

Università degli studi di Napoli Federico II



Facoltà di Farmacia

DIPARTIMENTO DI CHIMICA FARMACEUTICA E
TOSSICOLOGICA

Dottorato di Ricerca in Scienza del Farmaco
(XXIV ciclo)

Tesi di dottorato di Ricerca
**NANOVETTORI A BASE LIPIDICA PER LA VEICOLAZIONE
DI FARMACI**

Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa

MARIA VALERIA D'AURIA

Supervisore

Chiar.ma Prof.

M. IMMACOLATA LA ROTONDA

Candidata

IMMACOLATA SCOGNAMIGLIO

SOMMARIO

INTRODUZIONE GENERALE

NANOTECNOLOGIE IN CAMPO BIOMEDICO

- NANOSISTEMI A BASE LIPIDICA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI
- NANOTECNOLOGIE PER LA SOMMINISTRAZIONE PARENTERALE DI FARMACI
- LIPOSOMI *STEALTH*
- STABILIZED NANO LIPID PARTICLES (SNALP) PER LA VEICOLAZIONE DI OLIGONUCLEOTIDI (ON)
- NANOTECNOLOGIE PER LA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI SULLA CUTE

SCOPO DEL LAVORO

CAPITOLO 1

NANOSISTEMI DESTINATI ALLA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI PER VIA PARENTERALE

PARTE PRIMA

SVILUPPO DI LIPOSOMI *STEALTH* PER LA VEICOLAZIONE DEL RESVERATROLO IN TUMORI SOLIDI

INTRODUZIONE

(ATTIVITÀ ANTIMUTAGENA, ANTIPROLIFERATIVA ED ANTITUMORALE DEL RESVERATROLO)
(BIODISPONIBILITÀ DEL RESVERATROLO)

SCOPO DEL LAVORO

MATERIALI E METODI

RISULTATI

DISCUSSIONE

CONCLUSIONI

PARTE SECONDA

SVILUPPO DI NANOVETTORI A BASE LIPIDICA PER LA VEICOLAZIONE DI OLIGONUCLEOTIDI

INTRODUZIONE

SCOPO DEL LAVORO

MATERIALI E METODI

RISULTATI
DISCUSSIONE
CONCLUSIONI

CAPITOLO 2

**SVILUPPO SI NANOVEETTORI A BASE LIPIDICA PER LA VEICOLAZIONE TOPICA: IL
CASO DEL RESVERATROLO**

INTRODUZIONE
SCOPO DEL LAVORO
MATERIALI E METODI
RISULTATI
DISCUSSIONE
CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE GENERALE

NANOTECNOLGIE IN CAMPO BIOMEDICO

Le nanotecnologie possono essere definite come “Le nanotecnologie sono rappresentate da materiali e sistemi le cui strutture e componenti esibiscono nuove e significative proprietà fisiche, chimiche e biologiche grazie alle loro dimensioni nanometriche” (da *US National Nanotechnology Initiative*).

Con il termine nanomedicina, si intende poi l'applicazione delle nanotecnologie alla medicina, unisce due grandi campi interdisciplinari, con un potenziale sociale ed economico senza precedenti. Ad esempio, rispetto alla terapia convenzionale nel trattamento di patologie tumorali dove l'approccio di base è quello di rimuovere le cellule malate prima che distruggano le cellule sane, le nanomedicine utilizzano sofisticati approcci per identificare, uccidere o riparare specifiche cellule, mediante nanovettori che direzionano in maniera selettiva gli agenti diagnostici/terapeutici. Così, la nanomedicina ha bisogno non solo di applicare e utilizzare i concetti delle nanotecnologie, ma anche di informazioni di *feedback* dalle nanotecnologie così che i due campi si possano incrociare e sviluppare. Un obiettivo in questo campo è la progettazione di aggregati molecolari che hanno nuove proprietà dinamiche e funzionali, desiderabili per le applicazioni in medicina.

NANOSISTEMI A BASE LIPIDICA PER LA SOMMINISTRAZIONE PARENTERALE DI FARMACI

Tra i nanovettori che hanno riscosso maggior successo troviamo quelli a base lipidica, in particolare i liposomi. I liposomi sono stati introdotti per la prima volta da Bangham nel 1965. Essi sono strutture colloidali auto-assemblanti costituite da una membrana lipidica che riveste uno o più compartimenti acquosi e possono incapsulare un'ampia varietà di molecole. I liposomi possono essere costituiti da fosfolipidi naturali, sintetici o semi sintetici; quelli costituiti da fosfolipidi naturali sono sicuramente i più inerti biologicamente, poco immunogenici e con una bassa tossicità intrinseca. Inoltre, possono essere incapsulate molecole con differenti lipofilie: le molecole con un'elevata lipofilia andranno a disporsi maggiormente nel doppio strato lipidico, mentre le molecole idrofile si disporranno essenzialmente nei compartimenti acquosi e molecole con un logP intermedio, si ripartiranno facilmente tra le membrane ed i compartimenti acquosi (Gulati *et al.* 1998).

I liposomi possono essere classificati per la quantità di vescicole lamellari (vescicole uni-, oligo- e multi-lamellari), dimensioni (piccoli, intermedi o grandi) e per il metodo di preparazione (ad esempio, metodo a fase inversa, evaporazione di solvente o iniezione di etanolo). Le vescicole unilamellari sono costituite da un'unica membrana lipidica e generalmente hanno un diametro medio compreso tra i 50 ed i 250 nm. Esse contengono un ampio compartimento acquoso e sono preferiti per l'incapsulamento di molecole idrofile. Le vescicole multi lamellari, sono invece costituite da più membrane lipidiche concentriche disposte in maniera concentrica (tipo cipolla) ed hanno un diametro medio compreso tra 1-5 μm . L'alto contenuto di lipidi consente l'incapsulamento di molte molecole lipofile.

L'utilizzo di formulazioni a base di liposomi può superare problemi farmacocinetici cambiando la biodistribuzione del farmaco e favorendo l'interazione di quest'ultimo con cellule bersaglio. In aggiunta, i liposomi sono in grado di proteggere le molecole incapsulate dalla degradazione e possono passivamente direzionarle in tessuti o organi che presentano un endotelio discontinuo, come per esempio nel fegato, milza e midollo osseo. Dopo somministrazione intravenosa, i liposomi sono rapidamente captati dal sistema fagocitario e rimossi dal circolo sanguigno (Scherphof, 1985). Questa

caratteristica è stata sfruttata per un'efficiente veicolazione di farmaci antiparassitici ed antimicrobici per il trattamento di infezioni localizzate nel sistema reticolo endoteliale (RES) (Alving, 1978; Agrawal e Gupta, 2000; Basu e Lala, 2004), o per incapsulare immunomodulatori e stimolare la produzione di agenti tumoricida. Una volta iniettati nel circolo ematico, i liposomi sono rapidamente captati dai macrofagi ed eliminati dal torrente circolatorio. Questo è uno dei maggiori svantaggi dell'utilizzo dei liposomi come sistemi di veicolazione. L'opsonizzazione è il primo segnale che promuove la rimozione dei liposomi: il RES non riconosce i liposomi tal quali ma solo successivamente al processo di opsonizzazione, identifica i liposomi come "non-self" con conseguente eliminazione per fagocitosi o per lisi degli stessi.

L'instabilità dei liposomi nel plasma è anche dovuta alla loro interazione con lipoproteine ad alta (HDL) e bassa (LDL) densità. La loro interazione, infatti, comporta il rapido rilascio di farmaco incapsulato nel plasma.

Anche le proprietà fisico-chimiche dei liposomi, come la carica netta di superficie, l'idrofobicità, le dimensioni, la fluidità e l'impacchettamento della membrana lipidica, influenzano la loro stabilità ed il tipo di proteine che si legano ad esse (Chonn *et al.*, 1992; Oja *et al.*, 1996). Il primo passo per superare questi problemi è stato quello di manipolare la membrana lipidica per modificarne la fluidità. Damen e collaboratori (2005) hanno dimostrato che l'incorporazione di molecole di colesterolo (chol), comporta un incremento dell'impacchettamento dei fosfolipidi nel *bilayer*, riducendo il passaggio dei fosfolipidi nelle HDL; Senior (1982), dimostrò che i liposomi preparati con la fosfatidilcolina (PC) con catene alchiliche saturate (con un'elevata temperatura di transizione) o con sfingomieline sono molto più stabili nel sangue rispetto ai liposomi preparati con PC con catene alchiliche non sature.

Per ridurre il riconoscimento dei liposomi da parte del RES, sono stati presi in considerazione anche altri approcci, tra cui la modulazione delle dimensioni dei liposomi e della loro carica superficiale. In generale, i liposomi con dimensioni molto grandi sono eliminati dalla circolazione sanguigna più rapidamente rispetto a quelli più piccoli (Senior, 1982). Inoltre, le vescicole unilamellari (SUV) hanno un tempo di dimezzamento dell'organismo più lungo rispetto a quelle multi lamellari (MVL) (500-5000 nm). Questi risultati suggeriscono che i fagociti sono in grado di distinguere tra le dimensioni delle vescicole.

Anche la presenza di cariche sulla superficie delle vescicole influenza in maniera significativa il riconoscimento e quindi l'eliminazione, dei liposomi dal circolo sanguigno. Liposomi carichi negativamente hanno una breve emivita plasmatica rispetto ai liposomi neutri, sebbene è stato evidenziato anche il contrario (Nishikawa, 1990; Funato, 1992); i liposomi carichi positivamente inoltre, sono tossici e sono rimossi velocemente dalla circolazione (Senior, 1987). Inoltre, è stato riportato che il sistema del complemento è attivato da entrambi i tipo di cariche (negative e positive), (Price *et al.*, 2001).

Partendo da questi risultati, sono stati preparati liposomi “convenzionali” costituiti da lipidi carichi negativamente e/o neutri e colesterolo. Alcune di queste formulazioni sono entrate in commercio (tabella 1) o sono in fase clinica di sperimentazione. I principali esempi di questo tipo di formulazioni sono: Ambisome® (Gilead Sciences, Foster City, CA, USA) in cui è stato incapsulato l'antifungino amfotericina B (Veerareddy e Vobalaboina, 2004), Myocet® (Elan Pharmaceuticals Inc., Princeton, NJ, USA) contenente un agente antitumorale, la doxorubicina (Alberts *et al.*, 2004) e il Daunoxome® (Gilead Sciences), in cui è presente la daunorubicina (Allen e Martin, 2004). Per ottenere formulazioni stabili, contenenti quantità costanti di farmaco, sono stati utilizzati diversi meccanismi. In particolare, la formulazione Ambisome® è stata liofilizzata; Myocet® si presenta con tre *vials*, una contenente la doxorubicina in polvere, una contenente una soluzione di liposomi vuoti in acido citrico e la terza contenente una soluzione di carbonato di sodio. In questo caso, l'incapsulamento del farmaco è ottenuta immediatamente prima della somministrazione. Daunoxome® è presente come formulazione liposomiale pronta per l'iniezione.

L'uso di fosfolipidi saturati ed il colesterolo nelle formulazioni liposomiali per la veicolazione di farmaci, non può completamente superare i limiti di stabilità delle formulazioni nel circolo sanguigno. In taluni casi, è stato dimostrato che è necessaria la somministrazione di liposomi vuoti prima di quella contenente la formulazione carica di farmaco. Inoltre, l'uso di liposomi carichi può essere tossico. Molte strategie sono state sviluppate per superare queste difficoltà ed una soluzione è stata quella di rivestire le superfici liposomiali con molecole inerte per formare una barriera spaziale.

La prima strategia studiata è stata la preparazione di liposomi che mimassero le membrane degli eritrociti; in questo caso, la superficie dei liposomi è stata modificata

con gangliosidi e derivati dell'acido sialico, un esempio sono i monosialogangliosidi (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Allen *et al.*, 1989). Lo step successivo è stato quello di aumentare la idrofilicità della superficie liposomiale usando polimeri idrofili. E' stato ampiamente discusso il meccanismo per cui aumentando la stabilità dei liposomi si incrementa la loro longevità nella circolazione sanguigna (Drummond *et al.*, 1999). Il concetto base sta nel fatto che un polimero idrofilico o un glicolipide, come il polietilen glicole (PEG) o il monosialogangliosidi (GM1), possedendo una catena flessibile che occupa lo spazio immediatamente adiacente alla superficie liposomiale, tende a escludere altre molecole da questo spazio. Di conseguenza, l'accesso ed il legame delle opsonine nel plasma sulla superficie dei liposomi è impedita. In tal modo, viene evitato il riconoscimento da parte del RES e l'eliminazione dei liposomi stessi dal circolo ematico. Grazie a questo meccanismo, i liposomi "a lunga circolazione" possono accumularsi passivamente negli altri tessuti o organi. Questo fenomeno, chiamato targeting passivo, è particolarmente evidente nei tumori solidi che vanno incontro ad angiogenesi: la presenza di un endotelio discontinuo in un tumore neovascolarizzato, consente lo stravasamento delle formulazioni liposomiali nello spazio interstiziale. Inoltre, l'accumulo, causato dalla mancanza di un efficiente drenaggio linfatico nel tumore, consente un efficace sistema di rilascio prolungato del farmaco nella massa tumorale. Questo processo è meglio conosciuto come aumento della permeazione e della ritenzione o EPR (Maeda *et al.*, 2001).

Le formulazioni liposomiali, normalmente, non stravasano nei tessuti sani poiché essi presentano delle giunture strette tra le cellule endoteliali dei capillari. Questi meccanismi sembrano essere responsabili dell'aumento dell'effetto terapeutico delle formulazioni antitumorali rispetto ai farmaci liberi. In ogni caso, i processi coinvolti nella veicolazione di questi *carrier* verso le masse tumorali ed il rilascio degli agenti attivi nelle cellule tumorali sono ancora sconosciuti.

Liposomi *Stealth*

Tra i differenti tipi di polimeri investigati nel tentativo di promuovere l'aumento del tempo di circolazione dei liposomi, il poli-(etilenetilen glicole), PEG, è stato ampiamente utilizzato come stabilizzante sterico. Esso può essere incorporato sulla superficie dei liposomi in diversi modi, ma il metodo più ampiamente usato al momento è quello di utilizzare un fosfolipide a cui è stato precedentemente legato il PEG (per esempio il PEG-distearoilfosfatidiletanolamina [DSPE]) nella formulazione liposomiale (Allen *et al.*, 1991, 2002).

Il PEG (CAS number 25322-68-3) è un polietere diolico presentante molti vantaggi: biocompatibilità (Powell 1980), solubilità in acqua e in miscele organiche, scarsa tossicità, bassissima immunogenicità e antigenicità (Dreborg e Akeblom, 1990) ed infine, una buona cinetica di escrezione (Yamaoka *et al.*, 1994). Queste proprietà permettono il suo uso per una vasta gamma di applicazioni (Harris, 1992), incluse quelle biomediche. Inoltre, il peso molecolare e la struttura del PEG possono facilmente essere modulate per specifici propositi. La modifica della superficie dei liposomi con il PEG può avvenire secondo diverse strategie: adsorbimento fisico del polimero sulla superficie dei liposomi, l'incorporazione del coniugato lipide-PEG nella formulazione durante la preparazione od infine, tramite l'attacco mediante reazione chimica di gruppi funzionali del polimero sulla superficie dei liposomi.

L'attacco del PEG sui liposomi comporta notevoli vantaggi sia biologici che tecnologici. La proprietà più rilevante delle vescicole PEGilate è la forte riduzione dell'*uptake* da parte del RES e di conseguenza, il prolungamento dell'emivita plasmatica e l'aumento della distribuzione nei tessuti vascolarizzati. Inoltre, il PEG sulla superficie dei liposomi impedisce l'aggregazione, aumentando la stabilità delle formulazioni. Needham e collaboratori (1992), hanno dimostrato che la presenza del PEG sulla superficie dei liposomi, comporta una forte repulsione tra le membrane che può superare le forze attrattive di Van del Waals, stabilizzando le preparazioni prevenendone l'aggregazione.

Per quanto riguarda la captazione delle formulazioni da parte del RES, Blum e collaboratori hanno dimostrato che l'incremento del tempo di circolazione è dovuto alla minor interazione con le proteine del plasma e le proteine presenti sulla superficie delle

cellule (Blume, 1993; Vert e Domurado, 2000). Una possibile spiegazione a questa ridotta interazione con i componenti del plasma potrebbe essere un impedimento sterico generato dalle molecole di PEG attaccate ai liposomi.

Le caratteristiche dei liposomi PEG (detti anche liposomi *stealth* = liposomi “invisibili”) dipendono dalle proprietà specifiche del PEG legato alla superficie del *carrier*. Il peso molecolare del polimero, come anche la quantità di molecole legate sulla superficie, determinano il grado di copertura della superficie stessa e la distanza tra i siti di attacco. E’ stato inoltre, dimostrato che l’utilizzo di PEG ad alto peso molecolare comporta tempi di circolazione nell’organismo maggiori rispetto all’utilizzo di PEG a peso molecolare più basso (Allen *et al.*, 1989).

I liposomi *stealth*, grazie all’effetto di targeting passivo, sono importanti nella terapia del cancro. Ciò è dovuto alla capacità di accumularsi nello spazio interstiziale tra le cellule tumorali (effetto EPR), ma una volta nell’area del tumore. Secondo alcuni autori, i liposomi *stealth* stazionano nello spazio extracellulare circondante le cellule tumorali, senza entrarvi; così, per far sì che l’agente antitumorale, come la doxorubicina o il cisplatino possa agire, deve essere rilasciato dai liposomi nel fluido extracellulare e diffondere nelle cellule (Harrington *et al.*, 2000a, 2000b). In tal senso, l’abilità dei liposomi di veicolare agenti antitumorali nel tumore (che dipende dalla loro stabilità) e di rilasciarlo nei fluidi extracellulari (dipendente dalla composizione e dalla fluidità della membrana) sono fattori equamente importanti nel determinare l’effetto antitumorale dell’agente antitumorale incapsulato all’interno dei liposoma. Sfortunatamente, poco è conosciuto riguardante le cinetiche di rilascio del farmaco dal liposoma nello spazio interstiziale: solamente pochi farmaci possono penetrare nei tumori solidi e difficilmente è possibile determinare il rapporto tra farmaco libero/incapsulato nei liposomi, nel fluido extracellulare tumorale (Zamboni *et al.*, 2004).

Myocet[®] e Caelyx[®] (Doxil[®] negli Stati Uniti) sono stati i primi nanovettori auto assemblanti a base lipidica ad essere introdotti in commercio (tabella 1). Entrambi i prodotti contengono doxorubicina ma le due formulazioni differenziano per la presenza o assenza di un rivestimento di PEG sulla superficie liposomiale. L’uso dei liposomi per la veicolazione di molecole antitumorali ha consentito di ridurre di effetti collaterali

sistemici, in molti casi tossici, ridurre la metabolizzazione e quindi l'escrezione dall'organismo ed un conseguente aumento dell'efficacia terapeutica.

Agente Attivo (nome prodotto)	Composizione	Stealth	Compagnia ed anno	Applicazione	Fase clinica
DaunoXome® (doxorubicina)	DSPC/CHOL	no	Naxstar Pharma. 1995	Sarcoma di Kapoli	Approvato
DOXIL®/Caelyx® (doxorubicina)	HSPC/CHOL/ DSPE-PEG	si	Sequus Pharma. 1997	Sarcoma di Kaposi	Approvato
Myocet®/Evacet® (doxorubicina)	EPC/CHOL	no	Elan Pharma, 2000	Cancro al seno metastatico	Approvato
SPI-077 (cisplatin)	HSPC/CHOL/ DSPE-PEG	si	Sequus Pharma.	Cancro alla testa, al collo ed al polmone	Phase I/II
Depocyt	DOPC/DPPG/ CHOL/triolein	no	Skye Pharma 1999	Meningita linfomatosa	Approvato
Ambisome® (amphotericin)	HSPC/DSPPC/ CHOL	no	Fujisawa USA Inc. Nexstar Pharm 1997	Infezioni funginee in pazienti immuno- compromessi	Approvato

Tabella 1. Formulazioni liposomiali approvate o in fase di approvazione

Un esempio è data dalla formulazione liposomiale Caelyx®. Questa formulazione riduce l'accumulo della doxorubicina nel cuore e nel sistema renale con un conseguente aumento della concentrazione di chemioterapico nelle massi tumorali (Berry *et al.*, 1998, e Safra, *et al.*, 2000). Questi vettori presentano sulla superficie delle membrane molecole di PEG che riducono il rapido riconoscimento da parte del sistema reticolo endoteliale, prolungandone il tempo di circolazione nel circolo sanguigno (Drummond *et al.*, 1999; Torchilin, 2005). Inoltre, i liposomi *stealth* possono essere ulteriormente migliorati tramite l'aggiunta di ligandi specifici sull'estremità libera del PEG (anticorpi monoclonali, peptidi specifici, etc), per veicolare le molecole in una determinata regione dell'organismo. L'interazione dei liposomi *stealth* con la superficie delle cellule ed il rilascio del farmaco nelle vicinanze delle cellule bersaglio sono tuttora sotto studio, ma recenti ricerche hanno dimostrato che l'uso del PEG potrebbe facilitare la penetrazione cellulare e/o la veicolazione intracellulare delle vescicole.

Stabilized Nano Lipid Particles per la veicolazione di oligonucleotidi (ON)

Negli ultimi anni un crescente interesse è stato dedicato allo sviluppo di terapie basate su acidi nucleici. Ciò è dovuto essenzialmente, alla scoperta ed alla comprensione, dei meccanismi d'azione di piccoli frammenti di oligonucleotidi (ON), in particolare RNA non codificanti, quali siRNA e microRNA (20-30 nucleotidi) coinvolte nella regolazione dell'espressione di proteine implicate in molte patologie.

L'utilizzo di queste macromolecole polianioniche, presentano non poche difficoltà, tra cui gli elevati costi di produzione per la sperimentazione clinica (Prazeres *et al.*, 1999), degradazione ed inattivazione da parte delle nucleasi presenti nel plasma e nelle cellule (Akhtar *et al.*, 1991), una scarsa penetrazione nelle cellule stesse (hope *et al.*, 1998; Rojanasakul *et al.*, 1996), una rapida eliminazione plasmatica (Agrawal e Zhang, 1997) nonché una tossicità renale ed emodinamica (Henry *et al.*, 1997). Tutto ciò ne limita fortemente l'impiego pre-clinico e clinico.

Una strategia per superare con successo alcune di queste problematiche, prevede l'introduzione di modifiche chimiche sullo scheletro zucchero-fosfato o sullo zucchero dell'acido nucleico (Klasa *et al.*, 2002). Ciò ha ridotto la sensibilità degli ON alla degradazione da parte delle nucleasi con un aumento della stabilità nel circolo ematico. Tuttavia, le modifiche chimiche apportate agli ON spesso riducono, se non aboliscono completamente, la capacità di interagire con le proteine *target* (RNasi H, DICER, complesso per il silenziamento indotto da RNA [RISC]), nonché un ulteriore aumento dei costi di produzione (De Rosa *et al.*, 2010; Semple *et al.*, 2001). Per superare tutte queste problematiche, una possibile soluzione è l'utilizzo di nanovettori a base lipidica per la veicolazione di ON. Ciò dovrebbe ridurre gli svantaggi legati alla natura polianionica degli ON e promuoverne i benefici, senza aver bisogno dell'introduzione di modifiche chimiche.

