base di PLGA in PBS pH 7,4 a 37°C. I risultati sono stati espressi come ng di VEGF rilasciati per 1 mg di microparticelle, media \pm D.S. di tre replicati

I risultati suggeriscono che le microparticelle a base di PLGA sviluppate presentano ottime potenzialità per la funzionalizzazione di supporti tridimensionali attivi per la neovascolarizzazione di tessuti ingegnerizzati, che richiedono un accurato controllo di piccole concentrazioni di GFs (da nanomolari a picomolari) all'interno dello *scaffold* (Yancopoulos *et al.*, 2000).

3.2 Bioattività del VEGF incapsulato

Come evidenziato in precedenza, uno dei requisiti fondamentali di un sistema di veicolazione per GFs è che esso assicuri il mantenimento dell'attività biologica della macromolecola durante la fase di microincapsulazione (Van de Weert *et al.*, 2000). La bioattività del VEGF in seguito al rilascio da microparticelle è stata valutata *in vitro* mediante un saggio su cellule endoteliali tra i più utilizzati nella determinazione dell'efficacia proangiogenica, valutando la capacità del GF rilasciato di stimolare le cellule alla formazione di strutture tridimensionali tubulari (capillari) (Borselli *et al.*, 2008).

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che le microsfere a base di PLGA non manifestano citotossicità su cellule HUVEC. Tali esperimenti sono stati condotti incubando cellule in presenza ed assenza di microparticelle (risultati non rappresentati). Le cellule HUVEC sono state, quindi, stratificate in Matrigel® e la risposta angiogenica è stata quantificata in funzione della lunghezza e della estensione della rete capillare formatasi dopo 6 ore di incubazione in mezzo di coltura cellulare privo di agenti proangiogenici (figura 4 A), contenente VEGF solubile (figura 4 B) o microsfere caricate con VEGF (figura 4 C). Il grafico in figura 4 D, mostra che il numero di strutture capillari formate in presenza di microparticelle contenenti VEGF è pari a quello ottenuto in presenza della stessa quantità di VEGF libero.

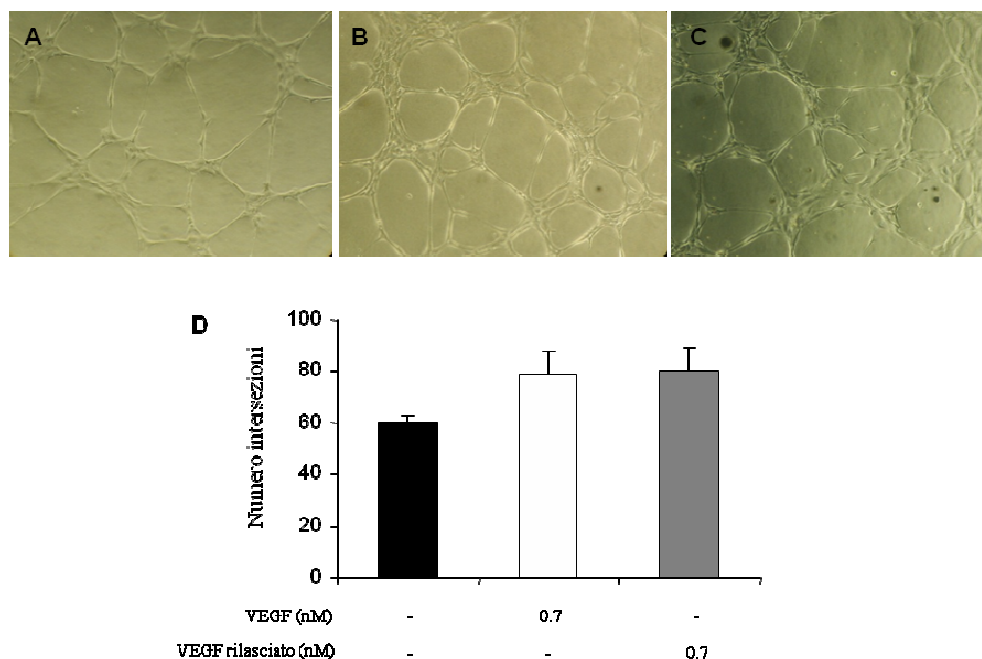


Figure 4: Saggio in vitro su Matrigel. Le immagini (A, B, C) rappresentano la rete vascolare formatasi all'interno degli *scaffold* dopo le 6 ore di incubazione: A) in assenza di VEGF, B) con VEGF libero (20ng/ml), C) con microsfere contenenti VEGF. Nel grafico (D) è rappresentato il numero di intersezioni formatesi (\pm D.S.)

Nella tecnica di preparazione adottata la generazione di forze di taglio, può risultare in una perdita dell'integrità della proteina. Inoltre, la formazione di un'interfaccia acqua/olio durante la fase di emulsione, può aumentare la mobilità della proteina, favorendo fenomeni di aggregazione ed interazioni tra polimero/proteina (Van de Weert *et al.*, 2000; De Rosa *et al.*, 2008). I risultati ottenuti, però, dimostrano che le condizioni formulative adottate (i.e. l'incapsulazione di agenti stabilizzanti: BSA ed Hp), permettono di preservare la bioattività del VEGF durante il processo di microincapsulazione.

3.3. Attività angiogenica delle microsfele contenenti VEGF

La validità a lungo termine di uno *scaffold* tridimensionale dipende dalla capacità di fornire un'adeguata vascolarizzazione in seguito all'impianto. A tale proposito, il ruolo del VEGF risulta essenziale non solo per stimolare le cellule endoteliali alla formazione di una rete vascolare, ma anche nell'azione stabilizzante sui nuovi vasi formati (Ferrara *et al.*, 2003). Pertanto, è stata valutata *in vitro* l'attività delle microsfele contenenti VEGF su un modello angiogenico di sferoidi inglobati in una matrice tridimensionale a base di collagene che riproduce fedelmente il microambiente e l'architettura della ECM *in vivo* (Ucuzian *et al.*, 2007)

In figura 4 sono rappresentate le immagini degli sferoidi a base di cellule HUVEC dopo 24 ore di incubazione in matrice a base di collagene, in assenza di fattori proangiogenici (controllo), in presenza di VEGF libero o di microsfele a base di PLGA contenenti il VEGF. Mentre nel controllo (figura 5 A) la formazione di strutture tubulari (*sprouting*) è totalmente assente, sia in presenza di VEGF libero (figura 5 B) che in presenza di microsfele contenenti il GF (figura 5 C), gli sferoidi danno la formazione di *sprouting* e si osserva la formazione di un'anello di strutture capillari che invadono la matrice di collagene circostante (figura 5 D)

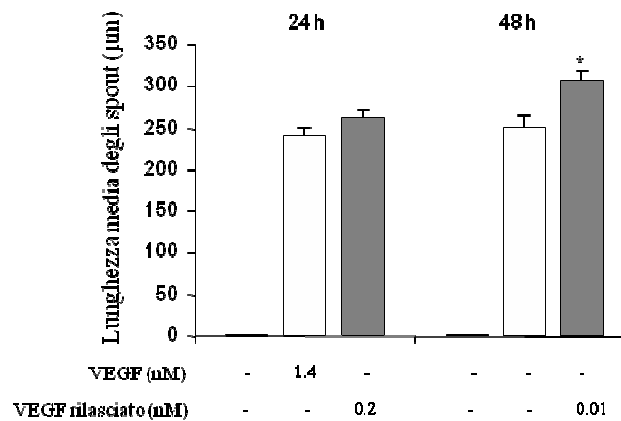
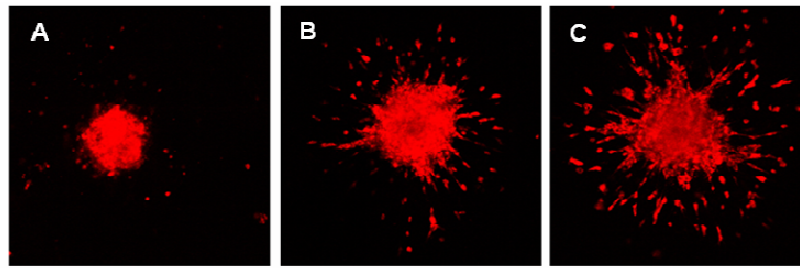


Figura 5. Attività angiogenica di microsferi contenenti VEGF su sferoidi HUVEC. Nelle immagini (A-C) sono rappresentate le analisi, effettuate mediante microscopio confocale, della crescita delle cellule dopo 24 ore d'incubazione in *scaffold* A) privi di agente proangiogenico, B) con VEGF libero (40 ng/ml) e con microsferi contenenti VEGF (quantità totale corrispondente a 40 ng/ml). In grafico (D) sono rappresentate le lunghezze medie degli *sprouts* ($\mu\text{m} \pm \text{D.S.}$) originati dopo 24 e 48 ore d'incubazione.