L'uso di sistemi di veicolazione è stato proposto come una strategia alternativa alla modifica chimica degli ON, sebbene frequentemente i due approcci possono anche essere combinati. Questi sistemi sono stati ampiamente usati per aumentare e migliorare l'efficacia terapeutica di un'ampia varietà di farmaci, modificando caratteristiche farmacocinetiche e la farmacodinamiche del farmaco da libero (12 e 14). Negli ultimi anni, considerevoli sforzi sono stati fatti nello sviluppo di nanovettori a base lipidica per

la veicolazione di DNA e RNA con lo scopo di ottenere migliorarne gli aspetti farmacocinetici e farmacodinamici (Hope *et al.*, 1998; Zelphati e Szoka, 1997; Smyth-Templeton *et al.*, 1997).

Tra i nanovettori a base lipidica più ampiamente studiati per la veicolazione di ON, troviamo i liposomi contenenti lipidi cationici. I lipidi cationici utilizzati per la trasfezione di ON, generalmente presentano due catene alifatiche o un'unità di colesterolo (porzione idrofobica) legata ad una porzione contenente una o più cariche positive. Una buona efficienza di trasfezione può essere raggiunta selezionando la lunghezza ed il tipo di catena idrofobica e il tipo di testa carica positivamente (Bennett *et al.*, 1998). I liposomi cationici interagiscono con le cariche negative dell'ON formando un complesso, chiamato anche lipoplex, capace di aumentare la potenza dell'ON di più di 1000 volte sulle culture cellulari (Bennett *et al.*, 1992). Quando complessato con i liposomi cationici, l'ON è completamente protetto dalla degradazione enzimatica (Capaccioli *et al.*, 1993). Inoltre, la presenza di cariche positive sulla superficie dei liposomi favorisce l'interazione con le membrane cellulari delle cellule (Miller *et al.*, 1998), mentre il lipoplex permea nella cellula mediante endocitosi mediata da clatrina. Zelphati e Szoka hanno dimostrato come l'ON fuoriesce dall'endosoma tramite la destabilizzazione della membrana dell'endosoma stesso con un meccanismo di "flip-flop", grazie al quale l'ON può diffondere nel citoplasma (Zelphati, Szoka *et al.*, 1996).

Le condizioni sperimentali in cui viene preparato il lipoplex, in particolare il mezzo d'incubazione utilizzato ed il rapporto tra le cariche +/-, possono essere controllate così da poter ottimizzare il processo di trasfezione (De Rosa *et al.*, 2008). Ma l'attività surfattante dei lipidi cationici e la loro interazione ionica con i componenti intracellulari, potrebbero giustificare la citotossicità di questi complessi. Il vantaggio dell'utilizzo dei lipoplex per la veicolazione di ON nelle cellule tumorali è stata dimostrata (Yoshizawa *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009), sebbene questo approccio risulta difficile da applicare nella sperimentazione clinica. Una volta entrati nel circolo sanguigno, i lipoplex si aggregano rapidamente accumulandosi inizialmente nei capillari polmonari e successivamente nelle cellule non parenchimali del fegato (Kawamura *et al.*, 1999). Inoltre, la somministrazione intravenosa di lipoplex non comporta un

incremento significativo dei livelli di ON nel tumore, probabilmente a causa della rapida rimozione del complesso dal circolo.

Un significativo contributo nel campo dei nanovettori a base lipidica è stato dato dallo sviluppo di *carrier* costituiti da lipidi ionizzabili contenenti ON. Questi nanovettori sono conosciuti come particelle lipidiche stabilizzanti gli antisenso (SALP) o particelle lipidiche stabilizzanti gli acidi nucleici (SNALP). La presenza di una lipide ionizzabile assicura un'elevata efficienza d'incapsulazione. Inoltre tutto il sistema può essere reso neutro ristabilendo il pH fisiologico alla sospensione (Semple *et al.*, 2001). Inoltre, gli SNALP possiedono una carica positiva minima nel sangue, mentre, una volta entrata nell'ambiente acido dell'endosoma la protonazione del lipide attiva la destabilizzazione della membrana del *carrier*. Il grado di saturazione, così come il tipo di legame tra la porzione lipofila e quella ionizzabile, possono influenzare significativamente il grado di transfezione *in vivo* (Semple *et al.*, 2010). Inoltre, l'utilizzo di lipidi legati al PEG assicurano un tempo di circolazione all'interno dell'organismo nettamente superiore rispetto ai lipoplex (Semple SC *et al.*. Biochim Biophys Acta 2001). Formulazioni SNALP ottimizzate, contenenti differenti tipi di siRNA, sono ben tollerati sia in non primati che in primati (Semple *et al.*, 2010). Questa tecnologia è stata utilizzata dall'Alnylam Pharmaceuticals, Inc. (Maryland, USA) per la veicolazione del siRNA (ALV-VSP) contro il recettore del VEGF e KSP, due proteine coinvolte nello sviluppo di patologie come il tumore al fegato. In studi pre-clinici, SNALP contenenti ALV-VSP, sono in grado di silenziare l'espressione di entrambi i geni nel tumore, ridurre la crescita ed il numero di masse tumorali con uno statisticamente significativo incremento della sopravvivenza degli animali. ALV-VSP è attualmente in fase I nei trial clinici per il trattamento del tumore al fegato.

NANOTECNOLOGIE PER LA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI SULLA CUTE

La cute rappresenta un'interessante via di somministrazione dei farmaci, alternativa a quella intravenosa. Essa sembrerebbe offrire notevoli vantaggi: livelli plasmatici di farmaco più stabili, il superamento del metabolismo di primo passaggio ed infine, una buona compliance (Williams, 2003).

Ma la barriera naturale che forma la pelle, crea molte problematiche alla permeazione dei farmaci (El Maghraby *et al.*, 2001b). Una soluzione a questo problema può essere l'utilizzo di vescicole a base lipidica per la veicolazione topica di farmaci.

Fin dalla prima pubblicazione, (Mezei e Gulasekharan, 1980), molte sono le controversie nei risultati ottenuti dai diversi gruppi di ricerca sull'effettiva capacità delle vescicole liposomiali, nella veicolazione dei farmaci attraverso la cute.

La composizione lipidica, il metodo di preparazione e lo stato termodinamico del *bilayer* dei liposomi influenzano in maniera significativa le caratteristiche di deposizione dei farmaci sulla cute (Bouwstra e Honeywell-Nguyen, 2002; El Maghraby *et al.*, 2006). Ad esempio, una riduzione del contenuto di colesterolo nel *bilayer* comporta un incremento della fluidità dello stesso ed un conseguente incremento della permeazione di farmaco attraverso lo strato corneo. Altre proprietà chimico-fisiche, come le dimensioni, la carica e la lamellarità delle vescicole, possono influenzare l'efficacia dei liposomi nella veicolazione nella cute (Yu e Liao, 1996; Katahira *et al.*, 1999; Ogiso *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Manosroi *et al.*, 2004; Choi e Maibach, 2005; Sinico *et al.*, 2005), anche se in misura minore e con molti risultati discordanti (Honeywell-Nguyen e Bouwstra, 2005).

Sebbene alcuni autori suggeriscono che i liposomi convenzionali sono *carrier* adatti alla veicolazione transdermica di alcuni farmaci (Yu e Liao, 1996; Deo *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004), recentemente è risultato evidente che, in molti casi, i classici liposomi non hanno una reale capacità di veicolare i farmaci negli strati più profondi della pelle, ma rimangono confinati nello strato più esterno.

Molti sono i meccanismi che potrebbero spiegare il passaggio dei liposomi attraverso la cute. Ad esempio, Mezei e Gulasekharan, (1980, 1982), trovarono che vescicole intatte e di grandi dimensioni, riuscivano a passare la pelle, fino ad arrivare al derma e non potendo entrare nei capillari, formassero un sistema di deposito di farmaco

sottocutaneo. Concettualmente, è difficile credere che vescicole lipidiche di grandi dimensioni possano penetrare nello strato corneo in numero elevato (El Maghraby *et al.*, 2006). Una spiegazione a questo fenomeno potrebbe essere la presenza di vescicole unilamellari nel derma e non multilamellari, inizialmente applicate sulla cute. Gli autori proposero che i liposomi potessero penetrare nell'epidermide perdendo i loro rivestimenti più esterni. Un secondo possibile meccanismo d'azione prevede un'attività tensioattiva degli stessi lipidi costituenti le vescicole, sulla cute. In pratica, essi potrebbero agire come promotori di assorbimento, allentando la struttura lipidica dello strato corneo, promovendo lo smottamento della pelle ed un conseguente passaggio dei farmaci (Kirjavainen *et al.*, 1999a). La maggior interazione tra i lipidi delle vescicole e quelli della pelle dipende fortemente dalla composizione lipidica dei liposomi (Kirjavainen *et al.*, 1996). Questo potrebbe spiegare l'osservazione che la veicolazione da parte dei liposomi costituiti da lipidi nel derma è molto più pronunciata rispetto alla veicolazione con vescicole costituite da fosfolipidi (Hofland *et al.*, 1995; Korting *et al.*, 1995; Zellmer *et al.*, 1995).

Molte ricerche hanno avuto come scopo quello di mettere a punto nuovi tipi di vettori per la somministrazioni cutanea di farmaci. Tra questi troviamo i liposomi ultraflessibili o Transfersom[®] (Cevc e Blume, 1992), vescicole lipidiche con un elevato grado di deformabilità. Molti studi hanno riportato che i liposomi ultraflessibili sono in grado di promuovere il passaggio dei farmaci sulla cute *in vitro* (El Maghraby *et al.*, 1999, 2001a; Trotta *et al.*, 2002, 2004, Boinpally *et al.*, 2003) e penetrare la pelle intatta *in vivo* trasportando elevate quantità di farmaco (Cevc e Blume 2001, 2003, 2004) con un'efficienza paragonabile ad un'iniezione sottocutanea (Cevc *et al.*, 1995, 1998, Paul *et al.*, 1995; Cevc, 2003).

Altri sistemi innovativi a base lipidica per la veicolazione di farmaci sulla cute sono gli etosomi. Gli etosomi sono stati sviluppati recentemente da Touitou e collaboratori ed hanno dimostrato un'elevata efficienza nella veicolazione attraverso la cute di farmaci di diversa natura (Touitou *et al.*, 1997, 2000a; Dayan e Touitou, 2000; Ainsbinder e Touitou 2005; Paolino *et al.*, 2005). Gli etosomi sono costituiti da fosfolipidi, etanolo ed acqua (Touitou *et al.*, 2000a). L'uso di alte concentrazioni di etanolo è stato descritto da Touitou e collaboratori per la prima volta nel 1997. A causa della forte interferenza dell'etanolo sulla membrana lipidica, è possibile che alte concentrazioni di etanolo

siano dannose per le formulazioni liposomiali. Ad ogni modo, sono state preparate e caratterizzate formulazioni liposomiali contenenti alte concentrazioni di etanolo (20-45%). Molti studi sono stati effettuati per valutare l'effetto dell'etanolo sulle caratteristiche fisico-chimiche delle vescicole (Dayan e Touitou, 2000; Touitou *et al.*, 2000a; Lopez-Pinto *et al.*, 2005; Elsayed *et al.*, 2007). Un'importante caratteristica degli etosomi riguarda le loro dimensioni molto più piccole rispetto ai liposomi convenzionali, a parità di preparazione prima della fase di dimensionamento (Dayan e Touitou, 2000). Ciò potrebbe essere dovuto all'incorporazione di elevate concentrazioni di etanolo. L'etanolo, infatti, conferisce una carica negativa netta alla superficie dei liposomi che causa la riduzione delle dimensioni delle vescicole (Touitou *et al.*, 2000a; Lopez-Pinto *et al.*, 2005). E' stata inoltre, valutata l'influenza della concentrazione fosfolipidica (Touitou *et al.*, 2000a; Elsayed *et al.*, 2007). Gli etosomi hanno dimostrato di possedere un'elevata efficienza d'incapsulazione per un'ampia varietà di molecole, incluse quelle lipofile. Questo potrebbe essere spiegato dalla multilamellarità delle vescicole liposomiali (Touitou *et al.*, 2000a), come dalla presenza di etanolo negli etosomi il quale aumenterebbe la solubilità di molti farmaci.

E' stato riportato che gli etosomi siano in grado di veicolare molecole sulla e nella cute, sino al sistema circolatorio. Un aumento della veicolazione di molecole da parte degli etosomi è stato osservato in esperimenti di permeazione con sonde fluorescenti (Dayan e Touitou, 2000). In questo studio, le immagini ottenute mostrano che i classici liposomi non consentono la permeazione della sonda nella cute, ma è possibile osservare un piccolo *reservoir* fluorescente sugli strati più superficiali della pelle. Usando una soluzione idroetanolica, è possibile osservare un piccolo incremento della penetrazione da parte della sonda, ma con un'intensità di fluorescenza molto bassa. L'uso di sistemi etosomiali consente di incrementare sia la profondità della penetrazione che l'intensità della fluorescenza. Se quindi, l'intensità della fluorescenza può essere correlata come la quantità di farmaco permeata nella pelle, il deposito di sonda nella pelle da parte degli etosomi è stata di circa 18 volte superiore rispetto ai liposomi convenzionali. Risultati simili sono stati ottenuti tramite l'utilizzo di sonde fluorescenti lipofile come la rodamina red (Touitou *et al.*, 2000a).

Gli etosomi hanno dimostrato sia *in vitro* che *in vivo*, di veicolare farmaci di diversa natura. Diversamente dai liposomi deformabili, gli etosomi sono in grado di

promuovere la veicolazione dei farmaci sia in condizioni occlusive che non (Dayan e Touitou, 2000; Ainbinder e Touitou, 2005; Lopez-Pinto *et al.*, 2005; Paolino *et al.*, 2005; Elsayed *et al.*, 2007). L'efficacia dell'etanolo nel potenziare la permeazione di molecole è ben noto, ma studi preliminari condotti confrontando la permeazione di farmaci in soluzioni idroalcoliche o veicolati tramite gli etosomi, hanno dimostrato che l'aumento di permeazione ottenuta grazie all'uso degli etosomi è nettamente superiore rispetto all'uso del solo etanolo. E' stato suggerito un effetto sinergico tra l'etanolo, le vescicole ed i lipidi della pelle (Touitou *et al.*, 2000a). Tuttavia, la letteratura è carente di uno studio comparativo riguardante la veicolazione sulla cute tra etosomi e i liposomi convenzionali con soluzioni idroetanoliche.

I possibili meccanismi di penetrazione degli etosomi sono stati suggeriti da Touitou e collaboratori (2000a). Gli etosomi, infatti, favorirebbero la penetrazione dei farmaci attraverso la cute in diversi modi possibili. Ad esempio, la membrana multilamellare dello strato corneo, a temperatura fisiologica, è densamente impacchettata ed altamente ordinata. L'etanolo interagisce con le regioni polari delle molecole lipidiche aumentandone la fluidità. Ciò comporta un aumento della permeabilità della membrana. L'etanolo potrebbe anche fornire le vescicole di una maggior fluidità, tale da consentire loro di passare attraverso gli interstizi dello strato corneo una maggior facilità. Il rilascio di farmaci negli strati più profondi della pelle ed il loro adsorbimento trasdermico potrebbe essere il risultato della fusione delle vescicole degli etosomi con i lipidi della pelle. In studi recenti è stato dimostrato che gli etosomi contenenti ketotifene, potenziano significativamente la permeazione attraverso la cute rispetto al ketotifene da solo (Elsayed *et al.*, 2006). In conclusione, è possibile dire che l'effetto dell'etanolo sui lipidi dello strato corneo e sulla fluidità delle vescicole, come sulla interazione dinamica tra gli etosomi e lo strato corneo, potrebbe contribuire ad un maggior potenziamento delle proprietà di veicolazione delle vescicole.

SCOPO DEL LAVORO

Durante il corso di dottorato, l'attività di ricerca si è focalizzata sulla comprensione di quei parametri sperimentali in grado di influenzare le caratteristiche tecnologiche, nonché il comportamento in ambiente biologico, di nanovettori a base lipidica. Tra i diversi nanovettori sviluppati a scopo terapeutico, quelli basati su materiali lipidici hanno riscosso fino ad ora i maggiori successi in virtù della biocompatibilità dei materiali utilizzati, della semplicità di preparazione, dei costi contenuti e soprattutto della versatilità d'impiego. Tali vettori, tuttavia, hanno peculiarità che dipendono dal tipo di farmaco da veicolare, dalla via di somministrazione, nonché dai requisiti terapeutici richiesti (rilascio prolungato, direzionamento nei confronti di tessuti specifici, ecc.). L'attività di ricerca è stata articolata su due principali filoni di ricerca aventi come oggetto nanosistemi destinati alla somministrazione di farmaci per via endovenosa o topica.

Nell'ambito dei sistemi destinati alla somministrazione sistemica, lo studio è stato incentrato sullo sviluppo di un sistema di veicolazione in grado di veicolare il resveratrolo in tumori solidi. A tale scopo, il resveratrolo, molecola di origine naturale con interessanti proprietà preventive e terapeutiche, sarà caricato in liposomi di tipo *stealth*. In particolare, sono state ricercate le condizioni sperimentali per preparare liposomi con alte efficienze d'incapsulazione e stabili nel tempo. Per soddisfare quest'ultimo requisito, è stata presa in considerazione anche la possibilità di liofilizzare le formulazioni, con l'aggiunta di un crioprotettore. Infine, i liposomi ottenuti saranno saggiati su diverse linee cellulari tumorali in collaborazione con il Dipartimento di Biochimica e Biofisica della Seconda Università degli Studi di Napoli. Sempre nell'ambito di sistemi destinati alla somministrazione endovenosa, sono stati sviluppati sistemi per la veicolazione di oligonucleotidi di diversa natura. In particolare sono stati sviluppati nanovettori detti SNALPs (*stable nucleic acid lipid particles*) nei quali saranno caricati diversi oligonucleotidi a RNA (siRNA o miRNA) con potenziale attività antitumorale. L'attività di ricerca prevederà la ricerca delle condizioni sperimentale per l'ottimizzazione dei tassi d'incapsulazione. In particolare, parametro fondamentale è stato la ricerca del rapporto ottimale tra il lipide cationico/oligonucleotide. Tale rapporto dipende da diversi parametri relativi allo stesso

oligonucleotide, quali la lunghezza del filamento di RNA, la presenza di un doppio filamento, la natura chimica (wild type o O-metilato). Una volta ottimizzate, le diverse formulazioni sono state saggiate su diverse linee cellulari, in collaborazione con diversi gruppi di ricerca di diversi atenei italiani.

Nell'ambito dei sistemi destinati alla via topica, sono stati sviluppati due diversi tipi di nanovettori: i transferosomi e gli etosomi, i primi caratterizzati dalla presenza di un attivatore di membrana (generalmente un tensioattivo), i secondi dalla presenza di etanolo nella cavità acquosa interna. Sono stati quindi preparati transferosomi con tre diversi attivatori di membrana, quali polisorbato 80, sodio colato e sodio deossicolato e etosomi a diversa composizione lipidica. Come farmaco modello è stato scelto il resveratrolo. Nello sviluppo della formulazione sono state prese in considerazione diverse caratteristiche dei nanovettori, quali caratteristiche dimensionali, efficienza d'incapsulazione, rilascio di farmaco o aggregazione delle vescicole durante la conservazione a 4°C. In collaborazione con il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, sono stati valutati vitalità cellulare e capacità di inibire la produzione di specie radicali dell'ossigeno dei diversi vettori. Inoltre, sono stati effettuati studi di permeazione *ex vivo* su pelle di maiale per valutare la permeazione di resveratrolo attraverso la pelle.

**NANOSISTEMI DESTINATI ALLA SOMMINISTRAZIONE
DI FARMACI PER VIA PARENTERALE**

**SVILUPPO DI LIPOSOMI *STEALTH* PER LA VEICOLAZIONE DEL
RESVERATROLO IN TUMORI SOLIDI**

INTRODUZIONE

Il resveratrolo (3,5,4' trihydroidrossystilbene) è un polifenolo non flavonoide di origine naturale presente in diverse specie vegetali. Esso è presente in modo particolare nelle bucce degli acini della più comune vite rossa (*Vitis vinifera*), ed esiste in due isoforme: il *trans*- ed il *cis*-resveratrolo. Il vino, in particolare il vino rosso, rappresenta la principale fonte alimentare di resveratrolo.

La struttura del resveratrolo è di tipo stilbenico, con uno scheletro composto da due anelli aromatici, uniti da un ponte etilenico, su cui si innestano tre gruppi ossidrilici in posizione 3, 4', 5. La determinazione della configurazione *cis* e *trans* è stata ben caratterizzata mediante l'analisi HPLC (High Performance Liquid Chromatography) di plasma di topo (Chen *et al.*, 2007). Tali molecole, prodotte grazie all'enzima stilbene sintetasi rappresentano uno strumento di difesa della pianta nei confronti di condizioni di stress (agenti patogeni, radiazioni UV, sollecitazioni meccaniche). Grazie alla presenza dei gruppi ossidrilici, il resveratrolo è in grado di formare un derivato radicalico stabilizzato dalla delocalizzazione elettronica sui due anelli aromatici e sul ponte etilenico, ottenendo così le proprietà antiossidanti tipiche dei polifenoli. Sebbene nei prodotti naturali siano presenti entrambe le forme, solo l'isomero *trans* sembra essere responsabile dei suoi numerosi effetti benefici (Orallo, 2006).

Negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta agli effetti biologici degli stilbeni, e del resveratrolo in particolare, sulla salute umana. Numerosi esperimenti, *in vitro*, *ex vivo* e su animali, hanno dimostrato il potere benefico del resveratrolo (Langcake e Pryce, 1976); recentemente sono state avviate anche sperimentazioni cliniche sull'uomo. Questa molecola possiede proprietà antiossidanti tali da poter prevenire l'insorgenza di malattie cardiovascolari, come l'arteriosclerosi, modulando il metabolismo dei lipidi. Inoltre è stato dimostrato che il resveratrolo agisce come agente chemopreventivo nei confronti di diversi tipi di cancro già a basse concentrazioni (< 1M in animali), interferendo con le fasi di inizio, progressione e promozione del tumore, e sopprimendo gli eventi finali della carcinogenesi, come l'angiogenesi e la formazione di metastasi (Soleas *et al.*, 2002).

Recentemente sono stati parzialmente chiariti i meccanismi molecolari d'azione del resveratrolo. Non è ancora chiaro se tutto ciò sia valido per entrambi gli isomeri

(*trans* e *cis*) del resveratrolo. La letteratura, infatti, è contraddittoria a proposito della loro possibile differenza di biodisponibilità ed effetti, e se le forme *trans* e *cis* attuino gli stessi meccanismi d'azione e se siano parimenti efficaci. Entrambe mostrano una tipica attività antiossidante a concentrazioni micromolari, ma in alcuni casi il *cis*-resveratrolo sembra essere, secondo alcuni autori, un po' meno efficiente del *trans* (Orallo, 2006; Frémont, 2002). La differenza, se c'è, sembra essere più di tipo quantitativo che qualitativo: la conformazione spaziale non influirebbe sull'interazione coi potenziali target cellulari (Orallo, 2006).

Attività antiproliferativa ed antitumorale del resveratrolo.

I dati presenti in letteratura sulla capacità del resveratrolo di proteggere nei confronti del danno indotto al DNA sono contrastanti. Infatti è stato dimostrato che il resveratrolo può promuovere il danno al DNA in presenza di ioni rame (Fukuhara e Miyata, 1997) fungendo da agente riducente, quando però sono presenti acido ascorbico o glutazione esso perde questa proprietà e si comporta come un antiossidante. Nella via dell'ascorbato, il resveratrolo non ha alcun effetto sulla formazione dei radicali idrossilici ma protegge il DNA agendo da "scavenger". Nella via del glutatione invece inibisce la formazione dei radicali idrossilici con un meccanismo che determina l'inibizione della formazione degli omodimeri di glutatione (GSSG) (Burkitt, *et al.*, 2000).