Nelle prime 24 ore di incubazione non si osserva una differenza significativa tra l'azione del VEGF libero e il VEGF rilasciato dalle microparticelle. In entrambe le matrici, la lunghezza media degli *sprouts* è approssimativamente di 250 μm , in particolare 240 μm e 250 μm rispettivamente in matrice contenente VEGF libero e contenente microsferi cariche. Dagli studi sulla cinetica di rilascio *in vitro* del VEGF dalle microparticelle di PLGA, è noto che le particelle rendono disponibile, nelle prime 24 ore di incubazione, una quantità di GF pari a 8.8 ± 4.2 ng per 1 mg di microsferi. L'attività proangiogenica delle microparticelle risulta, tuttavia,

paragonabile all'attività del VEGF libero, nonostante la concentrazione di VEGF libero nella matrice sia di circa 1,4 nM mentre la concentrazione di VEGF rilasciato dalle microsfele, e quindi disponibile, nelle prime 24 ore è notevolmente inferiore (solo 0,2 nM). Inoltre, nelle 24 ore successive, si osserva un notevole aumento della lunghezza degli *sprouts* nella matrice bioattivata con microsfele contenenti VEGF (che rendono disponibili 0,6 ng di VEGF/mg di microsfele per giorno), significativamente superiore a quello osservato in matrici bioattivate con VEGF libero. In particolare, mentre la lunghezza degli sprout in matrici contenenti VEGF solubilizzato rimane di 250 μm , gli sprout sviluppati in matrice funzionalizzata con microsfele raggiungono 300 μm di lunghezza (*P < 0.05).

Questi risultati dimostrano chiaramente che la semplice dispersione di VEGF nella matrice polimerica non permette di ottenere stimoli proangiogenici prolungati e stabili nel tempo, così come, invece, è possibile impiegando microsfele a base di PLGA contenenti VEGF. Il sistema microparticellare permette di controllare il rilascio del GF mantenendo inalterata la bioattività, rendendo possibile un'azione proangiogenica migliore di quella ottenuta impiegando *scaffold* funzionalizzati con VEGF libero. Tale strategia si presenta come un approccio molto interessante al fine di controllare i livelli di VEGF o altri fattori proangiogenici in *scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale.

3.4. Attività angiogenica di *scaffold* a base di collagene attivati con microsfele contenenti VEGF su CAM

Alla luce dei promettenti risultati ottenuti in vitro, la potenziale attività proangiogenica di *scaffold* a base di collagene funzionalizzati con microsfele a base di PLGA contenenti VEGF, è stata studiata mediante saggio su membrana corioallantoidea (CAM).

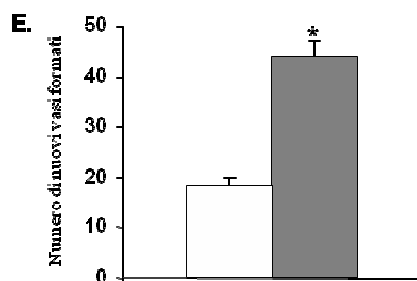
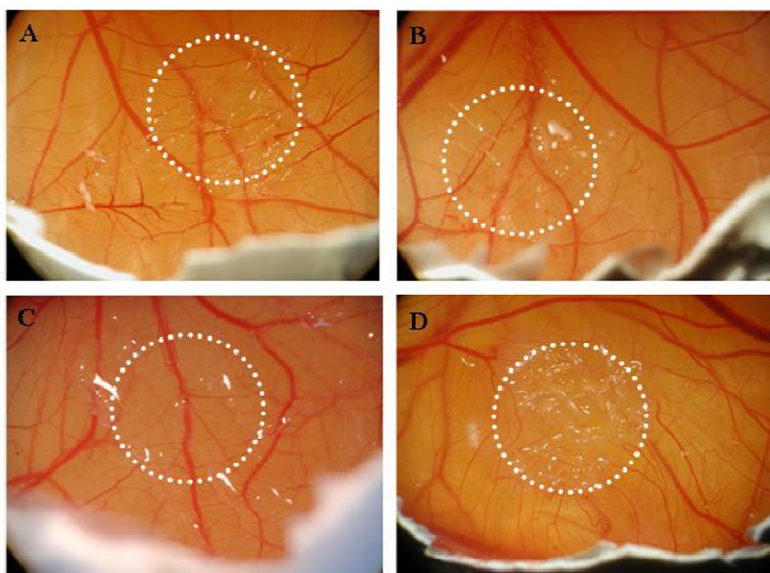


Figura 6. Attività angiogenica di scaffold a base di collagene attivati con microsferine contenenti VEGF su CAM. Le immagini (A-C) rappresentano la CAM, all'interno dell'uovo, in presenza di *scaffold* a base di collagene: A) non bioattivati, B) con microsferine a base di PLGA bianche, C) bioattivate con VEGF libero, D) bioattivate con microsferine a base di PLGA caricate con VEGF. Le immagini sono rappresentative di 3 esperimenti. In figura E è rappresentato il numero di nuovi vasi sanguigni formati (\pm D.S.) in presenza di scaffold bioattivati con VEGF libero (colonna bianca) o con microsferine contenenti VEGF (colonna grigia) (* $P < 0.05$).

Come si può osservare dai risultati presentati in figura 6, dopo 72 ore di incubazione della CAM in presenza di *scaffold* non bioattivato (figura 6 A) e *scaffold* contenente microsferine non cariche (figura 6 B) non sono osservabili effetti

proangiogenici. Un incremento della vascolarizzazione è, invece, rilevato in campioni incubati con gli *scaffold* bioattivati con microsfele contenenti VEGF (figura 6 D) o VEGF libero. (figura 6 C). L'analisi quantitativa rileva, tuttavia, che l'azione proangiogenica dello *scaffold* bioattivato con microsfele contenenti VEGF è 2,5 volte superiore all'attività mostrata dallo *scaffold* funzionalizzato con VEGF libero (*P < 0.05) (figura 6 E).

La realizzazione nello *scaffold* di gradienti di VEGF nel tempo e nello spazio è essenziale nel controllo e nella guida della neovascolarizzazione del nuovo tessuto, in quanto esercitano un'attrazione sulle cellule endoteliali, che migrano attraverso l'interfaccia *scaffold*-tessuto (Fischbach *et al.*, 2007). A causa della scarsa emivita della macromolecola (< 90 min), i gradienti di VEGF risulteranno in un'efficace azione proangiogenica solo in caso di rilascio costante e continuo, tale da contrastare e bilanciare la degradazione dello *scaffold*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'impiego di sistemi particellari capaci di rilasciare VEGF all'interno di uno *scaffold* tridimensionale determina una più efficiente e duratura neovascolarizzazione del tessuto, rispetto a sistemi che prevedono la semplice diffusione del GF. Inoltre, il mancato controllo delle dosi di VEGF può risultare nella formazione di strutture tubulari non stabili e non funzionali (Banfi *et al.*, 2005). Mantenendo controllate le concentrazioni di VEGF nel tempo, e garantendo una distribuzione omogenea all'interno dello *scaffold*, è possibile considerare l'angiogenesi terapeutica, mentre dosi eccessive di VEGF, non opportunamente controllate, possono favorire aberranti fenomeni angiogenici. Quindi, nel caso di *scaffold* di collagene attivati con VEGF libero, i risultati a lungo termine potrebbero risultare anche in una neovascolarizzazione non funzionale. Infine, è importante sottolineare che il controllo delle concentrazioni di GFs proangiogenici può limitare gli effetti indesiderati, come vascolarizzazioni in tessuti non target, che si possono verificare in caso di rilascio incontrollato delle molecole segnale.

4. Conclusioni

Scaffold tridimensionali per applicazioni di ingegneria tissutale, che mimino le proprietà biologiche, necessitano del controllo sulla concentrazione delle molecole segnale, al fine di garantire gradienti funzionali sia nel tempo che nello spazio. Tale obiettivo può essere raggiunto mediante lo sviluppo di un sistema particellare capace di controllare i livelli di GF e mantenere le concentrazioni della macromolecola all'interno dello *scaffold* a livelli pico/nanomolari. Le microsfeere a base di PLGA contenenti VEGF sono state sviluppate al fine di ottenere un controllo della concentrazione del GF costante nel tempo mediante dosi giornaliere di circa 0,6 ng/ml, al fine di ottenere uno stimolo proangiogenico efficiente. Tenendo in considerazione che dosi di fattori proangiogenici eccessive o non controllate possono risultare nella formazione di vasi sanguigni non funzionali, un importante risultato di questo studio è che sistemi particellari per il rilascio controllato di VEGF forniscono un lento e duraturo rilascio del principio attivo, permettendo di ottenere una risposta cellulare migliore rispetto al VEGF semplicemente disperso ed in concentrazioni maggiori. Tale approccio potrà essere applicato ed esteso al rilascio, anche contemporaneo, di differenti molecole terapeutiche, anche contemporaneamente, in modo da esporre le cellule all'azione di diversi stimoli. Le prospettive di questo lavoro prevedono il posizionamento dei microsistemi contenenti differenti molecole segnale all'interno di *scaffold* a base di collagene, al fine di ricreare i gradienti spazio-temporali, esistenti in ECM, ed ottimizzare il processo di neovascolarizzazione di tessuti ingegnerizzati.

Capitolo III

Micro e nanoparticelle a base di PLGA/Polossamero per il rilascio controllato del Poliaminoacido JS-2892b

1.Introduzione

Come ampiamente descritto nei capitoli precedenti, il più importante limite allo sviluppo di formulazioni contenenti GFs per applicazioni terapeutiche, ed in particolare in ingegneria tissutale, è rappresentato dalla loro elevata instabilità chimico-fisica ed enzimatica, che li rende soggetti a rapida degradazione una volta a contatto con i fluidi biologici. Pertanto, va sottolineato che lo scopo finale di qualsiasi strategia di veicolazione del GF *in vivo* è preservarne la struttura tridimensionale una volta raggiunto il sito target.

Dal punto di vista strutturale, la maggior parte dei GFs dimerici mostra una struttura tridimensionale comune, caratterizzata da due monomeri legati covalentemente da tre ponti disolfuro intercatena. I residui di cisteina coinvolti sono orientati in modo tale da dare origine ad una struttura a nodo (*knot motif*). Tale configurazione è definita dalla presenza di sei cisteine altamente conservate che formano tre ponti disolfuro, di cui due danno origine ad un anello che viene attraversato dal terzo legame formato. Questa particolare configurazione è un motivo strutturale fondamentale ai fini di una corretta attività recettoriale (Muller *et al.* 1997). Diverse condizioni, quali variazioni di pH e di temperatura o l'attività enzimatica *in vivo*, potrebbero causare la scissione dei ponti disolfuro con conseguente perdita della conformazione e formazione di monomeri inattivi.

La labilità del GF è soprattutto legata alla complessità strutturale di tali macromolecole. Le sofisticate strumentazioni automatizzate oggi dedicate alla sintesi automatizzata di sequenze amminoacidiche anche superiori al centinaio di residui, ha fatto crescere l'interesse della ricerca verso la sintesi di analoghi peptidici che possano, mantenendo i motivi strutturali responsabili dell'attività biologica, agire sugli stessi recettori attivati dal GF (Ringesis *et al.*, 2005). In questo modo è possibile ottenere la sintesi di poliaminoacidi che offrano la possibilità di ottenere la stessa potenza della molecola generatrice ma caratterizzati da una maggiore stabilità.

di sistemi particellari per la veicolazione del Poliaminocido JS-2892b in applicazioni di ingegneria tissutale. Sulla base degli incoraggianti risultati ottenuti nell'incapsulazione del PDGF-BB e del FGF-2, sono state impiegate micro e nanoparticelle a base di miscele di PLGA/polossamero.

2. Materiali e Metodi

2.1. Materiali

L'acido poli (D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA) 50:50 (Resomer RG 503, i.v. 0.32 - 0.44 dl/g) è stato fornito dalla Boehringer Ingelheim (Germany). Il Polossamero188 (Pluronic® F68), Mw 8400, HLB 29) è stato acquistato presso la Sigma Chemical Co. (USA). Il tampone fosfato è stato fornito dalla Sigma-Aldrich.

Il Poliaminoacido JS-2892-b è stato sintetizzato presso i laboratori del Prof. Keri, Centro Cooperativo di Ricerca, Università di Budapest, Ungheria. Tutti i solventi utilizzati sono di grado analitico e per HPLC, sono stati forniti da Merck (USA), mentre l'acido trifluoroacetico da Fluka (Svizzera). L'acqua impiegata negli esperimenti è stata filtrata mediante filtri con pori di 0,22 *mm* (Millipore).

2.2. Microsfere a base di PLGA/Polossamero contenenti il Poliaminoacido JS-2892b

2.2.1. Preparazione

Le microsfere a base di PLGA e Polossamero 188, contenenti il Poliaminoacido JS-2892b sono state preparate mediante la tecnica di emulsione olio-olio /evaporazione del solvente (Sanchez *et al.*, 1999). Sono state studiate tre formulazioni di microparticelle, chiamate rispettivamente *Micro A*, *Micro B* e *Micro C*, differenti per la fase interna della dispersione.

Nella preparazione della formulazione *Micro A*, 1 ml di soluzione acquosa contenente 2 mg/ml il Poliaminoacido JS-2892b e 10 mg/ml di Polossamero 188 è stata precedentemente sottoposta ad un ciclo di liofilizzazione di 24h. La polvere liofilizzata ottenuta è stata facilmente dispersa in 1 ml di una soluzione di PLGA in acetonitrile (100mg/ml). Tale sospensione è stata aggiunta goccia a goccia alla fase organica esterna, costituita da 80 ml di olio di semi di cotone contenente lecitina di soia (0,5 % p/v), mantenuta sotto agitazione elettromagnetica a 700 rpm (Janke & Kunkel / IKA-WERK RW 20 DZM, Germany). L'agitazione elettromagnetica è mantenuta per 30 min, in modo da facilitare l'evaporazione del solvente e la

precipitazione del polimero in forma di microparticelle. La sospensione viene poi filtrata mediante filtri con pori di 0,45 μm di diametro, le microsfele lavate con etere di petrolio ed infine essiccate. La previa liofilizzazione ha avuto lo scopo di favorire la possibile interazione tra il peptide incapsulato e il Polossamero, al fine di favorire la solubilizzazione del il Poliaminoacido JS-2892b in solventi acquosi e, ottenendo con la liofilizzazione una polvere fine, migliorare la dispersione all'interno della fase organica.

Le formulazioni di microsfele *Micro B* e *Micro C* sono state preparate mediante la tecnica precedentemente descritta per la preparazione della formulazione *Micro A*, modificando la fase interna utilizzata e impiegando una incapsulazione teorica del 2 % nella formulazione *Micro B* e 5% per la formulazione *Micro C*. Nella produzione di queste formulazioni, il Poliaminoacido JS-2892b (2 mg per la formulazione *Micro B* e 5 mg per la formulazione *Micro C*), è stato addizionato ad 1 ml di soluzione in acetonitrile di PLGA (100 mg) e Polossamero (10 mg), senza previa liofilizzazione. In assenza del processo di liofilizzazione, e quindi in assenza di un'interazione tra il Poliaminoacido JS-2892b ed il Polossamero, precedente alla fase di incapsulazione, è osservabile una spiccata solubilità del Polyaminoacid JS-2892b in acetonitrile. Si ottiene, di conseguenza, una soluzione di PLGA, Polossamero e il Poliaminoacido JS-2892b, che segue il processo indicato precedentemente per la formulazione *Micro A*.

2.2.2. Morfologia e Dimensioni delle Microparticelle

a) Osservazione al microscopio ottico

Le dimensioni delle microsfele sono state valutate al microscopio ottico (Olympus B071, Spain). La polvere è stata posta su un vetrino portaoggetto e coperta con un vetrino coprioggetto, sul quale infine è stata aggiunta una goccia di olio al silicone. Mediante una lente tarata è stato possibile stabilire le dimensioni delle particelle (100 particelle analizzate in modo random, in triplicato).

b) Osservazione al microscopio elettronico

La morfologia delle microsfele è stata analizzata mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) (JSM-T220A, Leica S440, Germania). Per l'analisi il campione è stato posto su di un supporto metallico e rivestito sotto vuoto con sali d'oro.

2.2.3. Efficienza di incapsulazione

L'efficienza di incapsulazione del Poliaminoacido JS-2892b nelle microparticelle è stata determinata mediante estrazione della molecola in PBS pH 7,4 (Na₂HPO₄ 0.01 M, KCl 0.0027 M e NaCl 0.137 M). Brevemente, 1 mg di microparticelle è stato solubilizzato in 1 ml diclorometano, e il Polyaminoacid JS-2892b è stato estratto con 1 ml di PBS pH 7,4. La determinazione quantitativa del Poliaminoacido JS-2892b è stata effettuata mediante HPLC (1200, Agilent, USA). L'analisi è stata condotta utilizzando una colonna C-8 fase inversa (Agilent, USA). Come fase eluente è stata utilizzata una miscela di TFA allo 0,1% (A) e 90% acetonitrile e 10% TFA 01% (B) in gradiente di concentrazione. Il rapporto tra le due fasi è stato variato linearmente durante la corsa partendo da una percentuale iniziale di fase A pari al 100% fino a raggiungere il 40% in 20 minuti (0% e 60% di fase B, rispettivamente). La lunghezza d'onda di rivelazione UV è stata fissata a 214 nm.

2.2.4. Cinetiche di rilascio in vitro

I profili di rilascio in vitro del Poliaminoacido JS-2892b dalle microparticelle sono stati determinati sospendendo 5 mg di microparticelle in 2 ml di PBS pH 7,4 (Na₂HPO₄ 0.01 M, KCl 0.0027 M e NaCl 0.137 M). I campioni sono stati incubati a 37°C in condizioni statiche. Ad intervalli regolari di tempo, i campioni sono stati centrifugati a 3000 RCF per 10 minuti a 5°C (Beckman Avanti™30, Beckman, Spagna), 1 ml di mezzo di rilascio è stato prelevato, il volume totale del mezzo di rilascio ripristinato con 1 ml di PBS pH 7,4 fresco e le microsfele risospese in tale mezzo. Il campione prelevato è stato analizzato mediante HPLC, come

precedentemente descritto, al fine di determinare l'ammontare di Poliaminoacido JS-2892b rilasciato

2.3. Nanoparticelle a base di PLGA/polossamero contenenti il Poliaminoacido JS-2892b

2.3.1. Preparazione

Le nanoparticelle a base di PLGA e Polossamero 188 (ratio 1:1), contenenti il Poliaminoacido JS-2892b sono state preparate mediante la tecnica di emulsione/diffusione del solvente modificata (Csaba *et al.*, 2005) in quattro formulazioni differenti per fase interna utilizzata, chiamate *Nano A*, *Nano B*, *Nano C* e *Nano D*, contenenti il Poliaminoacido JS-2892b al 2% di incapsulazione teorica.