Ulteriori studi sono stati fatti da Sgambato (Sgambato *et al.*, 2001), il quale ha dimostrato che trattando fibroblasti normali di topo con resveratrolo 30 e 90 μM per 24 ore e H_2O_2 100-200 μM per 15-45 minuti si ha una diminuzione del livello di ossidazione intracellulare (test della diclorofluoresceina). E' stata inoltre valutata l'azione del resveratrolo esercitata su cellule trattate con il condensato del fumo di sigaretta (TAR). Anche in questo caso si è rilevata una diminuzione nella produzione di ROS ed una diminuzione del *single strand breaks* valutata con il Comet test. Anche in condizioni patologiche (*in vivo*) il resveratrolo mostra un effetto protettivo nei confronti del danno ossidativo. Ratti giovani (5 settimane) di entrambe i sessi ipertensivi (Mizutani *et al.*, 2001) sono stati divisi in due gruppi: un gruppo è stato mantenuto come controllo mentre il secondo gruppo è stato trattato per 8 settimane con 1 mg/Kg di resveratrolo al giorno. Terminato il periodo di trattamento è stato effettuato un dosaggio

di 8-idrossideossiguanosina (8-OH-dG) nelle urine tramite ELISA, il quale ha dimostrato una significativa diminuzione dei livelli della base ossidata negli animali trattati rispetto ai controlli.

L'alterazione della proliferazione cellulare è alla base di molte patologie tra cui aterosclerosi e tumore e l'effetto antiproliferativo del resveratrolo è stato studiato sia su linee cellulari normali che tumorali.

La proliferazione di cellule muscolari lisce (SMC) aortiche di vitello indotta da mitogeni quali siero, endotelina e PDGF, è risultata ridotta in maniera dose-dipendente in seguito all'aggiunta di resveratrolo 50-100 μM . L'analisi in citometria a flusso delle cellule trattate ha rivelato che l'arresto della proliferazione è dovuto ad un blocco delle cellule nella transizione G1/S del ciclo cellulare in assenza di apoptosi (Zou *et al.*, 1999).

Anche su cellule tumorali il resveratrolo induce un rallentamento della proliferazione cellulare (Hsieh *et al.*, 1999a; Hsieh *et al.*, 1999b). Nel 1998 Mgbonyebi (1998) ha esaminato l'effetto del resveratrolo sulla capacità proliferante di cellule tumorali in coltura di epitelio mammario umano. Le linee cellulari sono state trattate con resveratrolo alle concentrazioni di 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ e l'attività proliferativa è stata determinata in un *range* di tempo, da 24 a 144 ore. I risultati ottenuti hanno dimostrato che questa fitoalessina inibisce la proliferazione in modo dose e tempo dipendente e che l'effetto antiproliferativo è indipendente dallo stato del recettore estrogenico. Questo composto rappresenta quindi un potenziale chemopreventivo per entrambe i tumori della mammella: ormone responsivo e non-responsivo (Mgbonyebi *et al.*, 1998).

In cellule di carcinoma epidermoide umano (A431) trattate con resveratrolo alle concentrazioni da 1 a 50 μM per 24 ore, si è rilevata una inibizione dose dipendente della crescita cellulare, un blocco del ciclo in fase G1 ed un'induzione apoptotica. Nelle cellule trattate è stata trovata una aumentata espressione di WAF1/p21, una diminuzione di espressione delle cicline D1-D2-E e delle chinasi cdk2-cdk4-cdk6. L'induzione di WAF/p21 (causata dal resveratrolo) inibisce l'assemblaggio dei complessi ciclina-chinasi arrestando il ciclo in G1/S. Questo blocco è irreversibile e determina l'apoptosi delle cellule cancerose (Ahmad *et al.*, 2001).

Una riduzione della massa tumorale è stata rilevata da Kimura utilizzando come modello sperimentale topi con carcinoma solido, indotto dopo iniezione sottocutanea di cellule LLC (Lewis Lung Carcinoma, cellule di carcinoma polmonare di Lewis). I risultati ottenuti hanno dimostrato che in topi trattati con resveratrolo somministrato alla dose di 2,5 e 10 mg/ml vi era una diminuzione della massa tumorale del 42%, una riduzione del peso del 44% ed una riduzione della presenza di metastasi al polmone del 56% (Ghem *et al.*, 1997). Anche Brakenhielm e collaboratori, utilizzando topi con fibrosarcoma indotto T241 hanno osservato una riduzione della massa tumorale dopo somministrazione orale di 5.7 µg/ml di resveratrolo (Brakenhielm *et al.*, 2001).

Diversi studi evidenziano l'effetto diretto che il resveratrolo ha nell'inibire l'angiogenesi in modelli animali (Cao *et al.*, 2002). Brakenhielm esaminando le proprietà antiangiogenetiche del composto ha osservato che esso blocca la crescita delle cellule endoteliali di capillari di bovino (BCE) preventivamente stimulate con il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-2) in maniera dose-dipendente. La MAP chinasi è un componente fondamentale nella trasduzione del segnale proliferativo e sembra essere uno dei bersagli del resveratrolo.

Biodisponibilità del resveratrolo

Le notizie più significative riguardanti l'assorbimento e il metabolismo arrivano dai risultati ottenuti da Bertelli il quale dimostrò *in vivo* che il resveratrolo presente nel vino rosso, dopo somministrazione orale in ratti (con dosi acute di 26 µg o una somministrazione giornaliera di 13 µg per due settimane), viene assorbito, entra velocemente nel circolo sanguigno e risulta presente in concentrazioni significative in diversi organi (Bertelli *et al.*, 1996). Gli stessi autori, in uno studio successivo (Bertelli *et al.*, 1998), somministrando il resveratrolo a ratti per os (28 µg/ratto) studiarono la cinetica di assorbimento, la presenza nel plasma e in diversi organi. Il contenuto di resveratrolo è stato quantificato mediante HPLC nel cuore, nel fegato e nei reni. Le concentrazioni del composto stilbenico nei tessuti si sono rivelate maggiori o simili a quelle riscontrate nel plasma (1ng/ml nel siero e 1ng/g nel tessuto). Risultati analoghi sull'assorbimento in animali da laboratorio, sono stati ottenuti da Juan e collaboratori: ratti trattati con trans-resveratrolo hanno mostrato una concentrazione nel plasma pari a 0,175 mg/l dopo 15 minuti dalla somministrazione (Juan *et al.*, 1999). In un recente

lavoro Yu e collaboratori (2002) hanno studiato il metabolismo del resveratrolo in modelli sperimentali *in vitro* (microsomi ed epatociti di fegato umano, epatociti di ratto) e *in vivo*. Gli autori tramite tecniche cromatografiche (HPLC) e spettrometria di massa sono riusciti ad identificare il resveratrolo ed i suoi metaboliti dopo trattamento con il composto per tempi compresi tra 30 minuti e 4 ore. In particolare, non sono stati osservati metaboliti del resveratrolo né prodotti di ossido-riduzione e idrolisi nei microsomi umani dopo incubazione di un'ora. Sono stati invece osservate elevate quantità di resveratrolo-3-O-glucuronide e resveratrolo-3- solfato in urine di ratto, siero di topo e dopo incubazione con epatociti sia umani che di ratto. In entrambe i modelli l'isomero *cis* è stato trovato solo in tracce, ad indicare che il processo di isomerizzazione non è un meccanismo di rilievo per il metabolismo e l'eliminazione del resveratrolo. Fino ad oggi però, non sono disponibili dati circa l'assorbimento ed il metabolismo del resveratrolo nell'uomo.

SCOPO DEL LAVORO

Il trattamento farmacologico di neoplasie maligne è ancora basato, almeno nella maggior parte dei casi, sull'impiego di farmaci citotossici, la cui azione mira al danneggiamento del corredo genetico della cellula o all'inibizione di processi di duplicazione cellulare; ciò comporta un'azione aspecifica, inducendo la morte di cellule tumorali ma anche di quelle sane che sono in fase di replicazione. La mancanza di specificità d'azione dei chemioterapici è alla base dell'elevata tossicità che fa seguito alla loro somministrazione e gli effetti collaterali non sempre sono controbilanciati da una soddisfacente remissione della patologia neoplastica, soprattutto nei tumori solidi in fase avanzata. A tali problematiche si associa un altro limite alla chemioterapia tradizionale, rappresentato dal possibile sviluppo della “*multi drug resistance (MDR)*” (Venkatraman *et al.*, 2010).

Questo lavoro è stato incentrato sullo sviluppo di nanovettori a base lipidica per un nuovo approccio nella terapia antitumorale a base di *trans*-resveratrolo. In particolare sono stati sviluppati liposomi *stealth* contenenti *trans*-resveratrolo destinati alla somministrazione per via endovenosa. Questi *carrier* sono stati sviluppati con caratteristiche tecnologiche in grado di prolungarne la circolazione nel circolo ematico (liposomi *stealth*), aumentando le probabilità di accumulo di resveratrolo nelle masse tumorali. Nello fase di sviluppo del nanovettore, le condizioni sperimentali sono state ottimizzate al fine di ottenere un alto contenuto di *trans*-resveratrolo incapsulato, un ridotto rilascio del principio attivo prima della somministrazione ed una stabilità fisica dei vettori durante la conservazione (ricerca delle condizioni migliori per la liofilizzazione della formulazione).

Materiali

Il *trans*-resveratrolo (*t-res*), il colesterolo (chol), il ferro tiocianato (FeSCN₃), il trealosio ed il lattosio sono stati forniti da Sigma (USA); il metanolo (grado HPLC), l'etanolo e il cloroformio (CHCl₃), sono stati acquistati presso Carlo Erba Reagenti (Italia); la fosfatidilcolina di soia (SPC) e il distearoyl-phosphoethanolamine-polyethylene glycol-2000 (DSPE-PEG), sono stati gentilmente offerti da Lipoid GmbH (Svizzera).

Preparazione dei liposomi *stealth*

I liposomi *stealth* sono stati preparati mediante la tecnica dell'idratazione del film lipidico. Tutte le miscele lipidiche sono costituite da: SPC (9,5 mg/ml), chol (3 mg/ml) e DSPE-PEG (3 mg/ml), sciolti in una miscela formata da cloroformio (CHCl₃) e metanolo (MeOH) in rapporto 2:1 v/v. Le soluzioni ottenute sono state poste in un pallone di vetro, a cui è stata aggiunta la soluzione di *t-res* avente concentrazione di 0,1 mg/ml, 1 mg/ml o 5 mg/ml. Il solvente contenuto nel pallone è stato fatto evaporare attraverso l'utilizzo di un evaporatore rotante in atmosfera di azoto per circa 15 minuti (Laborota 4.010 digitale, Heidolph, Schwabach, Germania). L'evaporazione del solvente organico ha condotto alla formazione di un film lipidico costituito che è stato reidratato con una soluzione di tampone fosfato (PBS) avente pH 7,4. La dispersione così ottenuta è stata posta sotto agitazione in presenza di biglie di vetro per facilitare il distacco del film dal fondo del pallone.

Successivamente le preparazioni sono state sottoposte a un processo di estrusione per ridurre le dimensioni della sospensione liposomiale, mediante l'utilizzo di un estrusore termostato (Northern Lipidi Inc., Canada), a 65°C. La sospensione è stata fatta passare 5 volte su membrane di policarbonato a porosità decrescente (0,4; 0,2; 0,1 µm). La formulazione è stata quindi purificata attraverso cromatografia ad esclusione molecolare Sephadex G-50-50 in PBS pH 7,4. Questa procedura consente di allontanare il *t-res* non incapsulato all'interno dei liposomi. Ogni preparazione è stata prodotta in triplice copia.

Caratterizzazione dei liposomi *stealth*

Il diametro medio dei liposomi *stealth* è stato valutato sia subito dopo preparazione che dopo conservazione a 4°C attraverso l'utilizzo della spettroscopia a correlazione fotonica (PCS) (N5, Beckman Coulter, Miami, USA). Ogni campione è stato diluito in acqua distillata e filtrata (0,22µm, filtri in policarbonato, MF-Millipore, Microglass Heim, Italia) ed analizzata con un angolo di 90°. Per la misurazione della distribuzione dimensionale è stato utilizzato l'indice di polidispersità (IP). Il diametro medio e la distribuzione dimensionale di ciascuna formulazione sono stati calcolati con la media delle misure ottenute da 3 lotti della stessa formulazione (n=3).

Incapsulazione e stabilità del *t-res* nei liposomi *stealth*

Il dosaggio del *t-res* contenuto all'interno dei liposomi *stealth* è stato ottenuto mediante cromatografia liquida a fase inversa ad alte prestazioni (RP-HPLC). E' stato utilizzato un sistema HPLC Shimadzu (Giappone) costituito da una pompa LC-10AD, una valvola d'iniezione Rheodyne, 7725i, un rivelatore UV-VIS SPV-10A (Shimadzu) settato alla lunghezza d'onda di 303nm. Il sistema è stato collegato ad un controller SCL-10A VP System (Shimadzu) connesso ad un computer. I cromatogrammi sono stati acquisiti ed analizzati da un programma Class VP Client/Server 7.2.1(Shimadzu). L'analisi quantitativa del *t-res* è stata eseguita utilizzando una colonna Luna 5 µm C₁₈ (250 X 4,60 mm, 110 Å, Phenomenex, Klwid, USA) equipaggiata con un security guard. E' stata scelta una fase mobile costituita dalla miscela 50:50 (v/v) acqua e metanolo contenente lo 0,5% v/v di acido acetico. L'analisi del *t-res* è stata eseguita in condizione isocratica con un flusso della fase mobile di 1 ml/min e a temperatura ambiente. Il *cis-resveratolo* è stato ottenuto mediante esposizione alla luce solare del *t-res*, come riportato in letteratura. L'analisi HPLC è stata usata per investigare la conversione del *trans-resveratolo* nella sua forma *cis*. Il *cis-resveratolo* è stato ottenuto mediante esposizione alla luce solare del *t-res* (Fan, *et al.*, 2008). Brevemente, una soluzione di *t-res* è stata esposta alla luce solare per 5 giorni a temperatura ambiente. L'analisi HPLC della soluzione ottenuta ha mostrato due picchi cromatografici: in accordo con la letteratura, uno è stato attribuito al *t-res* e l'altro, col tempo di ritenzione più alto, è stato attribuito all'isomero *cis* del resveratolo.

Per determinare la quantità di *t-res* incapsulata, 100 µl della sospensione di liposomi *stealth* sono stati aggiunti a 900 µl di metanolo; la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 30 minuti ed il supernatante è stato analizzato all'RP-HPLC. L'analisi del *t-res* incapsulato nei liposomi *stealth* è stata eseguita sia subito dopo preparazione che dopo conservazione a 4°C. Per ogni preparazione, l'incapsulazione del *t-res* è stata ottenuta come la media di tre misurazioni. Per ogni formulazione l'incapsulazione del *t-res* è stata ottenuta come la media di tre differenti preparazioni (n=3). La quantità di *t-res* incapsulata all'interno dei *carrier* è stata espressa come *t-res* actual loading ed efficienza d'incapsulazione, calcolate come µg di *t-res*/mg di SPC e rapporto tra *t-res* realmente incapsulato nei liposomi *stealth* ed *t-res* teoricamente incapsulato, rispettivamente.

La quantità di fosfolipidi contenuti all'interno della sospensione è stata determinata tramite il saggio di Stewart. Brevemente, un'aliquota della sospensione liposomiale è stata aggiunta ad un sistema bifasico costituito da una soluzione acquosa di ferrotiocianato d'ammonio (0,1N) e cloroformio. La concentrazione di SPC è stata ottenuta mediante la misurazione dell'assorbanza a 485 nm della fase organica. L'analisi è stata ripetuta dopo 7, 30 e 60 giorni dalla preparazione e per ciascun lotto il dosaggio dei lipidi è stato calcolato dalla media di due misurazioni.

Liofilizzazione dei liposomi

Sono state effettuate prove di liofilizzazione sulle preparazioni contenenti 5 mg/ml di *t-res* iniziale in assenza e presenza di agenti crioprotettori: trealosio e lattosio. In questo studio sono state valutate due concentrazioni differenti di crioprotettori: in un primo caso, si è tenuto conto del rapporto 1:5 (p/p) tra la quantità di lipidi (mg) ed il crioprotettore (mg) presenti nella preparazione; in un secondo caso invece, un rapporto 1:10 (p/p). In breve, una sospensione liposomiale (mg/ml) è stata aggiunta ad una soluzione acquosa di trealosio o lattosio in rapporto 1:5 (p/p) o 1:10 (p/p) ed è stata congelata a -196°C per immersione dei campioni in azoto liquido. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad un ciclo di liofilizzazione di circa 24 ore (Edwards Modulyo, American Lyophilizer, USA). In seguito, le formulazioni sono state risospese in un volume appropriato di acqua distillata e sottoposte ad analisi. In particolare, su tutte le formulazioni è stata effettuata analisi del diametro medio, IP e dosaggio del *t-*

res incapsulato dopo il processo di liofilizzazione.

Colture cellulari e saggi di proliferazione

Il sistema sperimentale utilizzato per il test ha previsto l'utilizzo di tre linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico: BxPC3, MiaPaca e Panc-1. Le cellule di tipo BxPC3, come anche quelle di tipo Panc-1, crescono nel terreno di coltura RPMI 1640 contenente 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco) inattivato al calore, 100 unità/ml di penicillina/streptomicina (ICN) e glutamina 2 mM. La linea cellulare MiaPaca cresce in terreno di coltura di tipo DMEM addizionato con 10 % di FBS, 1% di streptomicina e penicillina HEPES 20 mM.

Le cellule MDA-MB-436 di carcinoma mammario, che esprimono stabilmente una proteina fluorescente verde (EGFP), crescono in terreno DMEM integrato con 4,5 ml/L di glucosio, l-glucosamina, piruvato e 10% di siero fetale di bovino (Invitrogen-Life Technologies). Tutti i tipi di cellule sono state esposte in un'atmosfera umidificata composta dal 95% di aria e 5% di CO₂ a 37°C. I test di vitalità cellulare sono stati condotti mediante saggi MTT. Terminato il periodo d'incubazione delle cellule con i diversi trattamenti previsti, il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) è stato aggiunto a tutti i 96 pozzetti in concentrazione del 10%. Dopo un periodo d'incubazione minimo di 4h, la soluzione terreno/MTT è stata aspirata e i sali di formazano formatisi sono stati solubilizzati con una soluzione di isopropanolo/HCl 0,1N per 20 minuti in agitazione costante. Infine, è stata eseguita la misura dell'assorbanza della soluzione presente rispettivamente in ogni pozzetto della piastra, attraverso l'utilizzo di un lettore ELISA (Biorad 550). Le letture di assorbanza sono state eseguite in doppia lunghezza d'onda (570 nm-655 nm) e il calcolo della percentuale di inibizione sulla crescita cellulare è stato effettuato come rapporto tra la differenza di assorbanza, calcolata tra il controllo non trattato e ogni campione trattato, e l'assorbanza del controllo non trattato.

Caratteristiche dei liposomi *stealth* contenenti *t-res*

Sono state preparate formulazioni di liposomi *stealth* contenenti concentrazioni crescenti di *t-res*. In tabella 2 sono state riportate la composizione lipidica delle formulazioni e la concentrazione iniziale di *t-res*. Le formulazioni sono state caratterizzate in termini di dimensioni, distribuzione dimensionale ed incapsulazione di *t-res* sia subito dopo preparazione che dopo conservazione a 4°C. I risultati sono riportati in tabella 3. Le formulazioni Lipo A, Lipo B e Lipo C presentano un diametro medio subito dopo preparazione di 131, 118 e 113 nm rispettivamente.

Formulazione	Composizione lipidica	mg/ml iniziali <i>t-res</i>
Lipo A	SPC/DSPE-PEG/chol	0,1
Lipo B	SPC/DSPE-PEG/chol	1
Lipo C	SPC/DSPE-PEG/chol	5

Tabella 2. Composizione lipidica e contenuto di *t-res* iniziale nelle formulazioni preparate.

La concentrazione crescente di *t-res* iniziale non influenza in maniera significativa il diametro medio delle formulazioni, nè tantomeno la distribuzione dimensionale (IP) che risulta essere di 0,08, 0,10 e 0,13 per le formulazioni Lipo A, Lipo B e Lipo C, rispettivamente. Dopo i primi 7 giorni di conservazione a 4°C, non si osservano significative variazioni del diametro medio per tutte le formulazioni, mentre dopo 60 giorni, si osserva un incremento del diametro medio delle formulazioni Lipo B e Lipo C che risulta essere di 140 e 144 nm, rispettivamente. Per tutte le formulazioni, l'IP non presenta variazioni significative dopo 60 giorni di conservazione (0,1, 0,13 e 0,18, rispettivamente).

Formulazione	Tempo (Giorni)			
	Dopo preparazione		7	
	Diametro medio (nm ± S.D.)	P.I. ± S.D.	Diametro medio (nm ± S.D.)	P.I. ± S.D.
Lipo A	131,00 ± 6,91	0,10 ± 0,02	132,17 ± 5,80	0,10 ± 0,07
Lipo B	118,20 ± 10,75	0,08 ± 0	117,10 ± 9,47	0,11 ± 0,08
Lipo C	113,10 ± 34,65	0,13 ± 0,05	113,65 ± 37,55	0,13 ± 0,03

Tabella 3. Diametro medio (nm) ed indice di polidispersità (IP) delle formulazioni Lipo A, Lipo B e Lipo C contenenti *t-res*, subito dopo preparazione e dopo 7 giorni di conservazione a 4°C.

Formulazione	Tempo (Giorni)			
	30		60	
	Diametro medio (nm ± S.D.)	P.I. ± S.D.	Diametro medio (nm ± S.D.)	P.I. ± S.D.
Lipo A	143,57 ± 22,29	0,10 ± 0,06	144,33 ± 22,41	0,11 ± 0,02
Lipo B	120,20 ± 10,32	0,10 ± 0,01	140,40 ± 9,90	0,13 ± 0,02
Lipo C	114,75 ± 34,72	0,05 ± 0,04	144,00 ± 8,91	0,18 ± 0

Tabella 4. Diametro medio (nm) ed indice di polidispersità (IP) delle formulazioni Lipo A, Lipo B e Lipo C contenenti *t-res*, dopo 30 e 60 giorni di conservazione a 4°C.

Incapsulazione del *t-res* nei liposomi *stealth*

L'analisi della stabilità del *t-res* è stata effettuata mediante cromatografia a fase inversa. L'incapsulazione del *t-res* all'interno delle differenti formulazioni è riportata in tabella 5. Anche in questo caso non è stato osservato picco con tempo di ritenzione superiore a 5 minuti (assenza di *cis-res*). La formulazione Lipo C, preparata con la più alta concentrazione iniziale di *t-res*, ha mostrato la più alta incapsulazione di *t-res*, circa 64,0 µg/mg lipide, rispetto alle altre due formulazioni (1,29 µg/mg SPC e 9,65 µg/mg SPC per le formulazioni Lipo A e Lipo B, rispettivamente). Ciò nonostante, tutte le formulazioni sono caratterizzate da una bassa efficienza d'incapsulazione, in particolare 52,4%, 12,0% e 12,5%, nel caso di Lipo A, Lipo B e Lipo C, rispettivamente.

Formulazione	$\mu\text{g/ml}$ iniziali <i>t-res</i>	$\mu\text{g/ml}$ <i>t-res</i> dopo preparazione	Actual loading* ($\mu\text{g/ml}$ di <i>t-res</i> / mg/ml lipidi)	Efficienza d'incapsulazione (%)
Lipo A	100	52,08 \pm 0,64	4,20 \pm 0,92	52,46 \pm 11,50
Lipo B	1000	67,45 \pm 1,28	9,65 \pm 0,69	12,07 \pm 0,86
Lipo C	5000	332,17 \pm 32,59	49,92 \pm 9,27	12,48 \pm 2,32

Tabella 5. Dosaggio del *t-res* nelle formulazioni Lipo A, Lipo B e Lipo C dopo preparazione, actual loading ($\mu\text{g/ml}$ di *t-res* / mg/ml lipidi) ed efficienza d'incapsulazione (%). *Actual loading calcolato come rapporto tra $\mu\text{g/ml}$ di *t-res* e i mg/ml di lipidi nella sospensione liposomiale

Il rilascio di *t-res* è stato monitorato durante la conservazione a 4°C a tempi diversi. Le differenti formulazioni mostrano un profilo di rilascio del *t-res* simili fra le diverse formulazione presa in considerazione (tabella 6).

Formulazione	Actual loading* (μg <i>t-res</i> / mg SPC \pm S.D.)			
	Subito dopo preparazione	Dopo 7 giorni di conservazione a 4°C	Dopo 30 giorni di conservazione a 4°C	Dopo 60 giorni di conservazione a 4°C
Lipo A	4,20 \pm 0,92	1,50 \pm 0,09	3,69 \pm 0,11	2,72 \pm 0,25
Lipo B	9,65 \pm 0,69	5,90 \pm 0,96	6,68 \pm 0,80	9,16 \pm 4,77
Lipo C	49,92 \pm 9,37	34,80 \pm 4,46	35,10 \pm 6,51	31,11 \pm 5,66

Tabella 6. Rilascio di *t-res* dalle formulazioni Lipo A, Lipo B e Lipo C durante al conservazione a 4°C per 60 giorni. *Actual loading calcolato come rapporto tra $\mu\text{g/ml}$ di *t-res* e i mg/ml di lipidi nella sospensione liposomiale

In particolare, la formulazione Lipo A che ha ottenuto la più alta efficienza d'incapsulazione (52,4%), presenta un rilascio di *t-res* dopo solo 7 giorni, di circa 64,3%. Dopo 30 e 60 giorni di conservazione, non è stato osservato un ulteriore rilascio di *t-res*. Per la formulazione Lipo B invece, è stato osservato un rilascio di circa 38,7% dopo i primi 7 giorni di conservazione, mentre durante i 30 e 60 giorni successivi, non è stata evidenziata la perdita di *t-res* dai carrier. Anche per la formulazione Lipo C, è stato osservato un rilascio iniziale del 30,3%, con un'ulteriore perdita del 7% circa dopo 60 giorni di conservazione.

Liofilizzazione dei liposomi

A causa della perdita di *t-res* dai liposomi *stealth* durante la conservazione, si è reso necessario studiare le migliori condizioni per liofilizzare la formulazione Lipo C (scelta come migliore). In questo lavoro sono stati presi in considerazione due tipi di crioprotettori, trealosio e lattosio, a due diverse concentrazioni. Sono quindi state effettuate analisi del diametro medio, IP ed efficienza d'incapsulazione del *t-res* delle preparazioni dopo liofilizzazione.

Dai risultati riportati in tabella 6 si evince che l'assenza del crioprotettore ha comportato la perdita totale del di *t-res*. La presenza del crioprotettore in rapporto 1:5 (p/p), sia del trealosio che del lattosio, non ha influenzato in maniera significativa la stabilità della preparazione in termini di diametro medio ed IP ($200,32 \pm 32,9$ e $0,38 \pm 0,08$ formulazioni contenenti trealosio; $357,8 \pm 34,14$ e $0,45 \pm 0,22$ formulazioni contenenti lattosio, rispettivamente).

Tipo crioprotettore	Concentrazione	Recupero <i>t-res</i> (%)	Diametro medio dopo liofilizzazione (nm)	IP dopo liofilizzazione
Assente	-	0	$500 \pm 23,4$	$1,9 \pm 0,52$
Trealosio	1:5 (p/p)	99,6	$200,32 \pm 32,9$	$0,38 \pm 0,08$
	1:10 (p/p)	100	$195,1 \pm 15,2$	$0,21 \pm 0,05$
Lattosio	1:5 (p/p)	95,9	$357,8 \pm 34,14$	$0,45 \pm 0,22$
	1:10 (p/p)	99,61	$171,6 \pm 10,5$	$0,25 \pm 0,02$

Tabella 6. Analisi della formulazione Lipo C dopo liofilizzazione.

Invece, l'aggiunta del crioprotettore, trealosio o lattosio, in rapporto 1:10 (p/p) ha garantito una maggior stabilità delle strutture liposomiali durante la liofilizzazione come dimostrato dal diametro medio e dall'IP delle preparazioni dopo liofilizzazione ($195,1 \pm 15,2$ e $0,21 \pm 0,05$ per le formulazioni contenenti trealosio; $171,6 \pm 10,5$ e $0,25 \pm 0,02$ per le formulazioni contenenti lattosio, rispettivamente). Inoltre, anche in questo caso, non è stata osservata una perdita di *t-res* dai liposomi *stealth* in seguito a ridispersione delle polveri liofilizzate.

Effetti del *t-res* sull'inibizione della crescita in cellule di adenocarcinoma pancreatico umano.

Gli effetti antiproliferativi del *t-res* in tre differenti linee cellulari umane BxPC3, MiaPaca e Panc-1 di carcinoma pancreatico sono mostrati in figura 1. L'azione

antiproliferativa indotta dal *t-res* risultata essere tempo- e dose-dipendente su tutte le linee cellulari esaminate. In particolare, i risultati ottenuti dal saggio MTT di vitalità cellulare hanno mostrato un'inibizione della crescita del 50% (IC₅₀) indotta da *t-res* 25 μM dopo 48 ore di trattamento. E' stata quindi valutata l'attività del *t-res* incapsulato all'interno dei liposomi *stealth*, rispetto al *t-res* libero (figura 2), sull'inibizione proliferativa delle tre linee di carcinoma pancreatico umano attraverso saggio MTT (come descritto in materiali e metodi). Nella tabella 7 sono riportati i valori di IC₅₀ del *t-res* libero e incapsulato dopo 72 ore di trattamento. Inoltre, i valori del fattore di potenziamento (PF) riportati nella tabella 6 dimostrano che la formulazione contenente *t-res* potenzia di più di due volte l'inibizione proliferativa indotta dal *t-res* libero.

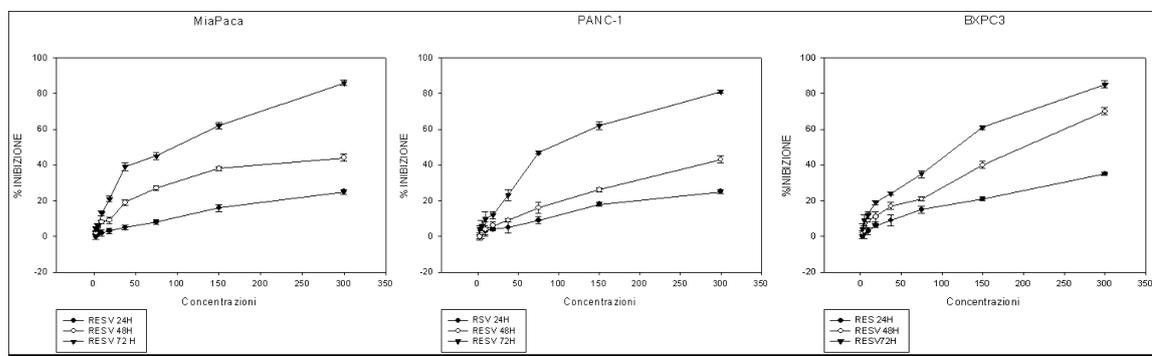


Figura 1. Cellule di carcinoma pancreatico umano (MiaPaca; PANC-1; BxPC3) trattate con solo *t-res*.

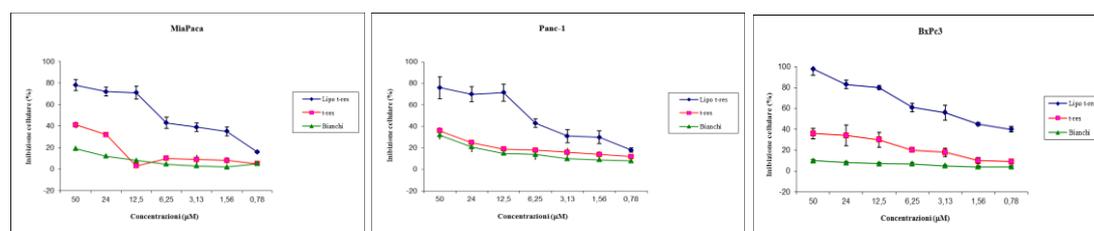


Figura 2. Cellule di carcinoma pancreatico umano (MiaPaca; PANC-1; BxPC3) trattate con liposomi *stealth* bianchi, liposomi *stealth* contenenti *t-res* e solo *t-res*.

Linea cellulare	Resveratrolo	Liposomi <i>stealth</i> / <i>t-res</i>	P.F.
BxPC3	80 μM	6,25 μM	12,8
MiaPaca	76 μM	11 μM	6.9
Panc-1	85 μM	6,25 μM	13,6

Tabella 7. Indici di IC₅₀ di inibizione proliferativa del *t-res* libero e incapsulato in liposomi *stealth* in differenti linee cellulari. Il “potentiatio factor” (PF) definisce lo specifico contributo del *t-res* contenuto nei liposomi dato dal rapporto tra IC₅₀ del *t-res* incapsulato e l'IC₅₀ di quello libero.

DISCUSSIONE

In questo lavoro, è stato messo a punto un sistema per la veicolazione del *trans*-resveratrolo, un polifenolo non flavonoide di origine naturale che ha suscitato negli ultimi anni un notevole e crescente interesse nel campo della ricerca oncologica e della biochimica sperimentale (Langcake e Pryce 1976; Soleas *et al.*, 1997; Jeandet *et al.*, 2002). Tra i vari effetti a livello sistemico, il *t-res* ha un'azione antinfiammatoria (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Jang *et al.*, 1997) ed un sorprendente effetto chemio-preventivo e chemio-terapeutico (Mgbonyebi *et al.*, 1998; Gusman *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2001; Joe *et al.*, 2002; Aggarwal *et al.*, 2004). La bassa biodisponibilità e la breve emivita plasmatica del *t-res*, se somministrato a livello sistemico (Gescher e Steward, 2003), nonché la sua instabilità chimica (isomerizzazione dalla forma *trans* a *cis*) (Baur e Sinclair, 2006), rendono necessario lo sviluppo sistemi di veicolazione che ne migliorino il profilo farmacocinetico, aumentandone l'accumulo nel tessuto bersaglio e garantendo l'integrità della molecola nella sua conformazione *trans* al sito d'azione. A tale scopo, l'impiego di nanovettori a base lipidica ricoperti da molecole di polietilen glicole, quali i liposomi *stealth*, è stato proposto per migliorare il profilo farmacocinetico svantaggioso del *t-res*, promuovendo un maggior accumulo dello stesso all'interno di tessuti tumorali, in virtù dell'effetto EPR. Inoltre, l'incapsulazione del polifenolo nei liposomi dovrebbe limitare l'isomerizzazione in seguito ad esposizione ai raggi solari ed evitarne la rapida metabolizzazione nel circolo ematico prima che il farmaco raggiunga il tessuto bersaglio.

Il lavoro sperimentale ha previsto lo sviluppo di tre formulazioni di liposomi *stealth* preparate a partire da soluzioni organiche di *t-res* a concentrazioni crescenti (0,1, 1 e 5 mg/ml). Per ciascuna formulazione sono stati valutati il diametro medio delle preparazioni, l'IP e la quantità di *t-res* incapsulata all'interno dei *carrier*. Le analisi sono state effettuate sia dopo preparazione che dopo conservazione delle formulazioni alla temperatura di 4°C, fino a 60 giorni. In studi preliminari, volti ad individuare le concentrazioni migliori di *t-res* da incapsulare, è stato dimostrato che l'utilizzo di concentrazioni elevate di *t-res* non consente la formazione delle vescicole liposomiali (dati non mostrati). In tali casi, infatti, l'idratazione del film lipidico contenente alte concentrazioni di *t-res* ha portato ad un liquido viscoso e lattiginoso, impossibile da

estrudere. Da ciò è stato ipotizzato che questa molecola, di natura idrofoba, posizionandosi nel *bilayer* fosfolipidico, ne modifichi in maniera significativa le caratteristiche ostacolando la formazione dello stesso *bilayer*. L'influenza del *t-res* sulle caratteristiche del *bilayer* è stata confermata dalla riduzione delle dimensioni osservata all'aumentare della concentrazione di *t-res* (confronto tra Lipo A e Lipo B). Resta da chiarire perché un ulteriore aumento della concentrazione di *t-res* (confronto tra Lipo B e Lipo C) non comporta un ulteriore riduzione del diametro medio. Dalle analisi effettuate durante la conservazione delle formulazioni, è stato possibile notare che, né il diametro medio delle formulazioni né la distribuzione dimensionale (IP) subiscono significative variazioni durante la conservazione a 4°C fino a 60 giorni. Ciò è sicuramente ascrivibile alla presenza di molecole di polietilen glicole (PEG), che come un folto manto di "capelli" riveste la superficie di ogni singolo carrier ed impedisce l'aggregazione delle vescicole durante la conservazione (Immordino *et al.*, 2006). Questo rivestimento, non solo consente di aumentarne la stabilità delle formulazioni prevenendo l'aggregazione, ma una volta in vivo, dovrebbe prolungare l'emivita plasmatica dei carrier con maggiori possibilità di accumulo in tumori, grazie all'effetto EPR. Ulteriori analisi, per esempio mediante studi di calorimetria differenziale, potrebbero chiarire l'influenza del *t-res* sulle caratteristiche fisiche del *bilayer*.

Un aumento della concentrazione di *t-res* iniziale nei liposomi risulta in una maggiore quantità di polifenolo incapsulata. Tuttavia, dal confronto tra le formulazioni Lipo A e Lipo B si evince che un aumento del *t-res* iniziale di un ordine di grandezza comporta solo un valore doppio di incapsulazione, con un'efficienza d'incapsulazione che si abbassa dal 53% circa, a circa il 12%. Questi risultati farebbero ipotizzare che il *bilayer* fosfolipidico si satura di *t-res* una concentrazione di circa 10 µg/mg lipidi, visto che l'aumento della quantità iniziale di polifenolo comporta un abbassamento dell'efficienza di incapsulazione. Tuttavia, questa ipotesi è in disaccordo con quanto si evince dal confronto tra le formulazioni Lipo B e Lipo C; in tal caso, infatti, un ulteriore aumento della concentrazione iniziale di *t-res* comporta un parallelo aumento della quantità di *t-res* incapsulato (Lipo C), con un'efficienza d'incapsulazione che rimane del 12% circa. Ulteriori studi sono sicuramente necessari per chiarire se il tipo di interazione del *t-res* con i componenti della membrana, e quindi la sua influenza con le caratteristiche della membrana stessa, sono influenzate dipendono dalla quantità di *t-res*

inizialmente aggiunta nella preparazione.

Inoltre, è stata monitorata la perdita di *t-res* durante la conservazione dei liposomi a 4°C. Come si può notare dalla tabella 5, si evince che tutte le formulazioni presentano un rilascio sostenuto di *t-res* dopo soli 7 giorni di conservazione. Per le formulazioni Lipo B e C, dopo la perdita iniziale di circa il 30%, la quantità di *t-res* rimane costante all'interno dei carrier per i successivi 30 e 60 giorni, mentre per la formulazione Lipo A, è stata osservata una perdita maggiore di *t-res*, di circa 64% dopo i primi 7 giorni. A causa dell'elevato rilascio di *t-res*, è stato necessario studiare una strategia che fosse in grado di preservare la formulazione Lipo C durante la conservazione a 4°C. A tale scopo la formulazione Lipo C è stata sottoposta a liofilizzazione, tal quale o in presenza di due diversi crioprotettori. Sono quindi state ricercate le condizioni che limitassero la perdita di *t-res* in seguito a ridispersione con acqua e non alterassero in maniera significativa le caratteristiche dimensionali della formulazione. La liofilizzazione o crioessiccamento è un processo tecnologico che permette l'eliminazione dell'acqua da una matrice organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della matrice stessa. Tuttavia, in seguito a liofilizzazione la maggior parte delle formulazioni liposomiali subiscono processi di aggregazione/fusione delle vescicole. L'aggiunta di crioprotettori, quali glucosio, lattosio o trealosio, possono migliorare in maniera significativa la stabilità delle formulazioni (Chen *et al.*, 2010). Questi crioprotettori sono caratterizzati dalla capacità di non cristallizzare, consentendo la formazione di una matrice amorfa durante il congelamento. Quando aggiunti alla sospensione liposomiale, essi prevengono sia la fusione delle vescicole che la formazione di cristalli durante il processo di congelamento (Brigitte *et al.*, 2010). Più precisamente, le molecole di zucchero interagiscono con le teste idrofile dei fosfolipidi contrastando la fusione/rottura delle membrane (Crowe *et al.*, 1997). In particolare, il trealosio o il sucrosio hanno dimostrato di essere tra i migliori crioprotettori, poiché mostrano un'alta viscosità, riducono la mobilità molecolare dopo congelamento e formano una matrice vetrosa amorfa (Slade e Levine, 1995). Inoltre, le molecole di zucchero agiscono come stabilizzanti della membrana preservando lo spazio tra le teste idrofile dei fosfolipidi, che in alternativa si ridurrebbe andando ad amplificare le forze di van der Waals tra le catene alchiliche (Ohtake *et al.*, 2005). A livello macroscopico, le particelle liposomiali

risultano strettamente impacchettate in uno strato secco, separate da una matrice di zucchero (Crowe *et al.*, 1998). Dopo idratazione, il processo di fusione è contenuto, poiché i liposomi non hanno un contatto diretto tra di loro. Tuttavia, l'efficacia dei diversi crioprotettori, nonché le migliori condizioni sperimentali di liofilizzazione vanno ottimizzate per ciascuna formulazione liposomiale. In questo lavoro è stato quindi valutato l'impatto della concentrazione di crioprotettore sulla stabilità dei liposomi. In particolare sono state investigate due differenti concentrazioni di trealosio e lattosio. Sono, quindi, stati presi in considerazione i rapporti 1:5 o 1:10 peso/peso tra lipide ed crioprotettore. Dai risultati ottenuti si evidenzia che l'assenza di crioprotettore determina l'aumento del diametro medio e dell'IP. Ciò è ascrivibile a fenomeni di aggregazione e/o fusione delle vescicole durante la liofilizzazione (Brigitte, *et al.*, 2010). Tale ipotesi è corroborata dalla perdita di *t-res* osservata dopo reidratazione dei liposomi liofilizzati (circa 100%). Dallo studio effettuato è emerso anche che l'aumento del diametro medio delle preparazioni e della distribuzione dimensionale è strettamente correlata alla concentrazione del crioprotettore. Infatti, l'utilizzo di un rapporto 1:5 per entrambi i tipi di crioprotettori comporta un aumento del diametro medio e dell'IP ($200,32 \pm 32,9$ e $0,38 \pm 0,08$; $357,8 \pm 34,14$ e $0,45 \pm 0,22$). Con un rapporto 1:10, invece, il diametro medio si mantiene ≤ 200 nm, con IP di circa 0,2. Il tipo di crioprotettore, nonché la sua concentrazione, non ha invece influenzato in maniera significativa il rilascio di *t-res* dalle formulazioni dopo idratazione delle polveri.

In una fase successiva è stato inoltre esaminato l'effetto delle diverse formulazioni sulla proliferazione di tre differenti linee cellulari di carcinoma pancreatico (BxPC3, MiaPaca e Panc-1). I dati ottenuti suggeriscono che le tre linee tumorali sono ugualmente sensibili alla inibizione della crescita indotta dal *t-res*. Inoltre, particolare attenzione è stata dedicata al confronto tra l'effetto del *t-res* libero e quello nella sua forma incapsulata. L'incubazione di tutte le linee cellulari (BxPC3, MiaPaca e Panc-1) con il solo *t-res* comporta un significativo effetto antiproliferativo ed apoptotico. L'incubazione delle cellule con liposomi *stealth* contenenti il *t-res*, comporta poi un potenziamento dell'effetto apoptotico e antiproliferativo, rispetto al trattamento con la forma libera di *t-res* come dimostrato dal fattore di potenziamento. Tale risultato era inatteso, visto che i liposomi *stealth* sono stati sviluppati per cambiare la distribuzione del *t-res* una volta somministrato nell'organismo, aumentandone

l'accumulo a livello di siti tumorali. Tuttavia, in questo lavoro, è stato riscontrato un aumento dell'attività antiproliferativa del *t-res* quando somministrato mediante liposomi *stealth*. Questi dati suggeriscono che il *t-res*, anche se somministrato *in vitro* su cellule, presenta problematiche di penetrazione che potrebbero essere dovute a incapacità di diffondere nella cellula per raggiungere il sito target o ad un'alterazione della molecola nel mezzo cellulare che ne potrebbe alterare l'attività. In entrambe le ipotesi, l'impiego di liposomi sembrerebbe essere una strategia valida per ottimizzare la concentrazione di *t-res* che raggiunge il suo bersaglio intracellulare, potenziandone quindi la sua attività antiproliferativa.

CONCLUSIONI

Lo sviluppo di nuove tecnologie per la veicolazione di farmaci “difficili” in termini di biodisponibilità risulta sempre più un’esigenza nel campo della medicina ed in particolar modo nell’ambito della terapia antitumorale. L’impiego di nanotecnologie a base lipidica offre una valida strategia per superare questi problemi, come testimoniano la presenza a di prodotti antitumorali a base di liposomi presenti in commercio.

Il *trans*-resveratrolo è un polifenolo non flavonoide che negli ultimi anni, ha riscosso notevole interesse in ambito terapeutico, in particolare nel trattamento di diverse patologie ed in particolar modo in quelle tumorali. Uno scarso profilo farmacocinetico però, ne limiterebbe l’impiego terapeutico nell’uomo. In questo lavoro di tesi sono stati messi a punto nanovettori a base lipidica rivestiti da molecole di polietilenglicole per la veicolazione sistemica del *trans*-resveratrolo. Il lavoro ha previsto lo sviluppo di diverse formulazioni, preparate con diversa quantità di *t*-res iniziale, con l’obiettivo di ottimizzare la quantità di polifenolo incapsulato. La perdita di *t*-res durante al conservazione a 4°C ha reso necessaria la liofilizzazione in presenza di trealosio ad un rapporto lipide/crioprotettore di 1:10 (p/p). La formulazione ottimizzata è stata saggiata, presso il Dipartimento di Biochimica e Biofisica della Seconda Università di Napoli, *in vitro* su diverse linee cellulari. Tali esperimenti hanno dimostrato che l’attività antiproliferativa del *t*-res è fortemente potenziata quando il polifenolo è presente in forma incapsulata. Dai risultati ottenuti, la formulazione Lipo C risulta avere caratteristiche tali da poter essere proposta per successivi studi in vivo. Tali studi saranno effettuati presso l’Università di Sheffield in Inghilterra in un modello animale di cancro.