La formulazione *Nano A* è stata preparata emulsionando una soluzione acquosa (200 µl) contenente 800 µg di Poliaminoacido JS-2892b con 2 ml di diclorometano contenenti PLGA (40 mg) e Polossamero 188 (40 mg), mediante vortex (2400 min⁻¹, Heidolph, Germania) per 30 secondi. L'emulsione ottenuta è stata addizionata a 25 ml di etanolo, mantenuti sotto moderata agitazione elettromagnetica, allo scopo di ottenere la immediata precipitazione del polimero in forma di nanoparticelle. La sospensione di nanoparticelle è stata diluita con 25 ml di acqua milli-Q e l'agitazione elettromagnetica è stata mantenuta per 10 min, per favorire la evaporazione del solvente organico. Infine, le nanoparticelle sono state concentrate sotto vuoto a 30°C, mediante Rotavapor[®] (Heidolph VV 2000, Germania), fino ad un volume di 10 ml.

La formulazione *Nano B* è stata preparata seguendo lo stesso procedimento descritto per la preparazione della formulazione *Nano A*, ma utilizzando come fase interna un volume maggiore di soluzione acquosa contenente Poliaminoacido JS-2892b (800 µg/400 µl di acqua).

Tenendo in considerazione la bassa solubilità del Poliaminoacido JS-2892b, la formulazione *Nano C* è stata preparata utilizzando come fase interna una soluzione della molecola in etanolo (800 µg/200 µl di etanolo).

Infine, nella formulazione *Nano D*, prima della nanoincapsulazione è stata liofilizzata una soluzione acquosa contenente il Poliamminoacido JS-2892b (800 µg) e Polossamero 188 (40 mg). La polvere liofilizzata ottenuta è stata quindi sospesa in 2 ml di diclorometano contenenti 40 mg di PLGA, mediante agitazione con vortex per 30 secondi. La sospensione è stata poi addizionata a 25 ml di etanolo mantenuti sotto moderata agitazione elettromagnetica e successivamente diluita con 25 ml di acqua milli-Q, così come descritto precedentemente.

2.3.2. Morfologia, Dimensioni e Potenziale ζ delle Nanoparticelle

a) Osservazione al microscopio elettronico

La morfologia delle microsfele è stata analizzata mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) (JSM-T220A, Leica S440, Germania). Per l'analisi la sospensione acquosa di nanoparticelle è stata posta su di un supporto metallico, essiccata e rivestito sotto vuoto con sali d'oro.

b) Analisi delle dimensioni e del potenziale ζ

Le dimensioni delle nanoparticelle sono state determinate mediante Photon Correlation Spectroscopy (PCS), analizzando la sospensione di nanoparticelle opportunamente diluita in acqua. L'analisi del potenziale ζ delle particelle è stata effettuata mediante Laser Doppler Anemometry (LDA), diluendo opportunamente il campione con una soluzione salina KCl 1N.

2.3.3. Efficienza di incapsulazione

L'efficienza di incapsulazione del Poliamminoacido JS-2892b nelle nanoparticelle è stata determinata mediante estrazione della molecola in PBS a pH 7,4, come descritto precedentemente per le microparticelle. Brevemente, 1 mg di nanoparticelle liofilizzate è stato solubilizzato in 1 ml diclorometano, e il Poliamminoacido JS-2892b è stato estratto con 1 ml di PBS pH 7,4 (Na₂HPO₄ 0.01 M, KCl 0.0027 M e NaCl 0.137 M). Segue determinazione quantitativa mediante HPLC (1200, Agilent, USA).

2.3.4. Cinetiche di rilascio in vitro

I profili di rilascio in vitro del Poliaminoacido JS-2892b dalle nanoparticelle a base di PLGA e Polossamero è stata determinata incubando 5 ml di una sospensione di nanoparticelle (2 mg/ml), a 37°C in condizioni statiche. Ad intervalli di tempo regolari, 500 µl di tale sospensione sono stati prelevati, filtrati mediante filtri con porosità di 0,22 µm ed analizzati mediante HPLC, come precedentemente descritto. Il volume totale del mezzo di rilascio è stato ripristinato con PBS pH 7,4 fresco ad ogni intervallo di tempo.

2.3.5. Studi di Liofilizzazione delle Nanoparticelle

Come già discusso in precedenza, le nanoparticelle in mezzi acquosi formano sospensioni colloidali che presentano una stabilità limitata nel tempo. Al fine di aumentare la stabilità e semplificare la conservazione di tali sistemi particellari sono stati condotti studi di liofilizzazione di sospensioni nanoparticellari, contenenti il Poliaminoacido JS-2892b e bianche, in presenza di crioprotettori di natura zuccherina, nello specifico trealosio e saccarosio.

Le nanoparticelle sono state sospese in una soluzione acquosa contenente trealosio o saccarosio al 5% (w/v). Gli studi sono stati condotti utilizzando sospensioni di nanoparticelle in due differenti concentrazioni (1mg/ml e 2 mg/ml). La sospensione ottenuta è stata congelata a -80°C e sottoposta ad un ciclo di liofilizzazione di circa 48 ore. La polvere liofilizzata è stata risospesa in acqua filtrata ed opportunamente diluita per poter essere analizzata mediante PCS, al fine di valutarne la dimensione e l'indice di polidispersità (I.P.).

3. Risultati e Discussione

3.1. Proprietà delle particelle

3.1.1. Microparticelle

Le tecniche più impiegate per l'allestimento di sistemi microparticellari prevedono la formazione di emulsioni tra fasi acquose contenenti il principio attivo da incapsulare ed una fase organica contenente il polimero. La formazione di emulsioni si traduce solitamente nell'esercizio di forze di taglio e cavitazionali che possono ledere la struttura della molecola impiegata. In teoria una dispersione della proteina nel solvente organico (i.e. dispersione solido/solvente organico) può portare ad una minore flessibilità conformazionale delle molecole, in caso di incapsulazione di peptidi e proteine, preservando la struttura tridimensionale e minimizzando la denaturazione. Inoltre, impiegando una polvere micronizzata la dispersione del principio attivo risulta essere semplice. Le microparticelle a base di PLGA/polossamero sono state preparate mediante la tecnica di olio/olio, previa dispersione e/o solubilizzazione del Poliaminoacido JS-2892b nella fase organica interna contenente il PLGA.

Le formulazioni iniziali, tuttavia, sono state variate al fine di comprendere quali parametri fossero essenziali nella regolazione delle proprietà finali delle microparticelle e, quindi, delle loro potenzialità nell'applicazione terapeutica. La composizione delle formulazioni è riportata in tabella 1.

Tabella 1. Composizione delle microparticelle contenenti il Poliaminoacido JS-2892b (PA)

Formulazione	Stato fisico del PA	Incapsulazione Teorica PA	Polossamero (mg)	PLGA (mg)
<i>Micro A</i>	Polvere Liofilizzata	2 %	10	100
<i>Micro B</i>	Solubilizzato	2 %	10	100
<i>Micro C</i>	Solubilizzato	5 %	10	100

Le immagini ottenute dal Microscopio a Scansione Elettronica (SEM), dimostrano che le condizioni di microincapsulazione consentono di ottenere particelle dalla forma sferica e regolare e dalla superficie non porosa, in accordo con i risultati solitamente ottenuti in microparticelle preparate mediante la tecnica di dispersione olio in olio/evaporazione del solvente (Tobio *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1999) (figura 2).

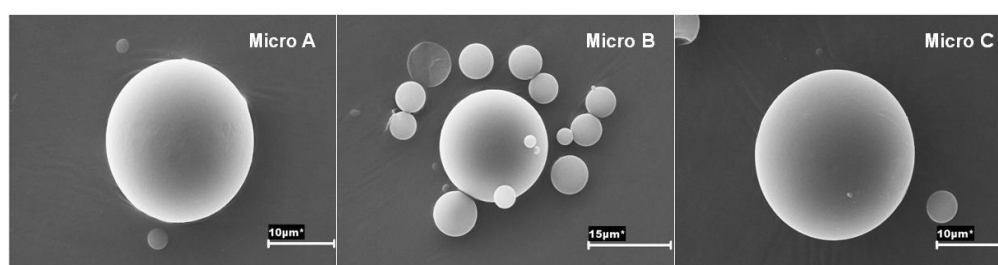


Figura 2: Immagini al microscopio a scansione elettronica (SEM) delle microsfele a base di PLGA e Polossamero 188 (*Micro A, Micro B, Micro C*).

Come si può osservare dalle immagini, variando la fase interna utilizzata e l'incapsulazione teorica del Poliaminoacido JS-2892b, non si riscontrano variazioni nella morfologia esterna delle particelle, mentre la organizzazione della matrice è fortemente influenzata dalle condizioni formulative.

Tabella 2. Proprietà delle microparticelle contenenti il Poliaminoacido JS-2892b (PA)

Formulazione	Diametro ($\mu\text{m} \pm \text{D. S.}^{\text{a}}$)	Resa di produzione ($\% \pm \text{D.S.}^{\text{a}}$)	Efficienza di Incapsulazione ($\% \pm \text{D.S.}^{\text{a}}$)	Incapsulazione Reale ($\% \pm \text{D.S.}^{\text{a}}$)
<i>Micro A</i>	20 ± 6	100 ± 0.5	91 ± 3	1.82 ± 0.06
<i>Micro B</i>	19 ± 8	99 ± 1	90 ± 4	1.84 ± 0.05
<i>Micro C</i>	21 ± 6	100 ± 0.5	100 ± 5	5.00 ± 0.28

^aDeviazione standard controllata su tre differenti lotti di nanoparticelle

Le microparticelle sono state caratterizzate per dimensioni, resa di produzione ed efficienza di incapsulazione del Poliamminoacido JS-2892b. I risultati delle tre formulazioni studiate sono rappresentate nella tabella 2.

Le microparticelle presentano tutte un diametro di approssimativamente 20 μm , in accordo con i diametri delle microparticelle ottenuti solitamente mediante tale tecnica di preparazione (Csaba *et al.*, 2005).

Impiegando una sospensione diretta del peptide nella fase organica contenente il polimero è possibile ovviare i problemi di denaturazione della molecola ed inoltre, l'utilizzo di olio di semi di cotone come fase esterna continua può prevenire il passaggio indesiderato del Poliamminoacido JS-2892b dalla matrice alla fase esterna, incrementando così l'efficienza di incapsulazione. Infatti le tre formulazioni di microparticelle sono caratterizzate da una efficienza di incapsulazione sempre superiore al 90 % ed una resa di produzione molto vicina al 100%.

3.1.2. Nanoparticelle

Nanoparticelle a base di PLGA/polossamero per il rilascio modificato del Poliamminoacido JS-2892b sono state preparate mediante una tecnica di emulsione/diffusione del solvente modificata (Csaba *et al.*, 2006). In analogia con le microparticelle, sono state preparate diverse formulazioni al fine di comprendere quali parametri tecnologico-formulativi svolgono un ruolo cruciale nella regolazione delle proprietà finali delle microparticelle e, quindi, delle loro potenzialità nell'applicazione terapeutica. La composizione delle formulazioni è riportata in tabella 3.

Tabella 3. Composizione delle nanoparticelle a base di PLGA e Polossamero 188 contenenti il Poliamminoacido JS-2892b (PA).

Formulazione	Stato fisico del PA	Fase interna	Volume fase interna
<i>Nano A</i>	Solubilizzato	Acqua	200 μ l
<i>Nano B</i>	Solubilizzato	Acqua	400 μ l
<i>Nano C</i>	Solubilizzato	Etanolo	200 μ l
<i>Nano D</i>	Polvere liofilizzata	-	-

Tutte le formulazioni prodotte sono caratterizzate per morfologia, dimensioni, indice di polidispersità, potenziale zeta, resa di produzione, ed efficienza d'incapsulazione. Le analisi della morfologia al Microscopio a Trasmissione Elettronica (TEM) dimostrano che la tecnica di incapsulazione adottata consente di ottenere particelle contenenti il Poliamminoacido dalla forma sferica e regolare, in accordo con i risultati solitamente ottenuti in microparticelle preparate mediante tale metodica (Csaba *et al.*, 2005). In figura 3 sono riportate quale esempio le immagini della formulazione *Nano B*, su cui sarà approfondito lo studio.

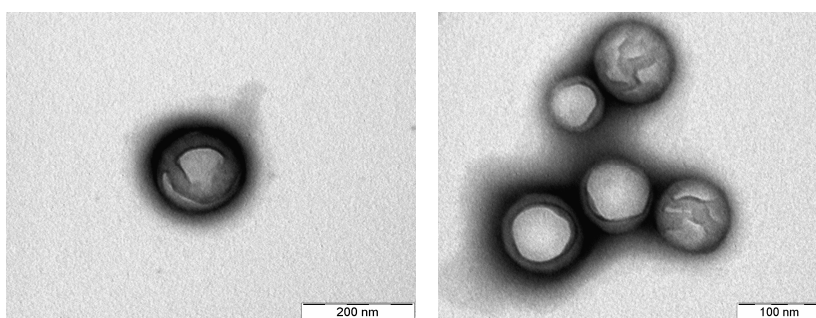


Figura 3. Immagini al microscopio a trasmissione elettronica (TEM) delle nanoparticelle a base di PLGA e Polossamero 188 (*Nano B*).

Le proprietà tecnologiche delle nanoparticelle preparate sono riportate nella tabella 4.

Tabella 4. Proprietà delle nanoparticelle a base di PLGA e Polossamero 188 contenenti il Poliaminoacido JS-2892b.

Formulazione	Diametro (nm± D.S. ^a)	Indice di Polidispersione	Resa di Produzione (%±D.S. ^a)	Potenziale ζ (mV±D.S. ^a)	Incapsulazione Reale (%±D.S. ^a)	Efficienza di Incapsulazione (%±D.S. ^a)
<i>Nano A</i>	291 ± 3,3	0,049-0,099	73 ± 3	-5,4 ± 0,6	0,5 ± 0,06	15 ± 3
<i>Nano B</i>	283 ± 8,8	0,013-0,018	73 ± 1	-6,8 ± 0,8	1,5 ± 0,14	52 ± 7
<i>Nano C</i>	291 ± 2,5	0,056-0,070	74 ± 2	-5,6 ± 1,3	0,2 ± 0,05	8 ± 2
<i>Nano D</i>	271 ± 4,6	0,017-0,025	72 ± 3	-2,1 ± 0,2	0,2 ± 0,01	7 ± 1

^aDeviazione standard controllata su tre differenti lotti di nanoparticelle

In tutti i casi, il diametro medio delle nanoparticelle è inferiore ai 300 nm, in accordo con i diametri delle particelle solitamente ottenute mediante la tecnica di emulsione/diffusione del solvente (Csaba *et al.*, 2004), ed un indice di polidispersione molto basso. Il potenziale ζ osservato è negativo per la natura del polimero utilizzato (PLGA), ma i valori risultano essere meno negativi se paragonati ai valori di potenziale delle particelle a base di PLGA e Polossamero non cariche, inferiori a -20 mV. Alla luce di tale risultato, si può ipotizzare che l'incapsulazione del Poliaminoacido JS-2892b determina una riorganizzazione della matrice polimerica con una concentrazione del polossamero prevalentemente nella parte più esterna della nanoparticelle, responsabile di una diminuzione della carica negativa superficiale (Csaba *et al.*, 2004).

L'efficienza d'incapsulazione delle nanoparticelle è fortemente influenzata dalle condizioni formulative adottate (tabella 4). In particolare, tra le formulazioni *Nano A* e *Nano B* si osserva un incremento dell'efficienza di incapsulazione dal 15% ad il 50%. Tale effetto è riconducibile alla moderata solubilità del

Poli-aminoacido JS-2892b in acqua. Nella preparazione delle formulazioni *Nano A* e *Nano B*, infatti, la fase interna è costituita, a parità di peptide aggiunto, da volumi differenti di soluzione acquosa del Poli-aminoacido JS-2892b. Si può, quindi, ipotizzare che utilizzando un volume di fase interna maggiore, diminuisca la forza spingente e la diffusione della molecola verso la fase esterna durante il processo d'incapsulazione. D'altra parte, si osserva un calo vertiginoso dell'efficienza di incapsulazione, che risulta essere inferiore al 10 %, per entrambe le formulazioni *Nano C* e *Nano D*. Va sottolineato che tali formulazioni sono state preparate senza la formazione della emulsione primaria, aggiungendo direttamente alla fase organica contenente il PLGA il Poli-aminoacido, tal quale o co-liofilizzato con il polossamero 188, disciolto in etanolo. Tali risultati inducono a pensare che la formazione di un'emulsione primaria possa ostacolare la diffusione della molecola incapsulata verso la fase esterna idro-alcoolica, in particolar modo se la molecola di interesse presenta una spiccata solubilità in etanolo, così come osservato per il Poli-aminoacido JS-2892b.

3.2. Cinetiche di rilascio del Poliamminoacido JS-2892b dalle micro e nanoparticelle

Le cinetiche di rilascio *in vitro* del Poliamminoacido JS-2892b da micro e nanoparticelle sono state valutate in soluzione tampone PBS pH 7,4, a 37°C, in condizioni statiche. Tenendo in considerazione le proprietà delle nanoparticelle studiate, è stato condotto lo studio sulle cinetiche di rilascio del Poliamminoacido JS-2892b solo per la formulazione *Nano B*, caratterizzata dalla migliore efficienza di incapsulazione.

I profili di rilascio della formulazione di nanoparticelle e delle tre formulazioni di microparticelle prescelte sono rappresentate in figura 4.

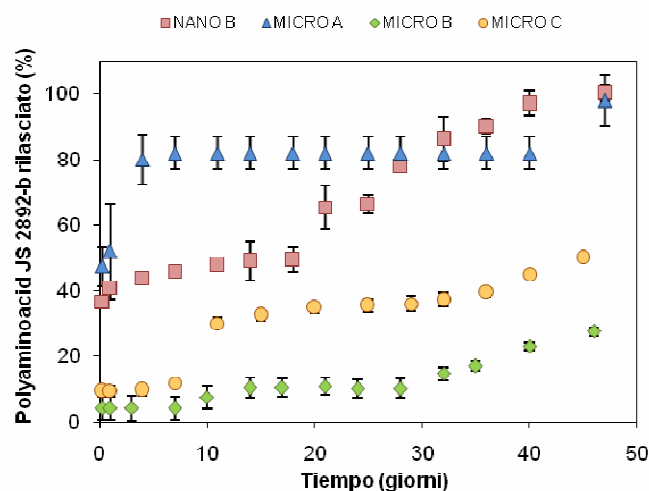


Figura 4. Profili di rilascio del Poliamminoacido JS-2892b dalle nanoparticelle *Nano B* e dalle formulazioni di microparticelle *Micro A*, *Micro B* e *Micro C*.