**SVILUPPO DI NANOVETTORI A BASE LIPIDICA PER LA VEICOLAZIONE
DI OLIGONUCLEOTIDI**

INTRODUZIONE

Gli oligonucleotidi (ON) sono frammenti di DNA o RNA non codificanti per alcuna proteina, che normalmente all'interno della cellula, svolgono un ruolo nella regolazione della sintesi di proteine. In virtù di tale proprietà gli ON potrebbero costituire un strumento efficace e selettivo nel trattamento di numerose patologie. Tuttavia, l'impiego terapeutico di ON è ostacolato dalla loro scarsa biodisponibilità, breve emivita e bassa penetrazione nelle cellule. Tra gli approcci sviluppati per superare tali problemi, l'impiego di vettori non-virali ed in particolare di lipomi cationici, rappresenta sicuramente la strategia più seguita. Nell'ultimi anni, numerosi studi hanno proposto liposomi cationici di ultima generazione che consentissero di arrivare a studi in primati non umani e poi nell'uomo. Tra questi gli SNALP, abbreviazione di *stabilized nucleic acid lipid particles*, hanno dimostrato un grande potenziale applicativo, passando in pochi anni da esperimenti di laboratorio (Sample *et al.*, 2001) a studi clinici. Tali vettori sono caratterizzati da un'elevata stabilità in presenza di siero (assenza di cariche positive sulla superficie) che consente loro di essere utilizzati per esperimenti *in vivo*. La presenza di un lipide cationico ionizzabile, consente però di mantenere all'interno della particella, cariche positive, in grado di incapsulare ON con alta efficienza.

Allo stato attuale, sono stati sviluppati SNALP contenenti oligonucleotidi antisense, plasmidi e siRNA (Semple *et al.*, 2001). Tali vettori sono stati sviluppati con caratteristiche specifiche che si adattano al tipo di ON incapsulato. Tuttavia, non esiste in letteratura uno studio comparativo che consenta di capire se, anche il tipo di ON da veicolare, possa richiedere diverse caratteristiche formulative. In questo lavoro, quindi, sono stati messi a punto SNALP con caratteristiche tecnologiche modellate intorno al tipo di ON preso in considerazione. Gli ON utilizzati in questo studio, presentano caratteristiche chimiche e lunghezze differenti.

Tra gli ON utilizzati in questo studio, è stato preso in considerazione il miRNA 34a. È stato documentato che il miRNA 34a, metilato e non, è in grado di interferire con il pathway di Notch, regolando negativamente la proliferazione cellulare (de Antonellis *et al.*, 2011). In particolare, è stato studiato l'effetto della regolazione da parte dei miRNA 34a, sulla proliferazione di cellule di medulloblastoma. Il

medulloblastoma può derivare da cellule granulari progenitrici e da cellule staminali neuronali del cervelletto. I pathways Notch e Sonic Hedgehog (Shh), che controllano lo sviluppo del cervelletto, sono di cruciale importanza nell'insorgenza del medulloblastoma (Crawford, *et al.*, 2007; Gilbertson e Ellison, 2008). I miRNA sono coinvolti nei processi biologici e molti studi hanno dimostrato il loro ruolo nella tumorigenesi umana (Zhang *et al.*, 2007). La famiglia dei miRNA34 è direttamente coinvolta nella regolazione della trascrizione del fattore p53 (Uziel *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007) e tutti i membri di questa famiglia (miRNA34a, miRNA34b, etc), mostrano molte sequenze simili (Bommer *et al.*, 2007). Il miRNA34a va ad agire sull'attività dell'oncosoppressore p53, inibendo la crescita cellulare, inducendo l'apoptosi e causando una senescenza cellulare come effetto finale (Hermeeking, 2007). Molti studi hanno confermato che la famiglia dei miRNA34 sono coinvolti nella normale risposta cellulare ai danni al DNA causati dall'irradiazione. Questi risultati fanno dei miRNA34 dei potenti agenti terapeutici, che possono essere utilizzati come agenti radiosensibilizzanti nel cancro al seno mutante nel p53 (Kato *et al.*, 2009). In un altro studio, è stato dimostrato che questo miRNA ha un alto tasso di predittività di sopravvivenza nei casi di sarcoma Ewing (Nakatani *et al.*, 2011). In particolare, sono stati analizzati i miRNA di pazienti affetti da sarcoma di Ewing. Dai risultati ottenuti è stato evidenziato che 5 miRNA (miRNA 34a, miRNA 23a, miRNA 92a, miRNA 490-3p e miRNA 130b) sono predittori indipendenti del rischio di progressione della malattia e di sopravvivenza. I risultati ottenuti sono stati particolarmente interessanti per il miRNA 34a, che è apparso associato alla sopravvivenza cellulare e come fattore predittivo significativo. I pazienti con la più alta espressione di miRNA 34a non hanno esperienza di eventi avversi nei successivi 5 anni, al contrario, i pazienti con la più bassa espressione presentano recidive dopo soli due anni dal trattamento. Inoltre, il trattamento delle cellule con miRNA 34a le rende più sensibili all'azione di chemioterapici come la doxorubicina e la vincristina. La regolazione dell'attività del miRNA 34a potrebbe essere utile per ridurre la malignità del tumore ed aumentare la sensibilità dello stesso al trattamento di agenti antitumorali convenzionali, limitandone la forte tossicità. Non essendo ancora noto il meccanismo d'azione del miRNA 34a, è stato preso in considerazione l'utilizzo del pre-miRNA 34a, un oligonucleotide ad RNA lungo 71 nucleotidi formante un loop. Questo, una volta

entrato nella cellula, verrà tagliato dando origine ai microRNA maturi che, in seguito ad interazione con il complesso RISC, espletterà la sua azione, inibendo la traduzione dell'mRNA in proteina.

L'ultimo ON preso in considerazione in questo studio, è stato siRNA CD99. Questo ON è costituito da un doppio filamento di 21 nucleotidi ciascuno, per un totale di 42 nucleotidi. In un recente studio, Rocchi e collaboratori, hanno dimostrato che la trasfezione di questo siRNA comporta l'inibizione dell'espressione di CD99, un recettore di membrana fortemente espresso in molti casi di sarcoma di Ewing. E' stato dimostrato che la modulazione dell'espressione di questo recettore può modulare la differenziazione delle cellule di Ewing ed il grado di malignità, con una conseguente riduzione della capacità di formare metastasi ossee e tumori (Rocchi *et al.*, 2010). La modulazione dell'espressione di questa proteina può essere ottenuta mediante l'utilizzo del siRNACD99.

SCOPO DEL LAVORO

In questo lavoro, sono stati sviluppati *carrier* a base lipidica di nuova generazione, in particolare SNALP, per la veicolazione di ON di diversa natura chimico e lunghezza nucleotidica. L'attività di ricerca ha previsto uno studio tecnologico mirato a stabilire quali fossero le condizioni di preparazione e di formulazione migliori per l'incapsulazione di differenti ON in SNALP. In questo lavoro, sono stati adoperati oligonucleotidi di diversa lunghezze e natura chimica. In particolare, sono stati utilizzati oligonucleotidi ad RNA "single strand" di 21 nucleotidi (miRNA34a, SNALP 1), oligonucleotide ad RNA modificato, presentante un gruppo metilico in posizione 2'di 21 nucleotidi (miRNA34a O-Met SNALP 2), un "single strand harpin" di 71 nucleotidi (premiRNA34a, SNALP 3) ed infine un "double strand" di 42 nucleotidi (siRNA CD99, SNALP 4).

MATERIALI E METODI

Materiali

Il 1,2-dioleil-3-dimetilammonio propano (DODAP) ed il N-palmitoyl-sfiingosina-1-{succinil[metossi(polietilene glicol)2000]} (PEG-Cer₁₆) sono stati acquistati presso Avanti Polar Lipids. Il disteroilfosfatidilcolina (DSPC) è stato gentilmente offerto dalla Lipoid GmbH (Cam, Svizzera). Il colesterolo (chol), il cloruro di sodio, il cloruro di potassio, il fosfato di sodio, HEPES, l'acido citrico e il sodio citrato sono stati acquistati presso la Sigma Aldrich (USA). Infine, l'etanolo e gli altri reagenti sono stati acquistati presso Carlo Erba Reagenti (Italia).

Preparazione delle particelle lipidiche stabilizzanti gli acidi nucleici (SNALPs)

Le formulazioni SNALPs sono state ottenute mediante la tecnica dell'iniezione di etanolo (Sample *et al.*, 2001). Brevemente, i lipidi sono stati sciolti in una soluzione etanolica (100%). Successivamente, sono stati prelevati circa 1,3 μmol (corrispondenti a circa 1 mg) dei lipidi (0,4 ml del volume totale) e posti in una vial ambra. In un'altra vial, 0,2 mg di oligonucleotide (ON) è stato sciolto in 0,6 ml di acido citrico 20 mM a pH 4,0. Le due soluzioni sono state riscaldate a 65°C per 2-3 minuti e successivamente la soluzione etanolica, contenente i lipidi, è stata aggiunta alla soluzione acquosa contenente l'ON, il tutto sotto agitazione. Successivamente le preparazioni sono state sottoposte a un processo di estrusione, mediante l'utilizzo di un estrusore termostato (Northern Lipids Inc., Canada), a 65°C. La sospensione è stata fatta passare 5 volte su membrane di policarbonato con porosità di 0,2 μm e 20 volte su membrane con porosità 0,1 μm .

La sospensione è stata, quindi, dializzata (3,5 kDa cutoff) in tampone citrato 20 mM a pH 4,0 per 1 ora circa, per rimuovere l'eccesso di etanolo ed in tampone HBS (20mM HEPES, 145 mM NaCl, pH 7,4) per 18-20 ore per rimuovere il tampone citrato e neutralizzare il DODAP. La sospensione è stata purificata tramite cromatografia a scambio ionico DEAE-Sepharose CL-6B.

Sono stati preparati SNALP costituiti da un totale di 1,3 μmol (1 mg/ml) di lipidi DSPC/CHOL/DODAP/PEG-Cer₁₆ (25/45/20/10, mol/mol/mol/mol) ed 0,2 mg di ON

(rapporto ON/lipide 1:5).

Le sequenze degli ON utilizzati in questo lavoro sono di seguito riportate: miRNA 34a e miRNA 34a O-Met 5'-UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG U-3'; premiRNA 34a 5'-(GGC CAG CUG UGA GUG UUU CUU UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG UUG UGA GCA AUA GUA AG G AAG CAA UCA GCA AGU AUA CUG CCC UAG AAG UGC UGC ACG UUG UGG GGC CC)-3', siRNACD99 5'-(GGC UGG CCA UUA UUA AGU Ctt)-3' 5'-(GGC TGG CCA TTA TTA AGT CCC)-3'

Incapsulazione degli oligonucleotidi negli SNALPs

Il dosaggio dell'ON contenuto all'interno degli SNALPs è stato ottenuto mediante spettroscopia UV (Shimadzu, Giappone). Brevemente, 10 µl di sospensione SNALPs sono stati disciolti in 990 µl di metanolo ed analizzati a 260 nm. Il tasso d'incapsulazione dell'ON è stato calcolato come mg di ON/ml di sospensione diviso i mg di lipidi totali. L'efficienza d'incapsulazione, invece, è stata calcolata come rapporto tra il tasso d'incapsulazione reale e quello teorico per 100.

Caratterizzazione degli SNALPs

Il diametro medio, la distribuzione dimensionale sono stati determinati tramite spettroscopia a correlazione fotonica (PCS) (N5, Beckman Coulter, Miami, USA). Ogni campione è stato diluito in acqua distillata e filtrata (0,22µm, filtri in policarbonato, MF-Millipore, Microglass Heim, Italia) ed analizzata con un angolo di 90°. Per la misurazione della distribuzione dimensionale è stato utilizzato l'indice di polidispersità (IP).

Il potenziale Z (PZ) è stato determinato in acqua distillata a 20°C tramite l'utilizzo dello Zetasizer Nano Z (Malvern, UK). Ogni analisi è stata ripetuta in triplicato. Per ogni formulazione, il diametro medio, l'IP e il PZ è stato calcolato come la media di tre differenti preparazioni. (n=3).

RISULTATI

In questo lavoro è stata valutata l'influenza del rapporto tra le cariche positive del lipide ionizzabile e le cariche negative dell'ON (rapporto cariche +/-) sulle caratteristiche tecnologiche del *carrier* stesso e sull'efficienza d'incapsulazione.

In particolare, sono stati sviluppati dei nanovettori, chiamati SNALPs, per la veicolazione di ON differenti tra loro. A tale scopo, sono state apportate modifiche nella formulazione del *carrier* ed in particolar modo è stato modificato il rapporto tra le cariche +/- (tabella 8), per migliorarne le caratteristiche tecnologiche. Le formulazioni sono quindi state caratterizzate in termini di diametro medio, distribuzione dimensionale (IP), potenziale zeta (PZ) ed infine, incapsulazione di ON all'interno degli SNALPs. I risultati sono stati riportati in tabella 10.

Formulazione	Oligonucleotide incapsulato	Rapporto ON/lipidi	Rapporto carica +/-
SNALP 1	miRNA34a	1:5	104,39
SNALP 2	miRNA34a O-Met	1:5	104,39
SNALP 3a	PremiRNA34a	1:5	30,87
SNALP 3b		1:10	61,73
SNALP 3c		1:15	92,60
SNALP 4a	siRNA CD99	1:5	48,97
SNALP 4b		1:10	97,94
SNALP 4c		1:15	146,91

Tabella 8. Nome delle formulazioni SNALP preparate, tipo di ON veicolato, rapporto ON/lipidi totali e rapporto tra cariche +/- (lipide ionizzabile/ON)

Come è possibile notare dalla tabella 9, l'efficienza d'incapsulazione è fortemente influenzata dal rapporto lipidi/ON ed in particolare tra cariche positive (lipide ionizzabile) (tabella 8) e quelle negative (ON).

Infatti, per entrambe le formulazioni SNALP 1 e 2, che presentano lo stesso rapporto tra cariche +/-, l'efficienza d'incapsulazione risulta essere pari al 81,8% e 101,4% rispettivamente. Per quanto riguarda, invece, l'incapsulazione di ON più lunghi (premiRNA 34a, 71 nucleotidi) o che presentano un doppio filamento (siRNA CD99, 42 nucleotidi), l'utilizzo dello stesso rapporto di cariche ha comportato un drastico crollo dell'efficienza d'incapsulazione (9,6% e 2,1%, SNALP 3a e SNALP 4a, rispettivamente).

Formulazione	ON dopo preparazione (nmol/ml)	Actual loading ($\mu\text{g/ml}$ di ON/mg lipidi)	Loading teorico ($\mu\text{g/ml}$ di ON/mg lipidi)	Efficienza d'incapsulazione (%)
SNALP 1	24,36 \pm 1,75	160 \pm 0,01	200	81,88 \pm 3,12
SNALP 2	58,76 \pm 32,38	240 \pm 0,24	200	101,38 \pm 20,8
SNALP 3a	1,55 \pm 0,34	20 \pm 0,01	200	9,58 \pm 6,0
SNALP 3b	2,30 \pm 0,05	40 \pm 0,01	100	40,14 \pm 7,18
SNALP 3c	14,06 \pm 4,88	10 \pm 0,04	70	105,0 \pm 9,51
SNALP 4a	0,23 \pm 0,02	4 \pm 0,0	200	2,06 \pm 0,02
SNALP 4b	1,38 \pm 0,05	40 \pm 0,0	100	40,85 \pm 2,62
SNALP 4c	3,89 \pm 0,07	40 \pm 0,01	70	57,49 \pm 2,45

Tabella 9. Dosaggio dell'ON nelle formulazioni SNALP dopo preparazione, actual loading ($\mu\text{g/ml}$ ON / mg/ml lipidi) ed efficienza d'incapsulazione (%)

Un aumento del rapporto +/-, di circa il doppio, ha comportato un aumento dell'efficienza d'incapsulazione del 40,1% e 40,8% circa, per la formulazione SNALP 2 e 3 rispettivamente. Un ulteriore incremento di questo rapporto +/- ha comportato l'aumento dell'efficienza d'incapsulazione di circa 57,5% per gli SNALP 4 ed un incremento ancor più significativo per la formulazione SNALP 3 (circa 105%).

Formulazione	Rapporto ON/lipidi	Diametro medio (nm) \pm DS	IP \pm DS	PZ \pm DS
SNALP 1	1:5	157,18 \pm 17,18	0,16 \pm 0,03	-13,52 \pm 2,28
SNALP 2	1:5	127,75 \pm 10,68	0,25 \pm 0,03	-5,19 \pm 5,38
SNALP 3a	1:5	178,60 \pm 19,37	0,49 \pm 0,13	-2,29 \pm 0,42
SNALP 3b	1:10	147,95 \pm 3,75	0,20 \pm 0,00	-6,35 \pm 1,20
SNALP 3c	1:15	208,25 \pm 50,97	0,54 \pm 0,15	-8,28 \pm 3,41
SNALP 4a	1:5	196,40 \pm 12,80	0,38 \pm 0,12	-12,2 \pm 5,1
SNALP 4b	1:10	187,90 \pm 18,32	0,27 \pm 0,06	-9,19 \pm 13,46
SNALP 4c	1:15	152,95 \pm 67,25	0,32 \pm 0,06	-13,89 \pm 16,24

Tabella 10. Diametro medio (nm), indice di polidispersità (IP) e potenziale Z (PZ) delle formulazioni SNALP contenenti ON.

La natura dell'ON influenza anche le caratteristiche dimensionali del *carrier*. In particolare, a parità di rapporti fra le cariche, le formulazione SNALP 1 e 2 presentano un diametro medio pari a 157 e 127,7 nm circa, mentre le formulazioni SNALP 3 e 4 presentano un diametro medio superiore, di 196,4 e 178,6 nm rispettivamente. L'aumento del rapporto +/- comporta, in un caso la riduzione del diametro medio (152,9 nm, SNALP 2), mentre nell'altro della formulazione SANLP 3 un ulteriore aumento (208,25 nm). La distribuzione dimensionale (IP) delle formulazioni varia a seconda del tipo di formulazione. In particolare la formulazione SNALP 1 presenta un IP pari a 0,16 mentre per la formulazione SNALP 2 è di circa 0,2. Le formulazioni SNALP 3 e 4

presentano, invece, un IP pari a 0,4 e 0,3. Solo la formulazione SNALP3a, presenta un IP superiore a 0,5.

Infine, per quanto riguarda la carica superficiale, le formulazioni SNALP 1 e 2 non presentano un PZ differente dalle formulazioni bianche (-13,52 mV, -5,19 mV e -15,71 mV rispettivamente); le formulazioni SNALP 3 e 4 presentano un PZ compreso tra -8,28 mV e -13,89 mV.

DISCUSSIONE

Nell'ambito dello sviluppo di nanovettori destinati alla somministrazione sistemica, il lavoro ha previsto lo sviluppo di nanovettori a base lipidica per la somministrazione di oligonucleotidi (ON). Tali molecole sono progettate per interferire nella sintesi di proteine coinvolte in processi patologici. Il loro utilizzo potrebbe giocare un ruolo cruciale nel trattamento di numerose patologie. Tuttavia, l'impiego terapeutico di ON è ostacolato dalla loro scarsa biodisponibilità, breve emivita e bassa penetrazione nelle cellule.

Una strategia per la veicolazione di ON consiste nell'utilizzo di liposomi cationici. Questi nanovettori, presentando cariche positive sulla loro superficie riescono a complessare in maniera efficiente l'ON (interazione elettrostatica), consentendo una buona efficienza di trasfezione di ON sulle cellule. La presenza, però, di cariche superficiali positive comporta una forte citotossicità, nonché una forte instabilità della dispersione in presenza di siero; tali fattori hanno ostacolato per anni l'utilizzo di liposomi cationici *in vivo*.

Negli ultimi anni, è stato introdotto un nuovo sistema di nanovettori a base lipidica, le particelle lipidiche stabilizzanti gli acidi nucleici (SNALP). La peculiarità di questi sistemi sta nel possedere un lipidi ionizzabile a pH acido all'interno del *bilayer*. Ciò consente al carrier di interagire con le cariche negative dell'ON ed avere così l'incapsulamento di elevate quantità di ON all'interno delle vescicole. Inoltre, la presenza di molecole idrofile, quali ad esempio il polietilen glicole, aumenta la stabilità dei carrier in siero aumentandone l'emivita in circolo. In tale ambito, gli SNALP (*stabilized nucleic acid lipid particles*) hanno dimostrato un grande potenziale, passando in pochi anni da esperimenti di laboratorio (Sample *et al.* 2001) a studi clinici. Gli SNALP, proposti per la prima volta da Semple *et al.*, carrier per la veicolazione di ON costituiti da fosfolipidi ionizzabili. Questi fosfolipidi hanno la peculiarità di possedere sulla porzione idrofila, un gruppo ionizzabile a pH acido mentre a pH neutro non risultano possedere alcuna carica (figura 3).

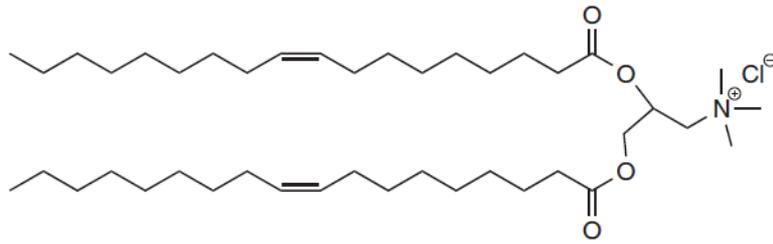


Figura 3. Struttura chimica del 1,2-Dioleil-3-trimetilammonio-propano (sale sodico) DODAP, un fosfolipide ionizzabile.

Questa caratteristica consente un'elevata efficienza d'incapsulazione grazie alla presenza di cariche positive che interagiscono con le cariche negative dell'ON. Inoltre, la presenza di etanolo durante la fase di preparazione, potrebbe aumentare la deformabilità dei vettori/DNA facilitando l'auto assemblaggio e il processo di dimensionamento (Sample *et al.*, 2001).

Per ogni ON è stata quindi sviluppata una formulazione *ad hoc*. E' stata innanzitutto valutata l'influenza del rapporto tra le cariche +/- sulle caratteristiche tecnologiche delle formulazioni. Dai risultati ottenuti è possibile notare che le formulazioni SNALP 1 e SNALP 2 (stesso rapporto tra le cariche +/-, 100:1circa) presentano caratteristiche tecnologiche (diametro medio, IP, PZ) molto simili. Quando però si valuta l'efficienza d'incapsulazione, la formulazione SNALP 2 presenta un'efficienza molto più elevata, circa il 100%, rispetto alla formulazione SNALP 1 (80% circa). Questo dato potrebbe essere spiegato dalla presenza di un gruppo metilico sullo zucchero dell'ON che aumenta la lipofilia dello stesso favorendo l'incapsulazione. L'incapsulazione di ON più lunghi e quindi presentanti più cariche negative, ha comportato una riduzione del rapporto tra le cariche +/- (circa 30:1 per SNALP 3 e 49:1 per SNALP 4, rispettivamente), con conseguente riduzione dell'efficienza di incapsulazione. Si è reso quindi necessario incrementare la quantità di lipide ionizzabile (e quindi di lipidi totali per mantenere uguali rapporti tra i lipidi), di circa 2 e 3 volte superiori alla quantità iniziale. L'incremento ha portato ad un aumento proporzionale dell'efficienza d'incapsulazione, in particolare, all'avvicinamento del rapporto tra le cariche +/- a 100:1 segue un incremento dell'efficienza d'incapsulazione delle formulazioni SNALP 3 e 4 (105% e 57% rispettivamente. Purtroppo però, per la formulazione SNALP 4 non è stato possibile incrementare ulteriormente l'efficienza

d'incapsulazione. Tale risultato è stato comunque ritenuto sufficiente per l'impiego della formulazione SNALP 4 in successivi studi *in vitro* ed *in vivo*.

Per quanto concerne il diametro medio delle formulazioni, non è possibile osservare una correlazione tra aumento delle dimensioni con l'aumento del rapporto ON/lipide. Inoltre, la distribuzione dimensionale della formulazione SNALP 3 risulta essere quella più eterogenea rispetto alle altre formulazioni. Questo dato potrebbe essere spiegato dalla maggior dimensione dell'ON (71 nucleotidi), ciò comporta una maggior difficoltà in fase di dimensionamento della preparazione. Infatti, durante l'estrusione delle preparazioni si osserva un incremento della contropressione che non è stato osservato per le altre formulazioni.

Infine, i risultati ottenuti dall'analisi del PZ ci dimostrano che le formulazioni, a fine preparazione, presentano carica neutra, dimostrando la neutralizzazione della carica positiva in seguito a dialisi. Inoltre, la presenza di molecole idrofile, quali il polietilene glicole (PEG), sulla superficie degli SNALPs, rende questi nanosistemi stabili durante la conservazione a 4°C (dati non mostrati) ed idonei per successivi saggi *in vitro* ed *in vivo*.

CONCLUSIONI

Lo studio ha evidenziato che le caratteristiche di SNALP sono strettamente dipendenti dal tipo di ON incapsulato. In particolare la lunghezza, la presenza di un singolo o doppio filamento e la natura chimica sono tutti fattori che hanno influenzato le caratteristiche finali della formulazione. L'ottimizzazione dell'efficienza d'incapsulazione è stata realizzata mediante variazione del rapporto +/- . Risultati preliminari *in vitro* (dati non mostrati) hanno dimostrato inoltre, per la prima volta, l'utilità degli SNALP per la veicolazione di miRNA. Da tale studio risulta quindi evidente come sia possibile estendere il sistema SNALP per la veicolazione di diversi ON; tuttavia, in ciascun caso, dovrà essere presa in considerazione un'ottimizzazione della formulazione che dovrà essere sviluppata *ad hoc*.

CAPITOLO 2

NANOTECNOLOGIE PER LA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI SULLA CUTE

SVILUPPO DI NANOVETTORI A BASE LIPICA PER LA VEICOLAZIONE

TOPICA: IL CASO DEL RESVERATROLO

IL RESVERATROLO E LA CUTE

Il resveratrolo (3,5,4' trihydroidrossistilbene) è un polifenolo non flavonoide di origine naturale presente in diverse specie vegetali. Esso è presente in modo particolare nelle bucce degli acini della più comune vite rossa (*Vitis vinifera*), ed esiste in due isoforme: il *trans*- ed il *cis*-resveratrolo. Il vino, in particolare il vino rosso, rappresenta la principale fonte alimentare di resveratrolo.

Numerosi sono gli studi che dimostrano gli effetti del resveratrolo sulla cute. Ad esempio, è stata messa in evidenza l'efficacia del resveratrolo nel ridurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'infiltrazione di leucociti in topi SKH-1 precedentemente irradiati con raggi UV-B (Afaq *et al.*, 2003). È stato quindi evidenziato un effetto antinfiammatorio su cellule epiteliali, attribuendo al resveratrolo la capacità di inibire la ciclossigenasi (Donnelly *et al.*, 2004). Diversi studi hanno poi evidenziato un effetto antimicrobico del resveratrolo su mucose (Docherty *et al.*, 2004; Docherty *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008). In particolare, è stata dimostrata la capacità del resveratrolo di inibire la riproduzione del *virus herpes simplex* 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) di tipo vaginale nei ratti. Il trattamento ha previsto l'utilizzo di una crema base con una concentrazione di resveratrolo del 19% (Docherty *et al.*, 2005). Il meccanismo di questa inibizione non è ancora conosciuto, ma si può attribuire all'arresto del ciclo cellulare da parte del resveratrolo (Ragione *et al.*, 1998), alla sua inibizione della DNA polimerasi (Sun *et al.*, 1998) ed alle sue proprietà anti-infiammatorie (Culpitt *et al.*, 2003; Donnelly *et al.*, 2004; Leiro *et al.*, 2004). Tuttavia, la maggior parte degli studi sugli effetti antiossidanti sono stati condotti *in vitro*, o su modelli animali, senza ancora nessun riscontro nell'uomo. Il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con il Dipartimento di Patologia Sistemica di questa Università, ha evidenziato un significativo effetto antiinfiammatorio del resveratrolo (Fabbrocini *et al.*, 2011). In particolare è stata valutata l'attività del resveratrolo nel trattamento di una patologia a base infiammatoria quale l'*acne vulgaris*, su pazienti volontari. Esso ha dimostrato di ridurre le pustole con un significativo miglioramento della patologia.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato la veicolazione del *trans*-resveratrolo sulla cute, dove può esplicare la sua azione antiinfiammatoria, mediante l'utilizzo di nanovettori a base lipidica. In particolare sono stati messi a punto due tipi di *carrier* notoriamente utilizzati per la veicolazione topica di farmaci: i transfersomi e gli etosomi. In entrambi i casi, sono state modificate le caratteristiche tecnologiche dei vettori, con lo scopo di ottenere elevate efficienze d'incapsulazione, aumentare la stabilità del *trans*-resveratrolo durante la conservazione e potenziarne l'attività sulla cute.

Infine, sono stati effettuati studi di permeazione su cute di maiale per confrontare l'efficacia dei diversi *carrier* sviluppati nel promuovere il passaggio del *trans*-resveratrolo sulla cute.

MATERIALI E METODI

Materiali

Il *trans*-resveratrolo (*t-res*), il colesterolo (chol), il polisorbato 80 (Tw80), il sodiocolato (SC), il sodio deossicolato (SDC), la Sephadex G-50150, N,N-dimetilformamide, 2',7'-diclorofluorescina-diacetato (H₂DCFDA) ed il 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromuro (MTT) sono stati acquistati presso la Sigma (USA). Il metanolo (grado HPLC), l'etanolo, il cloroformio, l'acido acetico glaciale sono stati forniti da Carlo Erba Reagenti (Italia). La fosfatidilcolina di soia (SPC) è stata gentilmente offerta dalla Lipoid GmbH (Cam, Svizzera). Il Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e la penicillina/streptomicina sono stati acquistati presso la Biowhittaker. Infine, il siero fetale di bovino è stato comprato presso la Lonza.

Preparazione dei transferosomi e degli etosomi.

I transferosomi e gli etosomi sono stati preparati con mediante la tecnica dell'idratazione del film lipidico. In breve, per i transferosomi è stata sciolta una miscela lipidica composta da SPC/Tw80 o SPC/SDC o SPC/SC (9:1 p/p) in miscela cloroformio/metanolo (2:1 v/v). Per gli etosomi, invece, sono stati sciolti SPC o SPC/chol in miscela cloroformio/metanolo (2:1 v/v). Per entrambe le formulazioni, le soluzioni organiche sono state poste in un pallone di vetro da 50ml ed il solvente è stato fatto evaporare tramite l'utilizzo di un evaporatore rotante sotto pressione di azoto (Laborota 4010 digital, Heidolph, Schwabach, Germania). Il film così ottenuto è stato poi idratato per le formulazioni dei tranferosomi con una soluzione di tempone fosfato (pH 7,2), mentre per gli etosomi, il film è stato idratato con una soluzione idroalcolica al 40% (v/v). Tutte le formulazioni sono state estruse tramite l'utilizzo di un estrusore termo regolabile (Northern Lipids Inc., Vancouver, BC, Canada). Questa tecnica prevede il passaggio delle sospensioni su membrane di policarbonato (Nucleopore Track Membrane 25mm, Whatman, Brentford, UK) a porosità decrescente (da 0,4 to 0,1 µm). Infine, è stata utilizzata una cromatografia ad esclusione molecolare Sephadex G-50150 eluita in acqua o in tampone fosfato (pH 7,2) per allontanare il *t-res* non

incapsulato. Le preparazioni sono state conservate a 4°C. Ogni formulazione è stata preparata in triplicato.

Caratterizzazione dei transferosomi e degli etosomi

Il diametro medio e la distribuzione dimensionale dei transferosomi e degli etosomi è stato valutato sia subito dopo preparazione che dopo conservazione a 4°C attraverso l'utilizzo della spettroscopia a correlazione fotonica (PCS) (N5, Beckman Coulter, Miami, USA). Ogni campione è stato diluito in acqua distillata e filtrata (0,22µm, filtri in policarbonato, MF-Millipore, Microglass Heim, Italia) ed analizzata con un angolo di 90°. Per la misurazione della distribuzione dimensionale è stato utilizzato l'indice di polidispersità (IP).

Il potenziale zeta (PZ) dei transferosomi e degli etosomi è stato determinato in acqua distillata a 20°C tramite l'utilizzo dello Zetasizer Nano Z (Malvern, UK). Ogni analisi è stata ripetuta in triplicato. Per ogni formulazione, il diametro medio, l'IP e il PZ è stato calcolato come la media di tre differenti preparazioni. (n=3).

Incapsulazione e stabilità del *t*-res in transferosomi ed etosomi.

Il dosaggio del *t*-res contenuto all'interno dei transferosomi e degli etosomi è stato ottenuto mediante cromatografia liquida a fase inversa ad alte prestazioni (RP-HPLC) come descritto nel capitolo precedente. Per determinare la quantità di *t*-res incapsulata, 100 µl della sospensione di transferosomi ed etosomi sono stati aggiunti a 900 µl di metanolo; la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 30 minuti ed il supernatante è stato analizzato all'RP-HPLC. L'analisi del *t*-res incapsulato nei transferosomi negli etosomi è stata eseguita sia subito dopo preparazione che dopo conservazione a 4°C. Per ogni preparazione, l'incapsulazione del *t*-res è stata ottenuta come la media di tre misurazioni. Per ogni formulazione l'incapsulazione del *t*-res è stata ottenuta come la media di tre differenti preparazioni (n=3). La quantità di *t*-res incapsulata all'interno dei carrier è stata espressa come *t*-res actual loading ed efficienza d'incapsulazione, calcolate come µg di *t*-res/mg di SPC e rapporto tra *t*-res realmente incapsulato nei transferosomi o etosomi ed *t*-res teoricamente incapsulato, rispettivamente.

La quantità di fosfolipidi contenuti all'interno della sospensione è stata determinata tramite il saggio di Stewart. Brevemente, un'aliquota della sospensione liposomiale è stata aggiunta ad un sistema bifasico costituito da una soluzione acquosa di ferrotiocianato d'ammonio (0,1N) e cloroformio. La concentrazione di SPC è stata ottenuta mediante la misurazione dell'assorbanza a 485 nm della fase organica.

Colture cellulari

La linea cellulare di cheratinociti umani HaCaT è stata incubata a 37°C in 5% CO₂/95% aria umidificata in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenente il 10% di siero fetale di bovino, 100U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina. Sono state piastrate circa 2,5×10⁵ cell/ml per pozzetto e consentendo l'adesione per due ore. Successivamente, il mezzo è stato sostituito con del mezzo fresco e le cellule sono state incubate con i transferosomi e gli etosomi, bianchi o contenenti *t-res* (0,5, 1,0 e 2,0 µg/ml), o con solo *t-res* (2,0 µg/ml) in presenza o assenza di H₂O₂ (10%). I transefosomi o gli etosomi (0,5, 1,0 e 2,0 µg/ml) o il solo *t-res* (2,0 µg/ml) sono stati aggiunti alle cellule 10 minuti prima dell'aggiunta di H₂O₂ (10%).

Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata determinata tramite l'utilizzo del test di conversione del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolo (MTT) (De Stefano *et al.*, 2007). Brevemente, 100 µl MTT (5 mg/ml in DMEM) sono stati aggiunti alle cellule che sono state incubate per 3h. Successivamente, le cellule sono state lisate ed i cristalli di blu scuro sono stati solubilizzati con 500 µl di soluzione contenente 50% (v:v) N,N-dimetilformamide, 20% (p/v) SDS a pH 4,5.

La densità ottica (OD) di ogni pozzetto è stata misurata allo spettrofotometro con micropiastre (Titertek Multiskan MCCC/340) equipaggiato con un filtro a 620 nm. La vitalità cellulare in risposta al trattamento con i componenti del test è stata calcolata come % di cellule morte = 100-(OD trattate/OD controllo)×100.

Misurazione delle specie reattive dell'ossigeno

La formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata mediante la sonda 2',7'-diclorofluorescein-diacetato (H₂DCFDA) come già descritto (De Stefano *et*

al., 2007). Brevemente, le cellule HaCaT sono state fatte crescere in DMEM contenente 10% (v/v) di siero fetale di bovino, in seguito sono state piastrate con una densità di circa $1,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto ed incubate in terreno di coltura contenente 5 μ M H₂DCF-DA per 2 ore a 37°C. H₂DCF-DA è una molecola permeante non fluorescente che diffonde passivamente nelle cellule dove gli acetati sono clivati dalle esterasi intracellulari per dare H₂DCF e così bloccarlo all'interno della cellula. In presenza di ROS intracellulare, H₂DCF è rapidamente ossidato a 2',7'-diclorofluoresceina (DCF), molecola con una più forte fluorescenza. Le cellule sono state poi lavate due volte con tampone PBS. In seguito, il mezzo è stato sostituito con mezzo fresco e le cellule sono state incubate con transferosomi o etosomi, bianchi o contenenti *t-res* (0,5, 1,0 e 2,0 μ g/ml), o con solo *t-res* (2,0 μ g/ml) in presenza di H₂O₂ (10%). Dopo il trattamento, le cellule sono state lavate due volte con tampone PBS e piastrate in una micropiastra di lettura fluorescente (Perkin Elmer LS55 Luminescence Spectrometer; Perkin Elmer, Beaconsfield, UK). La fluorescenza è stata monitorata usando una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm ed una lunghezza d'onda di emissione di 538 nm. In ogni esperimento, l'aumento di fluorescenza è stato misurato in dieci colture replicate (n=10) per ogni trattamento.

Saggio della perossidazione lipidica

I lipidi perossidati prodotti dalle cellule HaCaT sono stati misurati attraverso il saggio colorimetrico dell'acido tiobarbiturico. Brevemente, le cellule sono state stimulate con H₂O₂ dopo incubazione con i transferosomi o gli etosomi in presenza o assenza di resveratrolo. In seguito, le cellule sono state lavate tre volte con PBS 1x e raschiate con PBS 1x contenente 0,5 mM di EDTA e 1,13 mM di idrossitoluene butilato. La lisi cellulare è stata ottenuta attraverso 6 cicli di congelamento/scongelo. Un millilitro di 10% (p/v) di acido tricloroacetico è stato aggiunto a 450 μ l di cellule lisate. Dopo centrifugazione a 1500 g per 10 minuti, 1,3 ml 0,5% (p/v) di acido tiobarbiturico è stato aggiunto e la miscela è stata riscaldata a 100°C per 20 minuti. Dopo il raffreddamento, è stata registrata la formazione della malonildialdeide (MDA) (A530 nm e A550 nm) con lo spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS-5B. I risultati sono presentati come RFU

Saggio di permeazione *ex vivo* su Franz Cell

La pelle di orecchio di maiale appena tagliata è stata montata sul compartimento recettore delle celle di diffusione di Franz assemblate con il lato dello strato corneo (SC) verso il compartimento donatore. Il compartimento recettore è stato riempito con una miscela etanolo-PBS pH 7,4 3:7 (v/v). Il compartimento donatore è stato invece riempito con 1 ml di sospensione contenente i transferosomi o gli etosomi, bianchi o con il *t-res* o il solo *t-res*. L'area di diffusione tra i due compartimenti risulta essere di 0,6 cm². La velocità di agitazione e la temperatura sono state mantenute a 600 rpm e 37°C, rispettivamente. Ad intervalli prestabiliti (0,5, 1, 2, 4, 6, 24 ore), è stata prelevata un'aliquota di 300 µl del mezzo del compartimento recettore e immediatamente ristabilito il volume iniziale del compartimento con un egual volume di mezzo fresco. La durata dell'esperimento è stata di 24 ore. La concentrazione di *t-res* nel compartimento recettore ed estratto dalla pelle è stata determinata attraverso l'uso del HPLC. Alla fine dell'esperimento, la pelle è stata rimossa dalla cella e lavata brevemente in acqua e metanolo. Il disco di pelle che è stato a contatto con il compartimento donatore, è stato tagliato, riscaldato con aria calda per 20 sec e separato in epidermide e derma in corrispondenza della membrana basale attraverso l'uso di una spatola. Gli strati della pelle sono stati posti in una vial separatamente e il *t-res* è stato estratto con 1 ml di metanolo per 1 ore a temperatura ambiente. Le soluzioni ottenute sono state centrifugate per 30 minuti a 13000 rpm, filtrate su membrane di PVDF con pori da 0,45 µm ed iniettati in HPLC. Il metodo di estrazione è stato validato mediante esperimenti effettuati con vettori privi di resveratrolo. Non sono stati individuati picchi d'interferenza derivanti dal campione di pelle nei controlli.

Caratteristiche dei trasferosomi e degli etosomi contenenti *t-res*

Sono state preparate differenti formulazioni di transfersomi ed etosomi contenenti *t-res*. In particolare, nel caso dei trasferosomi, tre differenti attivatori di membrana, ovvero Tw80, SC e SDC sono stati usati. Nel caso degli etosomi, invece, sono state utilizzate due diverse composizioni lipidiche: SPC ed SCP/chol.

Formulazione	Composizione lipidica	Additivi nel <i>bilayer</i> lipidico (p/p)	Composizione delle fase d'idratazione
Tw80-Trans	SPC	Tw80 (1/9)	PBS
SDC-Trans	SPC	SDC (1/9)	PBS
SC-Trans	SPC	SC (1/9)	PBS
SPC-Etho	SPC	-	Ethanol 40°
SPC/chol-Etho	SPC/chol (2:1 p/p)	-	Ethanol 40°

Tabella 11. Composizione lipidica delle formulazioni dei trasferosomi e degli etosomi preparate.

La composizione delle diverse formulazioni è riportata in tabella 10. Tutte le formulazioni sono state caratterizzate in termine di dimensione, PZ ed incapsulazione di *t-res*, sia subito dopo preparazione che dopo conservazione a 4°C. I risultati sono riportati in tabella 12 e 13.

Formulazione	Tempo (giorni)					
	Dopo preparazione			7		
	Diam. med (nm ± S.D.)	P.I ± SD	ZP ± S.D	Diam. med (nm ± S.D.)	P.I ± SD	ZP ± SD
Tw80-Trans	78,50 ± 1,82	0,37 ± 0,05	-7,09 ± 0,57	77,43 ± 0,47	0,35 ± 0,05	-7,11 ± 0,45
SDC-Trans	111,53 ± 8,36	0,10 ± 0,01	-12,21 ± 0,99	112,23 ± 8,69	0,08 ± 0,04	-12,35 ± 1,03
SC-Trans	105,43 ± 7,92	0,13 ± 0,03	-22,39 ± 0,22	106,00 ± 6,94	0,09 ± 0,02	-21,75 ± 0,38
SPC-Etho	109 ± 6,65	0,17 ± 0,05	-9,92 ± 1,06	102,50 ± 0,11	0,11 ± 0,11	-9,60 ± 1,11
SPC/chol-Etho	102,27 ± 5,26	0,17 ± 0,04	-13,54 ± 0,69	105,37 ± 4,79	0,19 ± 0,01	-12,87 ± 0,77

Tabella 12. Caratterizzazione delle formulazioni preparate in termini di diametro medio, indice di polidispersità (IP) e potenziale Zeta (PZ), dopo preparazione e dopo 7 giorni di conservazione a 4°C.

Formulazione	Tempo (giorni)					
	30			60		
	Diam. med (nm \pm S.D.)	P.I \pm SD	ZP \pm SD	Diam. med (nm \pm S.D.)	P.I \pm SD	ZP \pm SD
Tw80-Trans	80,07 \pm 1,29	0,35 \pm 0,02	-7,15 \pm 0,39	78,37 \pm 1,76	0,33 \pm 0,05	-7,10 \pm 0,42
SDC-Trans	111,97 \pm 8,44	0,10 \pm 0,05	-11,62 \pm 1,10	110,7 \pm 3,7	0,10 \pm 0,06	-11,52 \pm 1,08
SC-Trans	106,23 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03	-23,24 \pm 0,49	105,5 \pm 6,93	0,12 \pm 0,02	-22,19 \pm 0,75
SPC-Etho	106,20 \pm 13,15	0,18 \pm 0,12	-9,77 \pm 1,13	91,57 \pm 0,49	0,20 \pm 0,02	-9,95 \pm 1,01
SPC/chol-Etho	121,07 \pm 10,75	0,18 \pm 0,03	-12,81 \pm 0,21	132,8 \pm 8,77	0,23 \pm 0,10	-13,02 \pm 0,33

Tabella 13. Caratterizzazione delle formulazioni preparate in termini di diametro medio, indice di polidispersità (IP) e potenziale Zeta (PZ), dopo 30 e 60 giorni di conservazione a 4°C.

Nel caso dei transferosomi, cioè per le formulazioni Tw80-Trans, SDC-Trans and SC-Trans, le vescicole hanno un diametro medio rispettivamente di circa 78,5, 111,5 e 105,4 nm. Il tipo di tensioattivo influenza in maniera significativa la distribuzione dimensionale. Infatti, i trasferosomi a base di SC e SDC mostrano un IP di 0,15, mentre per la formulazione a base di Tw80 è stato trovato un IP di circa 0,3. Le caratteristiche dimensionali non cambiano in maniera significativa durante la conservazione a 4°C per 60 giorni. Tw80-Trans, SDC-Trans e SC-Trans mostrano un PZ di circa -7, -13 e -22 mV rispettivamente, senza significative variazioni durante la conservazione.

Nel caso degli etosomi, cioè delle formulazioni SPC-Etho e SPC/chol-Etho, le caratteristiche dimensionali misurate subito dopo preparazione non sono influenzate dalla composizione lipidica. In particolare è stato trovato che per entrambe le formulazioni, il diametro medio risulta essere compreso tra 92,5 e 94,0 nm con un IP di circa 0,2. Ad ogni modo, le caratteristiche dimensionali degli etosomi aumentano in maniera significativa durante la conservazione a 4°C, con un progressivo incremento delle dimensioni medie, mentre l'IP rimane invariato. La presenza del colesterolo non aumenta in maniera significativa la stabilità fisica. Infine, SPC-Etho ed SPC/chol-Etho mostrano un PZ di circa -9 e -13 mV rispettivamente, senza significative variazioni durante la conservazione.

Incapsulazione del *t*-res nei transferosomi e negli etosomi

Nelle nostre condizioni sperimentale, l'analisi HPLC del *t*-res ha rilevato la presenza di un unico picco cromatografico al tempo di ritenzione (TR) di circa 5 min. Nelle stesse condizioni, una soluzione acquosa di *t*-res precedentemente esposta alla

luce solare, presenta un ulteriore picco cromatografico con tempo di ritenzione di circa 7 min. In accordo con la letteratura, questo secondo picco è stato attribuito all'isomero *cis* del resveratrolo. In tutti i casi, l'analisi HPLC del *t-res* estratto dai *nanocarriers* ha mostrato un picco cromatografico con TR di 5 min, mentre non è stato riscontrato nessun picco del *cis-resveratrolo* (dati non mostrati). L'incapsulazione del *t-res* all'interno delle differenti formulazioni è riportata in tabella 14.