Il profilo di rilascio della formulazione di microparticelle *Micro A* è caratterizzato da un rilascio iniziale del Poliamminoacido JS-2892b (*burst*) piuttosto elevato, superiore al 40 %. Il veloce rilascio della molecola incapsulata suggerisce una concentrazione del peptide sulla superficie della particella. Infatti, solitamente in microparticelle ottenute mediante la dispersione di un solido nella fase organica contenente il polimero (S/O/O), si ottiene una matrice polimerica in cui il farmaco è

localizzato soprattutto nella zona superficiale, che favorisce la diffusione verso il mezzo di rilascio. Inoltre, la previa liofilizzazione del Poliaminoacido JS-2892b con il polossamero 188 incrementa la solubilità del peptide in acqua, favorendo la diffusione verso il mezzo di rilascio. Profili di rilascio molto differenti sono osservabili per le formulazioni *Micro B* e *Micro C*, dove il rilascio del Poliaminoacido JS-2892b è sostenuto per oltre 50 giorni, suggerendo una notevole differenza nella microstruttura interna delle microparticelle. La velocità di rilascio più elevata nel caso delle *Micro C* è riconducibile all'aumento della quantità di Poliaminoacido JS-2892b incapsulata, che determina un aumento della forza spingente verso il mezzo di rilascio.

Il profilo di rilascio del Poliaminoacido JS-2892b dalle nanoparticelle (*Nano B*), si presenta piuttosto differente da quello mostrato dalle microparticelle. Infatti, è possibile osservare un rilascio iniziale di circa il 40 % di peptide incapsulato. La elevata superficie delle nanoparticelle al mezzo di rilascio giustifica l'elevato *burst* che è tipico di sistemi dalle dimensioni nanometriche. Le particelle però sostengono il rilascio del Poliaminoacido JS-2892b per oltre 50 giorni. La forte capacità del sistema di sostenere il rilascio della molecola incapsulata può essere relazionato alla alta concentrazione nella zona superficiale della nanoparticella del polossamero 188, che può, in questo modo formare una barriera alla diffusione del Poliaminoacid JS-2892b verso il mezzo di rilascio.

Il più importante aspetto da tenere in considerazione, è la possibilità, modificando opportunamente le condizioni formulative, di ottenere sistemi dalle diverse caratteristiche e proprietà di rilascio. Gli studi effettuati hanno permesso di ottenere un ventaglio di formulazioni, applicabili, ad esempio, in casi in cui è necessaria l'attività di differenti molecole segnale in tempi distinti.

3.3. Studi di Liofilizzazione delle Nanoparticelle

Nonostante le particelle a base di PLGA, tra i sistemi nanoparticellari, presentino una stabilità piuttosto elevata in sospensione, dopo periodi di tempo che non superano un mese, danno origine a fenomeni di aggregazione e perdita delle caratteristiche di colloide. Al fine di prolungare nel tempo la stabilità delle nanoparticelle in sospensione, sono stati condotti studi di liofilizzazione in presenza di trealosio e Saccarosio al 5% w/v.

Gli studi di liofilizzazione sono stati condotti sulle formulazioni di nanoparticelle contenenti Polyaminoacid JS-2892b (*Nano B*) e sulla formulazione di controllo non carica. Per entrambe le formulazioni studiate, sono state impiegate sospensioni di nanoparticelle sia con concentrazione di 1 mg/ml che 2 mg/ml.

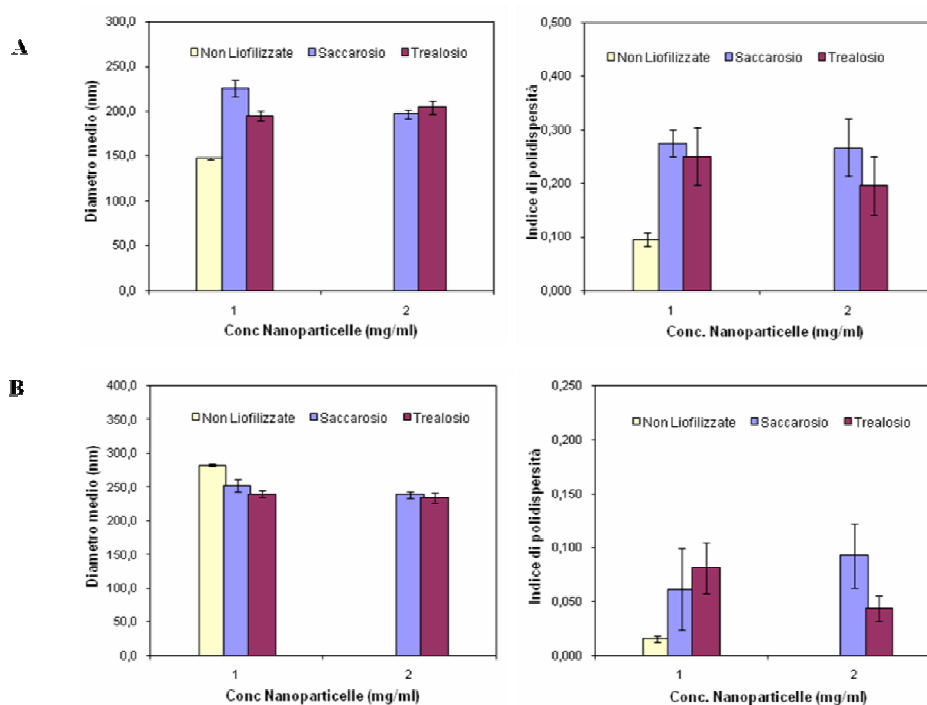


Figura 5. Studi di liofilizzazione di nanoparticelle bianche (A) e di nanoparticelle contenenti Poliaminoacido JS-2892b (B), in presenza di Trealosio 5% w/v o di Saccarosio 5% w/v.

Le polveri liofilizzate ottenute sono state sospese in acqua ed analizzate mediante PCS per valutarne le dimensioni e l'indice di polidispersità (I.P.) dopo il processo di liofilizzazione. I risultati ottenuti sono raffigurati in grafico (figura 5).

Dai grafici è possibile osservare che le dimensioni e l' I.P. delle formulazioni liofilizzate subiscono un lieve aumento rispetto alle formulazioni di controllo. Tali aumenti, però, non sono indice di un fenomeno di aggregazione, suggerendo che le formulazioni liofilizzate mantengono pressoché inalterate le caratteristiche originali, in tutti i casi analizzati. L'impiego di crioprotettore è fondamentale durante il processo di congelamento e liofilizzazione per evitare fenomeni di aggregazione delle nanoparticelle. (Jeong et al., 2005).

Durante la fase di congelamento, risulta indispensabile, una temperatura di -80°C, in quanto sia il trealosio che il saccarosio, presentano una temperatura di transizione vetrosa più elevata. A temperature superiori della temperatura vetrosa, lo zucchero, nel passaggio alla fase solida, non si organizza in nanostrutture cristalline che sono fondamentali affinché si eserciti una azione di protezione nei confronti delle nanoparticelle. La struttura nanocristallina è fondamentale per mantenere separate le nanoparticelle che, se vengono a contatto durante la fase di congelamento, danno luogo ad un fenomeno di aggregazione irreversibile.

Dai grafici si osserva inoltre che non vi è una differenza significativa tra i sospensioni a differente concentrazione di nanoparticelle e tra campioni liofilizzati in presenza di trealosio e saccarosio, a dimostrazione che entrambi gli zuccheri sono ottimi agenti lioprotettori fino a concentrazioni di nanoparticelle di 2 mg/ml. Nonostante ciò, il trealosio rimane il crioprotettore eletto per studi successivi di liofilizzazione, non solo per gli ottimi risultati ottenuti, ma anche perché tra i crioprotettori a struttura zuccherina risulta essere uno degli eccipienti più inerti e più utilizzati. Il trealosio scatena, infatti, una minore risposta all'insulina in confronto ad altri zuccheri. Risulta di particolare rilievo l'alta stabilità, connessa alla circostanza che il trealosio non si idrolizza immediatamente per dare origine a reazioni di Maillard con aminoacidi e proteine. Di conseguenza, tale zucchero permette di mantenere le caratteristiche originali dei prodotti anche dopo processi di

riscaldamento e prolungata conservazione. Inoltre resiste a livelli di umidità relativa fino al 94%, pertanto i prodotti trattati con trealosio possono incrementare la loro stabilità, beneficiando della bassa igroscopicità.

4. Conclusioni

E' noto che processi complessi alla base della rigenerazione del tessuto (i.e. angiogenesi), prevedono l'azione sinergica di differenti stimoli chimici, in concentrazioni ed intervalli di tempo differenti (Chen *et al.*, 2003). Lo sviluppo di sistemi di veicolazione per applicazioni di ingegneria tissutale, quindi, deve poter garantire adattabilità all'applicazione ed attività del principio attivo incapsulato.