Formulazione	Actual loading ($\mu\text{g } t\text{-res/mg SPC} \pm \text{S.D.}$)			
	Dopo preparazione	Dopo 7 giorni di conserv. 4°C	Dopo 30 giorni di conserv. 4°C	Dopo 60 giorni di conserv. 4°C
Tw80-Trans	2,49 \pm 0,44	2,39 \pm 0,42	2,30 \pm 0,57	1,36 \pm 0,61
SDC-Trans	2,49 \pm 0,30	2,35 \pm 0,34	2,03 \pm 0,23	1,96 \pm 0,09
SC-Trans	2,39 \pm 0,23	1,83 \pm 0,35	1,94 \pm 0,39	1,73 \pm 0,12
SPC-Etho	1,75 \pm 0,07	1,72 \pm 0,01	1,57 \pm 0,41	1,23 \pm 0,31
SPC/chol-Etho	1,76 \pm 0,15	1,64 \pm 0,02	1,37 \pm 0,11	1,23 \pm 0,30

Tabella 14. Actual loading del *t-res* nei transferosomi e negli etosomi, subito dopo preparazione e dopo conservazione a 4°C.

Nel caso dei transferosomi, è stata ottenuta la più alta efficienza d'incapsulazione. In particolare, è stata riscontrata un'incapsulazione di circa 2,5 $\mu\text{g/mg}$ SPC nel caso dei Tw80-Trans e dei SDC-Trans (efficienza d'incapsulazione di circa 100%) e circa 2,4 $\mu\text{g/mg}$ SPC nel caso dei SC-Trans (efficienza d'incapsulazione di circa 95,6%). Rispetto ai transferosomi, le formulazioni a base di etosomi mostrano una efficienza d'incapsulazione più bassa. In particolare, gli etosomi hanno un'incapsulazione di *t-res* di circa 1,8 $\mu\text{g/mg}$ SPC (efficienza d'incapsulazione di circa 70%), senza significative differenze tra le due formulazioni.

Il rilascio di *t-res* è stato monitorato durante la conservazione a 4°C a tempi diversi. A seconda della formulazione considerata è stato osservato un differente rilascio di *t-res* durante il tempo. La formulazione Tw80-Trans mostra un rilascio di *t-res* di circa l'8% nei primi 30 giorni di conservazione, mentre per le altre due formulazioni il rilascio di *t-res* risulta essere di circa il 18 e 20% rispettivamente. Dopo ulteriori 30 giorni di conservazione, è stato osservato un rilascio di *t-res* pari al 40,8, 3,45 e 10,8% per le formulazioni Tw80-Trans, SDC-Trans and SC-Trans, rispettivamente.

Per quanto riguarda gli etosomi, la perdita di *t-res* durante la conservazione a 4°C, risulta essere di circa il 10,3 e 22,1% dopo 30 giorni di conservazione e di ulteriori 21,6 e 10,2% dopo altri 30 giorni per le formulazioni SPC-Etho e SPC/chol-Etho rispettivamente (tabella 14).

Effetto dei transferosomi e degli etosomi contenenti *t-res* sulla vitalità cellulare

L'esposizione delle cellule HaCaT alle formulazioni bianche di transferosomi (figura 4) o degli etosomi (figura 5) per 24 ore causa una riduzione generale della vitalità cellulare, rispetto alle cellule non trattate. Inoltre, la più alta tossicità è stata osservata nel caso della formulazione contenente Tw80 (figura 4 A). Invece, il *t-res* incapsulato all'interno dei nanocarrier annulla questo effetto in maniera concentrazione dipendente (figura 4 e 5). In particolare, SDC-Trans o SC-Trans e SPC-Etho o SPC/chol-Etho non influenzano in maniera significativa la vitalità cellulare (figura 4 e 5). Infine, il solo *t-res*, alle più alte concentrazioni usate nei carrier (2 µg/ml) non è risultato citotossico (figure 4 e 5).

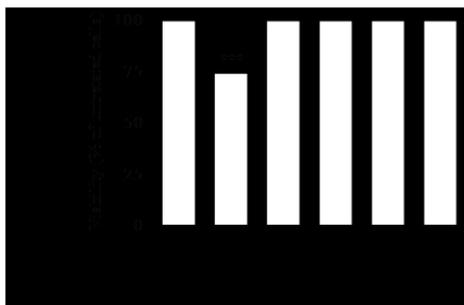


Figura 4. Saggio di vitalità cellulare MTT su cellule HaCaT. Le cellule sono state incubate con le formulazioni di transferosomi contenenti Tw80 (A), SDC (B) o SC (C), in presenza o assenza di *t-res*. I dati sono media \pm S.E.M di sei esperimenti eseguiti in triplicato. *** $p < 0.001$ vs. cellule non stimulate.



Figura 5. Saggio di vitalità cellulare MTT su cellule HaCaT. Le cellule sono state incubate con le formulazioni degli etosomi SPC o SPC/chol, in presenza o assenza di *t-res*. I dati sono media \pm S.E.M di sei esperimenti eseguiti in triplicato. *** $p < 0.001$ vs. cellule non stimulate.

Effetto dei transferosomi e degli etosomi contenenti *t-res* sulla produzione di ROS intracellulare

L'incubazione delle cellule con le formulazioni bianche di Tw80-Trans, SDC-Trans e SC-Trans non causa un significativo aumento dei ROS intracellulari, rispetto alle cellule non trattate (figura 6). L'incubazione delle cellule con H₂O₂ comporta un forte aumento della produzione di ROS, che è fortemente inibita, in maniera concentrazione dipendente, da Tw80-Trans (61,93 ± 0,16%, 33,94 ± 0,13% e 11,01 ± 0,21%, rispettivamente; *n* = 12), SDC-Trans (48,17 ± 0,14%, 33,49 ± 0,11% e 22,01 ± 0,07%, rispettivamente; *n* = 12) o SC-Trans (62,40 ± 0,20%, 50,91 ± 0,10% e 42,70 ± 0,19%, rispettivamente; *n* = 12).

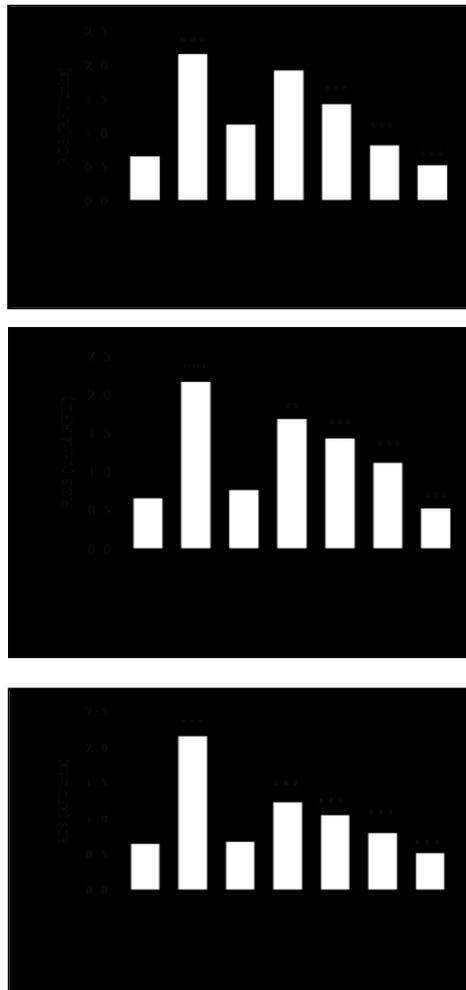


Figura 6. Effetto dei transferosomi SPC/Tw80, (A), SPC/SDC (B) o SPC/SC (C) in presenza o assenza di *t-res* sulla produzione di ROS in cellule HaCat stimulate con H₂O₂ per 24 ore. I dati sono la media ± S.E.M. di sei esperimenti in triplicato. °°°*p*<0.01 vs. cellule non stimulate; ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. H₂O₂.

Nel caso degli etosomi, l'aggiunta delle formulazioni bianche di SPC-Etho o SPC/chol-Etho causa un aumento dell'accumulo di ROS che è significativamente ridotta sia da SPC-Etho ($7,42 \pm 0,13\%$, $25,00 \pm 0,09\%$ e $34,37 \pm 0,08\%$, rispettivamente; $n = 12$) che da SPC/chol-Etho ($23,44 \pm 0,13\%$, $36,33 \pm 0,09\%$ e $41,79 \pm 0,09\%$, rispettivamente; $n = 12$). Il *t-res* da solo, alle più alte concentrazioni ($2 \mu\text{g/ml}$), inibisce significativamente la generazione di ROS ($27,34 \pm 0,19\%$; $n = 12$) (figure 3 e 4).



Figura 7. Effetto degli etosomi SPC o SPC/chol in presenza o assenza di *t-res* sulla produzione di ROS in cellule HaCat stimulate con H_2O_2 per 24 ore. I dati sono la media \pm S.E.M. di sei esperimenti in triplicato. $^{\circ\circ\circ}p < 0.01$ vs. cellule non stimulate; $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ vs. H_2O_2 .

Effetto dei transferosomi e degli etosomi contenenti *t-res* sulla perossidazione lipidica

Per capire se i transferosomi o gli etosomi sono in grado di prevenire la perossidazione lipidica indotta da H_2O_2 è stato effettuato il saggio MDA. L'incubazione delle cellule con H_2O_2 comporta un aumento della generazione dei lipidi perossidati (figura 8 e 9). L'incubazione delle cellule con le formulazioni bianche di Tw80-Trans causa un significativo aumento della perossidazione dei lipidi. Questo effetto è fortemente revertito quando le cellule sono incubate con Tw80-Trans ($46,76 \pm 0,14\%$, $n = 6$). L'incubazione delle cellule con SDC-Trans, bianchi o contenenti *t-res*, riduce significativamente la perossidazione lipidica ($53,96 \pm 0,08\%$ per SDC-Trans; $n = 6$). Nel caso invece della formulazione bianca SC-Trans, si osserva una riduzione della perossidazione lipidica, tale effetto è ulteriormente accentuato quando le formulazioni contengono *t-res* ($41,73 \pm 0,11\%$, $n = 6$).

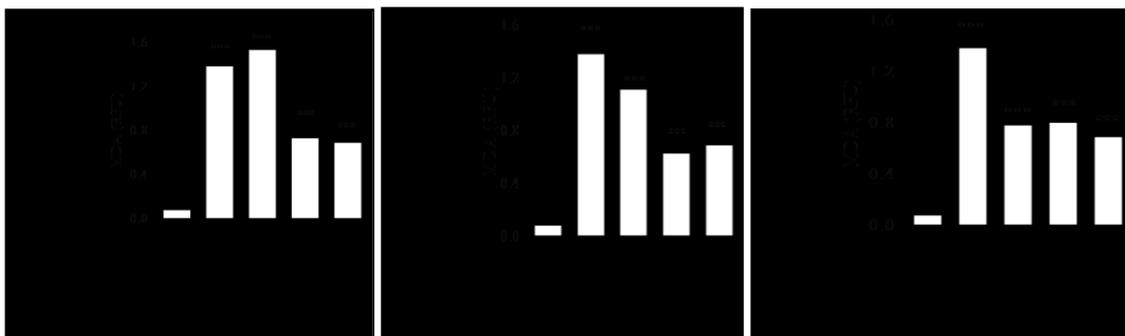


Figura 8. Effetto dei transferosomi SPC/Tw80 (A), SPC/SDC (B) o SPC/SC (C) in assenza o presenza di *t*-res, sulla perossidazione lipidica in cellule HaCat stimulate con H₂O₂ per 24 ore. I dati sono la media ± S.E.M. di sei esperimenti. °°°p<0.01 vs. cellule non stimulate; ***p<0.001 vs. H₂O₂.

Infine, l'incubazione delle cellule con le formulazioni bianche di SPC-Etho o SPC/chol-Etho inibiscono significativamente la perossidazione lipidica. Questo effetto è aumentato, ma non in maniera significativa, quando le cellule sono incubate con le formulazioni etosomiali contenenti il *t*-res ($34,53 \pm 0,12\%$ e $36,69 \pm 0,12\%$, rispettivamente; $n = 6$) (figure 8 e 9).



Figura 8. Effetto degli etosomi SPC o SPC/chol in assenza o presenza di *t*-res, sulla perossidazione lipidica in cellule HaCat stimulate con H₂O₂ per 24 ore. I dati sono la media ± S.E.M. di sei esperimenti. °°°p<0.01 vs. cellule non stimulate; ***p<0.001 vs. H₂O₂.

Saggio di permeazione *ex vivo* su Franz Cell

Mediante l'utilizzo delle celle di Franz è stata studiata la permeazione del *t*-res attraverso la pelle di maiale. Nel compartimento recettore sono stati caricati 0,1 mg/ml del solo *t*-res o del *t*-res incapsulato all'interno dei carrier. I risultati sono mostrati in figura 7. Dopo 24 ore di incubazione non è stata osservata la permeazione del *t*-res da solo (i dati mostrano solo fino a 6 ore), ne tantomeno quando incapsulato all'interno dei transferosomi o degli etosomi SPC/chol-Etho. Al contrario, nel caso della formulazione SPC-Etho è stato osservato un aumento della permeazione del *t*-res. Infatti, quando la formulazione SPC-Etho è posta in contatto con la pelle, si osserva la permeazione del *t*-

res già dopo 1h e dopo solo 6 ore dall'applicazione, si osserva il passaggio dell'intera dose.

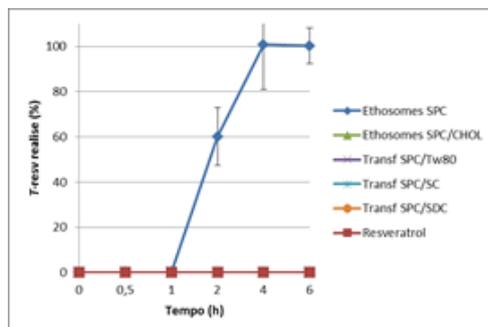


Figure 7. Permeazione del *t*-res attraverso la cute di maiale.

DISCUSSIONE

In questo studio, abbiamo studiato la possibilità di sviluppare nanocarrier concepiti per la somministrazione topica del *t-res*. I transferosomi (Cevc *et al.*, 2008) e gli etosomi (Ainbinder *et al.*, 2010) sono stati oggetto di questo lavoro in quanto noti carrier in grado di promuovere l'accumulo e/o il passaggio nella/attraverso la cute. In particolare, sono state sviluppate differenti formulazioni di transferosomi ed etosomi contenenti *t-res*. La prima parte del lavoro è stato incentrato sulle caratteristiche tecnologiche dei carrier. In particolare, è stata valutata l'influenza della composizione lipidica sulle caratteristiche tecnologiche delle formulazioni, in particolar modo valutando la stabilità delle vescicole durante la conservazione. Le caratteristiche dimensionali delle vescicole dipendono dal tipo di nanocarrier e dalla sua composizione. Nel caso dei transferosomi, sono state osservate differenze nel diametro medio tra le diverse formulazioni. Effettivamente, i transferosomi contenenti Tw80 hanno mostrato un diametro medio significativamente più piccolo rispetto alle formulazioni SDC-Trans o SC-Trans. Inoltre, la formulazione SPC/Tw80 risulta essere molto più eterogenea, in termini di dimensioni, come indicato dall'IP. E' anche noto che il tipo di tensioattivo (grado di HBL) influenzi le dimensioni delle vescicole (El Zaafarany *et al.*, 2010). Bisogna però sottolineare che le formulazioni SDC-Trans e SC-Trans sono state dimensionate tramite l'utilizzo dell'estrusore su membrane di policarbonato a porosità decrescente, mentre, per le vescicole contenenti Tw80 l'estrusione ha portato ad un forte schiumeggiamento costringendo ad utilizzare la sonicazione per dimensionamento delle vescicole. In questo modo, sia il tipo di tensioattivo che la metodica di dimensionamento possono giustificare le caratteristiche dimensionali delle formulazioni Tw80-Trans.

Nel caso degli etosomi, non sono state evidenziate significative variazioni del diametro medio tra le due formulazioni. Tutte le formulazioni sono stabili durante la conservazione a 4°C fino a due mesi.

Tutte le formulazioni hanno un'elevata efficienza di incapsulazione, in maniera particolare nel caso dei transferosomi. Il processo d'incapsulazione dei farmaci lipofili nelle vescicole lipidiche dovrebbe essere guidato dalla solubilità del farmaco nella fase lipidica e dal coefficiente di ripartizione tra la fase lipidica e quella acquosa. L'alta

solubilità del *t-res* nella soluzione organica contenenti i lipidi e la bassa solubilità in acqua favorisce l'alto incapsulazione all'interno dei transferosomi. Per quanto riguarda gli etosomi, invece, la presenza dell'etanolo al 40% aumenta la solubilità del *t-res* nella fase d'idratazione, ciò potrebbe spiegare una più bassa efficienza d'incapsulazione.

E' stato inoltre valutato il rilascio di *t-res* dalle vescicole durante la conservazione a 4°C. In tutte le formulazioni è stato osservato un rilascio significativo di *t-res* a diversi tempi, dipendente dal tipo di formulazione. Esistono differenti fattori che condizionano il rilascio di molecole lipofile dalle vescicole, ad esempio il coefficiente di ripartizione della molecola, la fluidità del *bilayer* e le dimensioni delle vescicole. Il resveratrolo è una molecola lipofila (logP 3,1) con una bassa solubilità in acqua (circa 0,01 mol/l). In questo caso, quindi, il logP del resveratrolo promuove l'alta efficienza d'incapsulazione nelle vescicole ma può anche consentire la diffusione della stessa attraverso il *bilayer*. Inoltre, la diffusione può anche essere favorita dall'alta fluidità della membrana e le dimensioni molto piccole possono incrementare il rilascio del farmaco dalle vescicole a causa della loro alta superficie di contatto con il mezzo di rilascio. Nel nostro studio, abbiamo osservato un lento rilascio di *t-res* dalle vescicole, differente a seconda del tipo di formulazione. Il più alto rilascio è stato osservato per la formulazione Tw80-Trans (più del 50% della quantità iniziale di *t-res* caricata), mentre per le altre formulazioni è stata osservata una perdita di *t-res* compresa tra il 21 ed il 30% dopo due mesi di conservazione a 4°C. Questo alto tasso di rilascio di *t-res* dalla formulazione Tw80-Trans potrebbe essere giustificato da un effetto tensioattivo più marcato del polisorbato sulla membrana delle vescicole (El Zaafarany *et al.*, 2010). Proprio a causa di questo rilascio di *t-res* dalle vescicole, tutti gli esperimenti biologici sono stati effettuati con formulazioni preparate *ex novo*.

Per quanto riguarda gli studi sulle cellule, è ben nota la tossicità dei tensioattivi, sebbene un certo numero di quest'ultimi siano stati approvati come eccipienti per uso farmaceutico (Handbook of pharmaceutical excipients). Nei nostri esperimenti è stato dimostrata una discreta tossicità in tutte le formulazioni contenenti un tensioattivo. Questo dato, però, era aspettato a causa della loro azione detergente sulle membrane cellulari. È però opportuno ricordare che, i nanocarrier contenenti un tensioattivo hanno dimostrato una tossicità inferiore rispetto a quella dei singoli componenti (Muller *et al.*, 1997).

In questo studio, i nanocarrier hanno dimostrato possedere una diversa citotossicità a seconda del tipo di tensioattivo incorporato e dalla presenza di *t-res*. Infatti, è stata osservata una più alta tossicità della formulazione bianca Tw80-Trans, rispetto a quella SDC-Trans e SC-Trans. E' stata già riportata in letteratura una tossicità dipendente dalla concentrazione dei nanocarrier contenenti Tw80 sulle cellule HaCaT (Weyenberg *et al.*, 2007). I dati ottenuti possono essere spiegati proprio grazie alla forte attività detergente sulle membrane cellulare del Tw80 ed un'attività aut ossidante con conseguente aumento della concentrazione di ROS (Yao *et al.*, 2009). Inoltre, negli esperimenti condotti sulle cellule in assenza di stimolo (senza H₂O₂) è stata osservata un aumento della produzione di ROS indotta dalle formulazioni bianche Tw80-Trans. Questo effetto, però, non è stato osservato con le formulazioni bianche SDC-Trans ed SC-Trans. Questa ipotesi è inoltre confermata dal saggio MDA in cui è stata riscontrata un'alta perossidazione lipidica quando le cellule sono state incubate con la formulazione bianca Tw80-Trans ma non con le formulazioni SDC-Trans e SC-Trans. Quando però, nella formulazione Tw80-Trans è presente il *t-res*, è stata osservata una forte riduzione della produzione di ROS e della perossidazione lipidica rispetto ai carrier bianchi. Questi dati sono concordi con la riduzione della tossicità osservata con Tw80-Trans rispetto alla formulazione bianca. Nel caso degli etosomi, è stata osservata una significativa citotossicità con le formulazioni bianche SPC-Etho e SPC/chol-Etho. Inoltre, quando le cellule sono incubate con le formulazioni etosomiali contenenti *t-res*, ovvero SPC-Etho ed SPC/chol-Etho, è stata osservata una tossicità più bassa rispetto ai transferosomi concentrazione dipendente. Questi risultati sono stati confermati dal saggio dei ROS, in cui un'elevata concentrazione di questi è stata osservata nelle cellule incubate con gli etosomi bianchi. Inoltre, l'incubazione delle cellule con le formulazioni SPC-Etho e SPC/chol-Etho è stata osservata una riduzione della produzione di ROS rispetto all'incubazione coi *carrier* bianchi, in modo particolare alla più alta concentrazione di *t-res*. Da ciò si evince che la citotossicità degli etosomi può essere attribuita all'elevata produzione di ROS che però può essere limitata dalla presenza del *t-res*. Inoltre, è da sottolineare che a differenza delle formulazioni contenenti il Tw80, la citotossicità degli etosomi non è correlata con la perossidazione lipidica, che in questo caso è ridotta dalla presenza degli etosomi sia bianchi che contenenti *t-res*. E' possibile quindi ipotizzare che, nel caso degli etosomi, l'etanolo sia il maggiore responsabile

della tossicità cellulare. Inoltre, i nostri dati mettono in evidenza un diverso meccanismo d'azione che giustifica la diversa tossicità osservata nel caso del Tw80 e l'etanolo contenuti nei nanocarrier. Ulteriori esperimenti dovrebbero chiarificare questo aspetto.

E' noto in letteratura che sia i transferosomi che gli etosomi sono in grado di aumentare il passaggio e l'accumulo di farmaci nella pelle, se paragonati ai liposomi. (Feng *et al.*, 2008). Il tensioattivo o l'etanolo potrebbero aumentare la deformabilità del *bilayer* lipidico. In alternativa, l'interazione tra l'etanolo o il tensioattivo con i lipidi dello *stratum corneum* potrebbe ridurre la temperatura di transizione di quest'ultimi, aumentare la sua fluidità e promuovere la permeazione dei farmaci (Feng *et al.*, 2008). In questo studio sono stati effettuati saggi *ex-vivo* dimostrando che solamente la formulazione SPC-Etho consente il trasporto di resveratrolo attraverso la pelle di maiale dopo appena 6 ore (100%), mentre non è stata osservata la permeazione di *t-res* non incapsulato in alcun veicolo (sciolto in acqua e messo a contatto con la pelle). Da questi dati è possibile speculare che l'etanolo, che è in grado di agire da promotore di assorbimento ed è in grado di aumentare fluidità del *bilayer*, potrebbero essere essenziali nel promuovere la permeazione del *t-res* attraverso la pelle. Infatti, l'uso dei liposomi ultra flessibili, quali i transferosomi, non è sufficiente per il passaggio del *t-res*. L'uso del colesterolo, che tipicamente viene utilizzato per aumentare la rigidità delle membrane, annulla completamente l'effetto dell'etanolo.

CONCLUSIONI

In questo studio è stata investigata la possibilità di veicolare il *t-res* attraverso la pelle. In particolare, abbiamo dimostrato che tutte le formulazioni hanno ottenuto un'elevata efficienza d'incapsulazione di *t-res*. È stato dimostrato che la tossicità dei nanocarrier è strettamente correlata al tipo di tensioattivo usato nelle formulazioni. Il polisorbato 80 e l'etanolo sono sicuramente gli additivi più tossici *in vitro*. Tuttavia, la presenza del *t-res* può avere un effetto protettivo sulle cellule, riducendo la formazione di ROS e della perossidazione lipidica. Infine, solo la formulazione etosomiale a base di SPC è stata in grado di promuovere il passaggio del *t-res* (una molecola che sta suscitando un crescente interesse in ambito dermatologico), attraverso la cute. È quindi possibile proporre gli etosomi quali *carrier* per promuovere la veicolazione del *t-res* attraverso la cute. Sarà necessario valutare tutti i problemi relativi alla stabilità delle preparazioni prima di proporle per applicazioni commerciali.

BIBLIOGRAFIA

Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003. Jan 1;186(1):28-37.

Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004. Sep-Oct;24(5A):2783-840.

Agrawal A.K., Gupta C.M. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Adv Drug Deliv Rev,* 2000. 41:135–46.

Agrawal S., R. Zhang, Pharmacokinetics of oligonucleotides, *Ciba Found. Symp.* 1997. 209 60-75.

Ahmad N., Adhami V.M., Afaq F., Feyes D.K. and Mukhtar H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin. Cancer Res.* 2001. 7(5): 1466-1473.

Ainbinder D, Paolino D, Fresta M, Touitou E. Drug delivery applications with ethosomes. *J Biomed Nanotechnol.* 2010. Oct;6(5):558-68.

Ainbinder, D., Touitou, E., Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Deliv.* 2005. 12, 297–303.

Akhtar S., R. Kole, R.L. Juliano, Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera, *Life Sci.* 1991. 49 1793-1801.

Alberts DS, Muggia FM, Carmichael J, et al. 2004. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in phase I/II clinical trials. *Semin Oncol,* 31(Suppl 13):53–90.

Allen C, Dos SN, Gallagher R, et al. 2002 Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). *Biosc Rep*, 22:225–50.

Allen TM, Hansen C, Martin F, et al. 1991. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1066:29–36.

Allen TM, Hansen C, Rutledge J. 1989. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim Biophys Acta*, 981:27–35.

Alving CR. 1978. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome encapsulated drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75:2959–63.

Basu MK, Lala S. 2004. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. *Curr Mol Med*, 4:681–9.

Bennett CF, Chiang MY, Chan H, et al. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 1992. ;41(6):1023-33.

Bennett CF, Mirejovsky D, Crooke RM, et al. Structural requirements for cationic lipid mediated phosphorothioate oligonucleotides delivery to cells in culture. *J Drug Target* 1998. 5(3):149-62.

Berry G., M. Billingham, E. Alderman, P. Richardson, F. Torti, B. Lum, A. Patek, F. J. Martin, The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS Kaposi's sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Ann. Oncol.* 1998, 9, 711.

Bertelli A.A., Giovannini L., Stradi R., Bertelli A. and Tillement J.P. Plasma, urine and tissue levels of trans and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int. J. Tissue React.* 1996. 18 (2-3): 67-71.

Bertelli A.A., Giovannini L., Stradi R., Urien S., Tillement J.P. and Bertelli A. Evaluation of Kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1998. 24 (1): 51-55.

Blume GaCG. 1993. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo*. *Biochim Biophys Acta*, 1146:157-68.

Boinpally, R.R., Zhou, S.L., Poondru, S., Devraj, G., Jasti, B.R., Lecithin vesicles for topical delivery of diclofenac. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003. 56, 389-392.

Bommer G.T., Gerin I., Feng Y., Kaczorowski A.J., Kuick R., p53- mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 2007. 17: 1298-1307.

Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002. 54, S41-S55.

Brakenhielm E., Cao R. and Cao Y. Sippression of angiogenesis, healing by resveratrol, a natural compound in red wine and tumor growth, and wound grapes. *Faseb J.* 2001. 15: 1798-1800.

Cao Y., Cao R. and Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J. of Nutr. Biochem.* 2002. 13: 380-390.

Capaccioli S, Di Pasquale G, Mini E, et al. Cationic lipids improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197(2):818-25.

Cevc G, Mazgareanu S, Rother M. Preclinical characterisation of NSAIDs in ultradeformable *carriers* or conventional topical gels. *Int J Pharm.* 2008 Aug 6;360(1-2):29-39.

Cevc, G., Blume, G., Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug *carriers*, Transfersomes. *Biochim. Biophys. Acta* 2003. 1614, 156–164.

Cevc, G., Blume, G., Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug *carriers* have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochim. Biophys. Acta* 2004. 1663, 61–73.

Cevc, G., Blume, G., Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* 1992. 1104, 226–232.

Cevc, G., Blume, G., New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug *carriers*, Transfersomes. *Biochim. Biophys. Acta* 2001. 1514, 191–205.

Cevc, G., Blume, G., Schatzlein, A., Transdermal drug *carriers*: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *J. Control. Release* 1995. 36, 3–16.

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schatzlein, A., Blume, G., Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim. Biophys. Acta* 1998. 1368, 201–215.

Cevc, G., Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable *carriers*. *Clin. Pharmacokinet.* 2003. 42, 461–474.

Chang T.C., Wentzel E.A., Kent O.A., Ramachandran K., Mullendore M., et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007. 26: 745–752.

Chen X, He H, Wang G, Yang B, Ren W, Ma L, Yu Q. Stereospecific determination of *cis*- and *trans*-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr.* 2007 Mar; 21(3):257-65.

Chen, C.J., Han, D.D., Cai, C.F., Tang, X., An overview of liposome lyophilisation and its future potential. *J. Control. Release* 2010. 142, 299–311.

Choi, M.J., Maibach, H.I., Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2005.18, 209–219.

Chonn A, Cullis PR, Devine DV. 1991. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol*, 146:4234–41.

Chonn A., P.R. Cullis, Recent advances in liposomal drug delivery systems, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 1995. 698-708.

Corney D.C., Flesken-Nikitin A., Godwin A.K., Wang W., Nikitin A.Y. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* 2007. 67: 8433–8438.

Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ (2007) Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol* 6: 1073–1085.

Crooke S.T., M.J. Graham, J.E. Zuckerman, D. Brooks, B.S. Conklin, L.L. Cummins, M.J. Greig, C.J. Guinosso, D. Kornbrust, M. Manoharan, H.M. Sasmor, T. Schleich, K.L. Tivel, R.H. Grije, Pharmacokinetic properties of several novel oligonucleotide analogs in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277 (1996) 923-937.

Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998. 60, 73–103.

Crowe, J.H., Oliver, A.E., Hoeckstra, F.A., Crowe, L.M., Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. *Cryobiology* 1997. 35, 20–30.

Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, De Matos C, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax.* 2003 Nov;58(11):942-6.

Damen J. 2005. Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high-density lipoproteins: dependence on cholesterol and phospholipid composition. *Biochim Biophys Acta*, 665:538–45.

Dayan, N., Touitou, E., *Carriers* for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials* 2000. 21, 1879–1885.

de Antonellis P, Medaglia C, Cusanelli E, Andolfo I, Liguori L, De Vita G, Carotenuto M, Bello A, Formiggini F, Galeone A, De Rosa G, Virgilio A, Scognamiglio I, Sciro M, Basso G, Schulte JH, Cinalli G, Iolascon A, Zollo M. MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15+/CD133+ tumor-propagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma. *PLoS One.* 2011. 6(9):e24584.

De Rosa G, De Stefano D, Galeone A. Oligonucleotide delivery in cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010 Nov;7(11):1263-78.

De Rosa G, De Stefano D, Laguardia V, et al. Novel cationic liposome formulation for the delivery of an oligonucleotide decoy to NF-kappaB into activated macrophages. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70(1):7-18.

De Stefano D, Maiuri MC, Simeon V, Grassia G, Soscia A, Cinelli MP, Carnuccio R. Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jul 2;566(1-3):192-9.

Deo, M.R., Sant, V.P., Parekh, S.R., Khopade, A.J., Banakar, U.V., Proliposome-based transdermal delivery of levonorgestrel. *J. Biomater. Appl.* 1997. 12, 77–88.

Docherty JJ, Fu MM, Hah JM, Sweet TJ, Faith SA, Booth T. Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the mouse. *Antiviral Res.* 2005 Sep;67(3):155-62.

Docherty JJ, McEwen HA, Sweet TJ, Bailey E, Booth TD. Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jun;59(6):1182-4.

Docherty JJ, Smith JS, Fu MM, Stoner T, Booth T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. *Antiviral Res.* 2004 Jan;61(1):19-26.

Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE, Barnes PJ. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Oct;287(4):L774-83.

Dreborg S, Akerblom EB. Immunotherapy with monomethoxypolyethylene glycol modified allergens. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1990. 315–65.

Drummond DC, Meyer O, Hong K, et al. 1999. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev*, 51:691–743.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W. Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001b. 53, 1311– 1322.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W., Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001a. 53, 1069–1077.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W., Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J. Pharm. Pharmacol.* 2006. 58, 415–429.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W., Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999. 51, 1123–1134.

El Zaafarany GM, Awad GA, Holayel SM, Mortada ND. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *Int J Pharm.* 2010 Sep 15;397(1-2):164-72.

Elsayed, M.M., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M., Deformable liposomes and ethosomes as *carriers* for skin delivery of ketotifen. *Pharmazie* 2007. 62, 133–137.

Embree L., Gelmon K., Tolcher A., Hudon N., Heggie J., Dedhar C., Logan P., Bally M.B., Mayer L.D., Pharmacokinetic behavior of vincristine sulfate following administration of vincristine sulfate liposome injection, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998. 41 347-352.

Fabbrocini G, Staibano S, De Rosa G, Battimiello V, Fardella N, Ilardi G, La Rotonda MI, Longobardi A, Mazzella M, Siano M, Pastore F, De Vita V, Vecchione ML, Ayala F. Resveratrol-containing gel for the treatment of acne vulgaris: a single-blind, vehicle-controlled, pilot study. *Am J Clin Dermatol*. 2011 Apr 1;12(2):133-41.

Fan, E., Zhang, K., Jiang, S., Yan, C., and Bai, Y. Analysis of *Trans*-Resveratrol in Grapes by Micro-High Performance Liquid Chromatography. *Anal.Sci*. 2008. 24(8):1019-23).

Feng M, Cai Q, Huang H, Zhou P. Liver targeting and anti-HBV activity of reconstituted HDL-acyclovir palmitate complex. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008 Mar;68(3):688-93.

Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000. 66: 663-673.

Funato KYRKH. 1992. Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1103:204.

Gabizon A, Papahadjopoulos D. 1988. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:6949–53.

Gescher A.J., Steward W.P. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003. Oct;12(10):953-7.

Gilbertson R.J., Ellison D.W. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* 2008. 3: 341–365.

Gulati M, Grover M, Singh S, et al. 1998. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm*, 165:129–68.

Gusman J., Malonne H., Atassi G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*. 2001. Aug;22(8):1111-7.

Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN, Influence of tumour size on uptake of(111)In-DTPA-labelled pegylated liposomes in a human tumour xenograft model. *Br J Cancer*, 2000a. 83:684–8.

Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN., Biodistribution and pharmacokinetics of 111In-DTPA-labelled pegylated liposomes in a human tumour xenograft model: implications for novel targeting strategies. *Br J Cancer*, 2000b 83:232–8.

Harris JM. Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. *Plenum Press*. 1992

He L., He X., Lim L.P., de Stanchina E., Xuan Z., A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007. 447: 1130–1134.

Henry S.P., P.C. Giclas, J. Leeds, M. Pangburn, C. Auletta, A.A. Levin, D.J. Kornbrust, Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281 (1997) 810-816.

Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 2007. 12: 414 418.

Hofland, H.E., Bouwstra, J.A., Bodde, H.E., Spies, F., Junginger, H.E., Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *Br. J. Dermatol.* 1995.132, 853–866.

Honeywell-Nguyen, P.L., Bouwstra, J.A., Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov. Today: Technol.* 2005. 2, 67–74.

Hope M.J., Mui B., Ansell S., Ahkong Q.F., Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs, *Mol. Membr. Biol.* 15 (1998) 1-14.

Hsieh T.C., and Wu J.M. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp. Cell. Res.* 1999a. 249 (1): 109-115.

Hsieh T.C., Juan G., Darzynkiewicz Z. and Wu J.M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21 (WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.* 1999b. 59 (11): 2596-2601.

Huang YH, Bao Y, Peng W, et al. Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009. 106(9):3426-30.

Hung CF, Lin YK, Huang ZR, Fang JY. Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. *Biol Pharm Bull.* 2008 May;31(5):955-62.

Immordino M.L., Dosio F., Cattel L.. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine.* 2006. 1(3):297-315.

Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C. and Pezzuto J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Scienze* 1997. 275: 218-220.

Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem* 2002. 50: 2731-2741.

Joe A.K., Liu H., Suzui M., Vural M.E., Xiao D., Weinstein I.B. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2002. Mar;8(3):893-903.

Juan M.E., Lamuela-Raventos R.M., Dela Torre-Boronat M.C. and Planas J.M. Determination of trans-resveratrol in plasma by HPLC. *Anal. Chem.* 1999. 71 (3): 747-750.

Katahira, N., Murakami, T., Kugai, S., Yata, N., Takano, M., Enhancement of topical delivery of a lipophilic drug from charged multilamellar liposomes. *J. Drug Target.* 1999. 6, 405–414.

Kato M., Paranjape T., Muller R.U., Nallur S., Gillespie E., The mir- 34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in *C. elegans* and in vitro in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009. 28: 2419–2424.

Kawamura I, Morishita R, Tomita N, et al. Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF kappa B binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. *Gene Ther* 1999;6(1):91-7.

Kimura Y. and Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J. Nutr.* 2001. 131 (6): 1844-1849.

Kirjavainen, M., Monkkonen, J., Saukkosaari, M., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Urtti, A., Phospholipids affect stratum corneum lipid *bilayer* fluidity and drug partitioning into the *bilayers*. *J. Control. Release* 1999a. 58, 207–214.

Kirjavainen, M., Urtti, A., Jaaskelainen, I., Suhonen, T.M., Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Monkkonen, J., Interaction of liposomes with human skin in vitro—the influence of lipid composition and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1996.1304, 179–189.

Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002. 12(3):193-213.

Korting, H.C., Stolz, W., Schmid, M.H., Maierhofer, G., Interaction of liposomes with human epidermis reconstructed in vitro. *Br. J. Dermatol.* 1995. 132, 571–579.

Langcake P. and Pryce R.J. Production of resveratrol by *V. vinifera* and other member of the *Vitaceae* as a response to infection of enjoury. *Physiol. Plant. Pathol.* 1976. 9: 77-86.

Leiro J, Cano E, Ubeira FM, Orallo F, Sanmartín ML. In vitro effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2497-501.

Liu, H., Pan, W.S., Tang, R., Luo, S.D., Topical delivery of different acyclovir palmitate liposome formulations through rat skin in vitro. *Pharmazie* 2004. 59, 203–206.

Lopez-Pinto, J.M., Gonzalez-Rodriguez, M.L., Rabasco, A.M., Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int. J. Pharm.* 2005.298, 1–12.

Maeda H, Sawa T, Konno T. 2001. Mechanism of tumor targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Release*, 74:47–61.

Manosroi, A., Kongkaneromit, L., Manosroi, J., Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *Int. J. Pharm.* 2004. 270, 279–286.

Mezei, M., Gulasekharam, V., Liposomes—a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci.* 1980. 26, 1473–1477.

Mgbonyebi O.P., Russo J. and Russo I.H. Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 1998. 12(4): 865-869.

Miller CR, Bondurant B, McLean SD, et al. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* 1998. 37(37):12875-83.

Mizutani K., Ikeda K., Kawai Y. and Yamori Y. Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmac. Physiol.* 2001. 28: 55-59.

Müller RH, Rühl D, Lück M, Paulke BR. Influence of fluorescent labelling of polystyrene particles on phagocytic uptake, surface hydrophobicity, and plasma protein adsorption. *Pharm Res.* 1997 Jan;14(1):18-24.

Needham D, McIntosh TJ, Lasic DD. 1992. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1108:40–8.

Nishikawa KAHIK. 1990. Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem*, 265:5226–31.

Ogiso, T., Yamaguchi, T., Iwaki, M., Tanino, T., Miyake, Y., Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. *J. Drug Target*. 2001. 9, 49–59.

Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S.P., de Pablo, J.J., Phase behavior of freeze-dried phospholipid–cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochim. Biophys. Acta* 2005. 1713, 57–64.

Oja CDM, Semple SC, Chonn A, et al. 1996. Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1281:31–7.

Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem*. 2006;13(1):87-98.

Pace-Asciak C.R., Hahn S., Diamandis E.P., Soleas G., Goldberg D.M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. 1995. Mar 31;235(2):207-19.

Paolino, D., Lucania, G., Mardente, D., Alhaique, F., Fresta, M., Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *J. Control. Release* 2005. 106, 99–110.

Paul, A., Cevc, G., Bachhawat, B.K., Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur. J. Immunol*. 1995. 25, 3521–3524.

Powell GM. 1980. Polyethylene glycol. In Davidson RL (ed). Handbook of water soluble gums and resins. *McGraw-Hill*. p 18–31.

Prazeres D.M., G.N. Ferreira, G.A. Monteiro, C.L. Cooney, J.M. Cabral, Large-scale production of pharmaceutical grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 169-174.

Price ME, Cornelius RM, Brash JL. 2001. Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1512:191–205.

Pryce R.J. and Langcake P. Alfa-Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*. 1977.16: 1452-1454.

Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 8;250(1):53-8.

Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, Scotlandi K. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest*. 2010. Mar 1;120(3):668-80.

Rojanasakul Y., Antisense oligonucleotide therapeutics: drug delivery and targeting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 118 (1996) 115-131.

Rowe R.C., Sheskey P.J., Owen S. C., Handbook of pharmaceutical excipients. 6th Edition. *Pharma Press*.

Safra T., F. Muggia, S. Jeffers, D. D. Tsao-Wei, S. Groshen, O. Lyass, R. Henderson, G. Berry, A. Gabizon, *Ann. Oncol.* 2000, 11, 1029.

Scherphof GL. 1985. Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat Kupffer cells in vivo and in vitro. *Ann NY Acad Sci*, 446:368–84.

Schneider Y., Duranton B., Gossé .F, Schleiffer R., Seiler N., Raul F. Resveratrol inhibits intestinal tumorigenesis and modulates host-defense-related gene expression in an animal model of human familial adenomatous polyposis. *Nutr Cancer*. 2001. 39(1):102-7.

Semple SC, Akinc A, Chen J, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol* 2010;28(2):172-6.

Semple SC, Klimuk SK, Harasym TO, et al. Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures. *Biochim Biophys Acta* 2001;1510(1-2):152-66.

Senior J. Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Lett*, 1982.145:109–14.

Senior JH. Fate and behavior of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1987.3:123–93.

Sgambato A., Ardito R., Faraglia B., Boninsegna A., Wolf F.I. and Cittadini A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat. Res*. 2001. 496: 171-180.

Sinico, C., Manconi, M., Peppi, M., Lai, F., Valenti, D., Fadda, A.M., Liposomes as *carriers* for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. *J. Control. Release* 2005.103, 123–136.

Slade, L., Levine, H., Glass transitions and water–food structure interactions. *Adv. Food Nutr. Res*. 1995. 38, 103–269.

Smyth-Templeton N., D.D. Lasic, P.M. Frederik, H.H. Strey, D.D. Roberts, G.N. Pavlakis, Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 647-652.

Soleas G.J., Diamandis E.P. and Goldberg D.M. Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone?. *Clinical Biochem.* 1997. 30 (2): 91-113.

Soleas GJ, Grass L, Josephy D, Goldberg DM, Diamandis EP. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem* 2002. 35: 119-124.

Stark B, Pabst G, Prassl R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Nov 20;41(3-4):546-55.

Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, Snapka RM. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J Nat Prod.* 1998 Mar;61(3):362

Torchilin V. P., *Nat. Rev. Drug Discovery* 2005, 4, 145.

Touitou, E., Alkabetz, M., Dayan, N., Ethosomes: novel lipid vesicular system for enhanced delivery. *Pharm. Res.* 1997. S14, 305–306.

Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., Eliaz, M., Ethosomes—novel vesicular *carriers* for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release* 2000a. 65, 403–418.

Touitou, E., Godin, B., Weiss, C., Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal *carriers*. *Drug Dev. Res.* 2000b. 50, 406–415.

Trotta, M., Peira, E., Carlotti, M.E., Gallarate, M., Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 2004. 270, 119– 125.

Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F., Gallarate, M., Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 2002. 241, 319–327.

Veerareddy PR, Vobalaboina V. 2004. Lipid-based formulations of amphotericin B. *Drugs Today*, 40:133–45.

Venkatraman S.S, Ma L.L, Natarajan J.V, Chattopadhyay S. Polymer- and liposome-based nanoparticles in targeted drug delivery. *Front Biosci* (Schol Ed). 2010 Jun 1;2:801-14.

Vert M, Domurado D. 2000. Poly(ethylene glycol): protein-repulsive or albumin-compatible? *J Biomater Sci Polym Ed*, 11:1307–17.

Weyenberg W, Filev P, Van den Plas D, Vandervoort J, De Smet K, Sollie P, Ludwig A. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *Int J Pharm.* 2007 Jun 7;337(1-2):291-8.

Williams, A., *Transdermal and Topical Drug Delivery*, 1st ed. *Pharmaceutical Press, London*. 2003.

Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. 1994. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration in mice. *J Pharm Sci*, 83:601–6.

Yao J, Dokuru DK, Noestheden M, Park SS, Kerwin BA, Jona J, Ostovic D, Reid DL. A quantitative kinetic study of polysorbate autoxidation: the role of unsaturated fatty acid ester substituents. *Pharm Res.* 2009. Oct;26(10):2303-13.

Yoshizawa T, Hattori Y, Hakoshima M, et al. Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:718-25.

Yu C., Shin Y.G., Chow A., Li Y., Kosmeder J.W., Lee Y.S., Hirschelman W.H., Pezzuto J.M., Mehta R.G. and van Breemen. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.* 2002. 19 (12): 1907-1914.

Yu, H.Y., Liao, H.M., Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin in vitro. *Int. J. Pharm.* 1996. 127, 1–7.

Zamboni WC, Gervais AC, Egorin MJ, et al. 2004. Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103) in a preclinical tumor model of melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 53:329–36.

Zellmer, S., Pfeil, W., Lasch, J., Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta* 1995.1237, 176–182.

Zelphati O, Szoka FC Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(21):11493-8.

Zelphati O., Szoka F.C Jr., Cationic liposomes as an oligonucleotide carrier: Mechanism of action, *J. Liposome Res.* 1997. 7 31-49.

Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007. 302: 1–12.

Zou J., Huang Y., Chen Q., Wang N., Cao K., Hsieh T.C. and Wu J.M. Suppression of mitogenesis and regulation of cell cycle traverse by resveratrol in cultured smooth muscle cells. *Int. J. Oncol.* 1999. 15 (4): 647-651.