Sono stati sviluppati sistemi, differenti per caratteristiche fisico-chimiche e profili di rilascio, apportando appropriate modifiche alle condizioni formulative. E' stato possibile ottenere, in questo modo, un vasto ventaglio di scelta, al fine di disporre sempre del sistema di veicolazione adeguato. In questo modo, tale approccio potrà, quindi, essere applicato ed esteso a differenti molecole terapeutiche, anche contemporaneamente, in modo da esporre le cellule all'azione di differenti stimoli.

In particolare, in questo lavoro i sistemi particellari, sviluppati, a base di *blend* PLGA/Polossamero si sono dimostrati veicoli efficienti per l'incapsulazione del peptide di origine sintetica (Poli-aminoacido JS-2892b). Nonostante la maggiore stabilità del peptide rispetto ai GFs di natura proteica, è stato ritenuto opportuno impiegare nell'allestimento dei sistemi, il polossamero. Tale eccipiente presenta proprietà stabilizzanti nei confronti di molecole di natura proteica, ma inoltre, come dimostrato nella veicolazione del Poli-aminoacido JS-2892b, può modificare le proprietà del principio attivo (i.e. solubilità in acqua). Dipendendo dalla metodica d'impiego del polossamero (i.e. liofilizzazione previa con il peptide, diretta solubilizzazione in solvente organico), è possibile modulare le caratteristiche e proprietà della formulazione finale.

Anche in questo caso, il fine ultimo è l'applicazione dei sistemi particellari in ingegneria tissutale, mediante l'integrazione delle particelle in *scaffold* polimerici tridimensionali.

Bibliografia

- Alonso M.J. Nanomedicines for overcoming biological barriers *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58 (2004) 168–172
- Anderson J.M., Shive M.S.. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28 (1997) 5–24
- Ankola DD, Viswanad B, Bhardwaj V, Ramarao P, Kumar MN. Development of potent oral nanoparticulate formulation of coenzyme Q10 for treatment of hypertension: can the simple nutritional supplements be used as first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy? *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 Sep;67(2):361-9.
- Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17(3):247-89
- Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm Res* 2000; 17:497-504.
- Banfi A., von Degenfeld G., Blau H.M. Critical role of microenvironmental factors in angiogenesis. *Curr Atheroscler Rep.* 7:227-234 (2005).
- Battista S., Guarnieri D., Borselli C., Zeppetelli S., Borzacchiello A., Mayol L., Gerbasio D., Keene D.R., Ambrosio L., Netti P.A, The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation, *Biomaterials.* 26 (2005) 6194–6207.
- Batycky RP, Hanes J, Langer R, Edwards DA. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J Pharm Sci.* 1997 Dec;86(12):1464-77.
- Benoit J.P, Marchais H., Rolland H., Vande Velde V. Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology. In S. Benita (Eds.), *Microencapsulation.* Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 36-62.
- Biondi M., Ungaro F., Quaglia F., Netti P.A.. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2007), Available online at www.sciencedirect.com.
- Blanco D., Alonso M.J., Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres : effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants *Eur. J. Pharm. Biopharm* 45 (1998) 285-294.

- Boontheekul T, Mooney DJ. Protein-based signaling systems in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14:559-565
- Boontheekul T, Mooney DJ. Protein-based signaling systems in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14:559-565
- Borselli C., Ungaro F., Oliviero O., d'Angelo I., Quaglia F., La Rotonda M.I., Netti A.. Sustained VEGF release from PLGA microcarries controls angiogenic sprouting within collagen scaffold. Submitted for publication.
- Bosman F.T. and I. Stamenkovic. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 200:423-428 (2003).
- Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of extracellular matrix. *J Pathol* 2003; 200:423-428.
- Brun P., Abatangelo G., Radice M., Zacchi V., Guidolin D., Daga G.D., Cortivo R., Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res.* 46 (1999) 337–346.
- Burke P.A. Controlled release protein therapeutics: effect of process and formulation on stability. In D.L. Wise (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 661-692.
- Bussolino F., Wang J.M., Defilippi P., Turrini F., Sanavio F., Edgell C.J., Aglietta M., Arese P., and Mantovani A.. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature.* 337:471-473 (1989).
- Cao R., Brakenhielm E., Pawluk R., Wariaro D., Post M.J., Walberg E., Leboulch P., Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat. Med.* 2003 May,9(5):604-613.
- Chen R.R., Mooney D.J., Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1103–1112.
- Chen RR, Mooney DJ, Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering, *Pharm Res* 2003, 20:1103-1112.
- Chung Yong-II, Ahn Kang-Min, Jeon Seung-Ho, Lee Seung-Young, Lee Jong-Ho, Tae Giyoong, Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle–hydrogel complex *Journal of Controlled Release* 121 (2007) 91–99

- Cleland JL, Duenas ET, Park A, Daugherty A, Kahn J, Kowalski J, Cuthbertson A. Development of poly-(D,L-lactide--coglycolide) microsphere formulations containing recombinant human vascular endothelial growth factor to promote local angiogenesis. *J Control Release* 2001; 72:13-24.
- Cohen S, Alonso MJ, Langer R. Novel approaches to controlled release antigen delivery. *Int Technol Assessment Health Care* 1994;10(1):121-30.
- Costantino, H.R., Langer, R., Klibanov, A. Aggregation of a lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: Effect of moisture and stabilization by excipients. *Bio/Technol.* 13 (1995) 493-496.
- Couvreur P., Prieto M.J., Puisieux F., Raques B., Fattal E. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides *Adv. Drug Del* 28 (1997) 85-96.
- Crotts G. and Park T.G. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J. Microencapsul.* 15 (1998) 699-713.
- Csaba N, Gonzalez L, Sanchez A, Alonso MJ. Design and characterisation of new nanoparticulate polymer blends for drug delivery. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2004; 15(9):1137-51.
- Csaba N., Caamano P., Sanchez A., Dominguez F. and Alonso M.J. PLGA:Poloxamer and PLGA:Poloxamine Blend Nanoparticles: New Carriers for Gene Delivery *Biomacromolecules* 2005, 6, 271-278
- Csaba N., Sánchez A., Alonso M.J. PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *Journal of Controlled Release* 113 (2006) 164–172
- Cui FZ, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 May;1(3):185-91
- Davis S.S., Illum L. Polymeric microspheres as drug carriers. *Biomaterials.* 9 (1988) 111-115
- Day R.M., Boccaccini A.R., Maquet V., Shurey S., Forbes A., Gabe S.M., Jerome R, In vivo characterisation of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 729–734.

- De Rosa G., La Rotonda M.I., Quaglia F., Ungaro F. Use of Additives in the Design of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microspheres for Drug Delivery *Handbook of Particulate Drug Delivery*, 2008.
- Dinbergs I.D., Brown L., Edelman E.R.. Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *J Biol Chem* 271:29822-29829 (1996).
- Elisseff J, McIntosh W, Fu K, Blunk BT, Langer R. Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Orthop Res* 2001; 19:1098-1104.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis, *Kidney International* 56 (1999) 794-814.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9:669-676 (2003).
- Fischbach C., Mooney D.J.. Polymers for pro- and anti-angiogenic therapy. *Biomaterials* 28:2069-2076 (2007).
- Flaumenhaft R, Rifkin DB. The extracellular regulation of growth factor action. *Mol Biol Cell* 1992; 3:1057-1065.
- Fredriksson L., Li H., Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (2004) 197-204
- Galindo-Rodriguez SA, Allemann E, Fessi H, Doelker E Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2005;22(5):419-64.
- Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied L, Theate I, Freichels H, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Schneider YJ, Préat V. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Control Release.* 2007 Jul 31;120(3):195-204. Epub 2007 May 22.
- Goolcharran C., Jones A.J.S., Borchardt R.T., Cleland J.L., Keck R., Comparison of the rates of deamidation, diketopiperazine formation, and oxidation in recombinant human vascular endothelial growth factor and model peptides, *AAPS Pharmsci article* 5 (2000).
- Guarino V., Causa F., Ambrosio L., Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue, *Expert. Rev. Med. Devices.* 4 (2007) 405-418.

- Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84:345-577.
- Gurdon J.B., Harger P., Mitchell A., Lemaire P., Activin signalling and response to a morphogen gradient, *Nature*. 371 (1994) 487–492.
- Heldin C H. and Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor *Physiological Reviews* 79(4), 1999. 1284-1300.
- Holland T.A, Tabata Y., Mikos A.G., Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering, *J. Control Release*. 101 (2005) 111–125.
- Hudon V., Berthod F., Black A.F., Damour O., Germain L., Auger F.A, A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro, *Br. J. Dermatol*. 148 (2003) 1094–1104.
- Hutmacher D.W.. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym.* Ed. 12:107-124 (2001).
- Ito A., Mase A., Takizawa Y., Shinkai M., Honda H., Hata K., Ueda M., Kobayashi T., Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering, *J. Biosci. Bioeng.* 95 (2003) 196–199.
- Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsulation* 1990;7:297-325.
- Jeon O., Ryu S.H., Chung J.H., Kim B.S., Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin, *J. Control Release* 105 (2005) 249–259.
- Jeong YI, Shim YH, Kim C, Lim GT, Choi KC, Yoon C. Effect of cryoprotectants on the reconstitution of surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide). *J Microencapsul.* 2005 Sep;22(6):593-601. 1. R.
- Keck R.G., Berleau L., Harris R., Keyt B.A. Disulfide structure of the heparin binding domain in vascular endothelial growth factor: characterization of posttranslational modifications in VEGF, *Archives of biochemistry and biophysics* 344 (1997) 103-113.

- Kim TK, Burgess DJ. Pharmacokinetic characterization of ¹⁴C-vascular endothelial growth factor controlled release microspheres using a rat model. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:897-905.
- Kirillova, G. P.; Mokhova, E. N.; Dedukhova, V. I.; Tarakanova, A. N.; Ivanova, V. P.; Efremova, N. V.; Topchieva, I. N. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993, 18, 329-339.
- Kissel T. and Koneberg R. Injectable biodegradable microspheres for vaccine delivery. In S. Cohen and H. Bernstein (Eds.), *Microparticulate Systems for the delivery of proteins and vaccines. Marcel Dekker, New York*, 1996, pp. 51-58
- Kitchell JP, Wise DL. Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymermatrix systems. *Methods Enzymol* 1985; 112:436-48.
- Langer R., and Vacanti J.P.. Tissue Engineering. *Science* 260:920-926 (1993).
- Langer R., Tirrell D.A., Designing materials for biology and medicine, *Nature*. 428 (2004) 487–492.
- Lecaroz M.C., Blanco-Prieto M. J., Campanero M.A., Salman H., and Gamazo C. PLGA-particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in *Brucella melitensis* infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1185-90. Epub 2007 Jan 12.
- Lee J.E., Kim S.E., Kwon I.C., Ahn H.J., Cho H., Lee S.H., Kim H.J., Seong S.C., Lee M.C., Effects of a chitosan scaffold containing TGF-beta1 encapsulated chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture, *Artif. Organs.* 28 (2004) 829–839.
- Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M, Langer R, editors. *Biodegradable polymers as drug delivery systems.* New York: Marcel Dekker, 1990. p. 1-41.
- Liu, W.R., Langer, R., Klibanov, A.M. Moisture-induced aggregation of lyophilized protein in the solid state. *Biotechnol. Bioeng.* 37 (1991) 177-184.
- Lutolf M.P., and Hubbell J.A.. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 23:47-55 (2005).
- Lutolf M.P., Hubbell J.A., Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 47–55.

- Lutolf M.P., Lauer-Fields J.L., Schmoekel H.G., Metters A.T, Weber F.E., Fields G.B., Hubbell J.A., Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5413–5418.
- Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Peter MH, Gander B. Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* 2001; 70:193-202.
- Meredith JE, Fateli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor, *Molecular Cellular Biology* 1993; 9:953-961.
- Mikos A.G., Herring S.W, Ochareon P., Elisseeff J., Lu H.H., Kandel R., Schoen F.J., Toner M., Mooney D.J., Atala A., Van Dyke M.E., Kaplan D., and Vunjak-Novakovic G., Engineering complex tissues. *Tissue Eng.* 12:3307-3339 (2006).
- Mooney DJ, Kaufmann PM, Sano K, Schwendeman SP, McNamara K, Schloo B, Vacanti JP, Langer R. Localized delivery of EGF improves the survival of transplanted hepatocytes. *Biotech Bioeng* 1996; 50:422-429.
- Muller Y. A., Li B., Christinger H. W., Wells J.A., Cunningham B.C., de Vos A. M., Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) 7192-7197.
- Ng K.W, Hutmacher D.W., Schantz J.T., Ng C.S., Too H.P, Lim T.C., Phan T.T., Teoh S.H., Evaluation of ultra-thin poly(epsilon-caprolactone) films for tissue-engineered skin, *Tissue Eng.* 7 (2001) 441–455.
- Okamoto T., Yamamoto Y., Gotoh M., Huang C.L., Nakamura T., Shimizu Y., Tabata Y., Yokomise H., Slow release of bone morphogenetic protein 2 from a gelatin sponge to promote regeneration of tracheal cartilage in a canine model, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127 (2004) 329–334.
- Ono K., Hattori H., Takeshita S., Kurita A., Ishihara M.. Structural features in heparin that interact with VEGF165 and modulate its biological activity. *Glycobiology* 9:705-711 (1999).
- Ornitz DM: FGFs, Heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays* 2000, 22:108-112.

- Pachence J.M, Collagen-based devices for soft tissue repair, *J. Biomed.Mater. Res.* 33 (1996) 35–40.
- Panyam J., Labhasetwar V., Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells, *Pharm. Res.* 20 (2003)
- Paul W., Sharma C.P., Ceramic drug delivery: a perspective, *J. Biomater. Appl.* 17 (2003) 253–264.
- Pean JM, Menei P, Morel O, Montero-Menei CN, Benoit JP. Intraseptal implantation of NGF-releasing microspheres promote the survival of axotomized cholinergic neurons. *Biomaterials* 2000; 21:2097-2101.
- Perets A., Baruch Y., Weisbuch F., Shoshany G., Neufeld G., Cohen S., Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres, *J. Biomed. Mater. Res.* 65 (2003) 489–497
- Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, Langer R, Alonso MJ. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Control Release.* 2001 Jul 10;75(1-2):211-24;
- Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, Mohammadi M: Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* 2000, 101:413-424.
- Rajeev A. J. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21 (2000) 2475-2490
- Ravi Kumar M.N.V. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3 (2000) 234-258
- Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001; 19:1029-1034.
- Ringeis R., Matthes B., Lehmann V., Becker K., Schöps R., Ulbrich-Hofmann R., Edre K. *BBA*, 2005, vol. 1721, 89-97.
- Saltzman WM, Mak MW, Mahoney MJ, Duenas ET, Cleland JL. Intracranial delivery of recombinant nerve growth factor: release kinetics and protein distribution for three delivery systems. *Pharm Res* 1999; 16: 232-240.

- Saltzman WM, Olbricht WL. Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:177-186.
- Saltzman WM, Olbricht WL. Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:177-186.
- Sanchez A., Villamayor B., Guo Y., McIver J., Alonso M.J. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 185 (1999) 255–266
- Segura T., Anderson B.C., Chung P.H., Webber R.E., Shull K.R., Shea L.D, Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern, *Biomaterials*. 26 (2005) 359–371.
- Sharif S, Wheeler AW, O'Hagan DT. Biodegradable microparticles as a delivery system for the allergens of *Dermatophagoides pteronyssinus* (house dust mite): I. Preparation and characterization of microparticles. *Int J Pharm* 1995;119:239-46.
- Shi C., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y., Cheng T., Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine, *J. Surg. Res.* 133 (2006) 185–192.
- Sokolsky-Papkov M., Agashi K, Olaye A., Shakesheff K., Domb A.J., Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 187–206.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001 Jan 29;70(1-2):1-20
- Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *The FASEB Journal* 1997; 11:51-59.
- Tanabe Y., Jessell T.M., Diversity and pattern in the developing spinal cord, *Science*. 274 (1996) 1115–1123.
- Teo W.E., He W., Ramakrishna S., Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix, *Biotechnol. J.* 1 (2006) 918–929.
- Tessler S., Rockwell, Hicklin D, Cohen T, Levin Ben-Zion, Witte Larry, Lemischka Ihor R, Neufeld G. Heparin Modulates the Interaction of VEGF, with Soluble and Cell Associated flk-1 Receptors. *the journal of biological chemistry* Vol. 269, No. 17, Issue of April 29, pp. 12456-12461, 1994.
- Tobio M., Nolley J., Guo Y. McIver J. Alonso M.J. A novel system based on Poloxamer/PLGA blends as tetanus toxoid delivery vehicle. *Pharm. Res.* 5(16), 1999.

- Ucuzian A.A., Greisler H.P.. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg.* 31:654-663 (2007).
- Ungaro F., Biondi M., Indolfi L., De Rosa G., La Rotonda M.I., Quaglia F., Netti P. Bioactivated polymer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials- Topics in Tissue Engineering* 2005, Vol 2. Eds. N. Ashammakhi & R.L. Reis © 2005.
- Ungaro F.; Biondi M.; d'Angelo I.; Indolfi I.; Quaglia F.; Netti P.A.; La Rotonda M.I.. Microsphere-integrated scaffolds for tissue engineering: effect of microsphere formulation and scaffold properties on protein release kinetics. *Journal of Controlled Release*, 2006,113(2); 128-136.
- Van de Weert M., Hennink W.E., Jiskoot W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm. Res.* 17 (2000) 1159-1167.
- Vila A., Sanchez A., Perez C., Alonso M.J. PLA-PEG nanospheres: new carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA. *Polym. Adv. Technol.* 13 (2002) 851-858
- Walter E., Dreher D., Kok M., Thiele L., Kiama S.G., Gehr P., Merkle H.P. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J. Contr. Rel.* 76 (2001) 149-168.
- Washington C. Drug release from microparticulate systems. In S. Benita (Eds.), *Microencapsulation*. Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 155-182.
- Wu XS. Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Wise et al., editors. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 1015-54.
- Xin X., Borzacchiello A., Netti P.A., Ambrosio L., Nicolais L., Hyaluronic-acid-based semi-interpenetrating materials, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 1223-1236.
- Yancopoulos G.D, Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J.. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 407:242-248 (2000).
- Ye Q., Zund G., Benedikt P., Jockenhoevel S., Hoerstrup S.P., Sakyama S., Hubbell J.A., Turina M., Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 17 (2000) 587-591.

- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC: Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 1991, 251:90-93.