

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Biomedica

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Biomedica**

Tesi di Laurea Magistrale

Differenti veicolazioni di gentamicina per la cura del tumore al pancreas: nanospugne e nanobolle



Relatrici

prof.ssa Clara Mattu
prof.ssa Chiara Dianzani
prof.ssa Roberta Cavalli

Candidato

Alberto Mangia

Dicembre 2020

Indice

1. Introduzione	4
1.1. Il pancreas	4
1.2. Il tumore al pancreas	5
1.3. Classificazione della malattia	6
1.4. Scopo del lavoro	8
2. Criticità del tumore al pancreas	9
2.1. CSCs – Cellule staminali del cancro	9
2.2. TME – Microambiente tumorale	9
2.3. CTCs – Cellule tumorali circolanti	10
2.4. Esosomi	10
3. Terapie	11
3.1. Trattamento chirurgico – Procedura di Whipple	11
3.2. Trattamento adiuvante	12
3.2.1. Chemioterapia & <i>Drug resistance</i>	12
3.2.2. Radioterapia	14
4. Nanoformulazioni	15
4.1. Nanoparticelle & Effetto EPR	15
4.2. Nanospugne	17
4.3. Nanobolle	18
5. Materiali e metodi	20
5.1. Nanoformulazioni	20
5.1.1. Nanobolle	20
5.1.2. Nanospugne	20
5.1.3. Efficacia incapsulamento, capacità di carico e stabilità temporale	21
5.1.4. Cinetica di rilascio	22
5.2. Colture cellulari	22
5.3. Saggio MTT	22
5.4. Test clonogenico	23
5.5. Analisi statistica	23
6. Risultati	24
6.1. Caratterizzazione delle nanoparticelle	24
6.2. Saggio MTT	26
6.3. Test clonogenico	28
7. Discussioni	31
8. Conclusioni	33
9. Bibliografia	34

1 Introduzione

1.1 Il pancreas

Il pancreas è un organo ghiandolare lungo fra i 18 e 20 cm situato nell'addome, tra la colonna vertebrale e lo stomaco. Esso ha funzione endocrina, infatti produce ormoni molto importanti tra i quali l'insulina e il glucagone (regolatori del livello glicemico del sangue), e funzione esocrina nel caso di vari enzimi fra i quali la tripsina che, trasportati dai dotti pancreatici nell'intestino, contribuiscono alla digestione e all'assorbimento dei nutrienti.

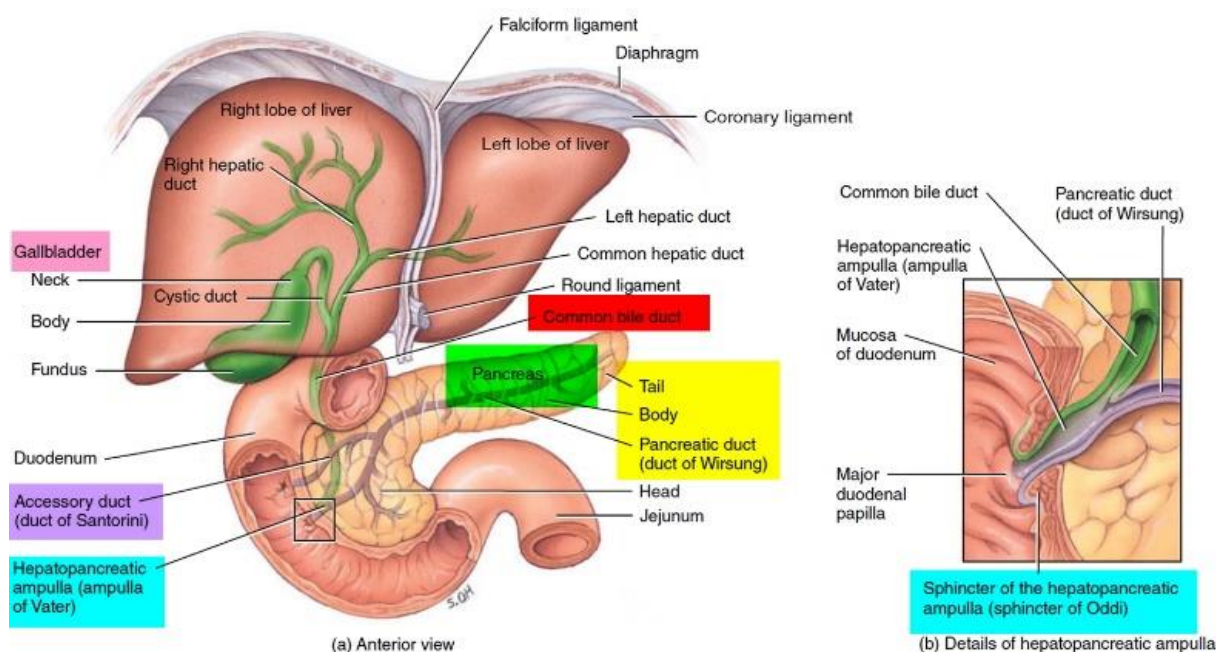


Figura 1.1 - Locazione del pancreas (HealthJade.com,2018)¹

Si suddivide in 4 parti: la testa, il collo, il corpo e la coda (Fig. 1.2) dove sono più concentrate le isole di Langerhans che ne svolgono la funzione endocrina, ma che costituiscono solo l'1-3% delle cellule totali. La grande maggioranza delle cellule del pancreas è quindi formata dagli acini pancreatici votati alla produzione enzimatica e si trova in comunicazione con i dotti biliari della cistifellea che terminano direttamente nel duodeno. È irrorato dall'arteria splenica e dall'arteria mesenterica superiore ed è drenato dalla vena mesenterica superiore e dalla vena pancreaticoduodenale superiore. Si trova quindi in contatto stretto con aorta addominale e vena porta.

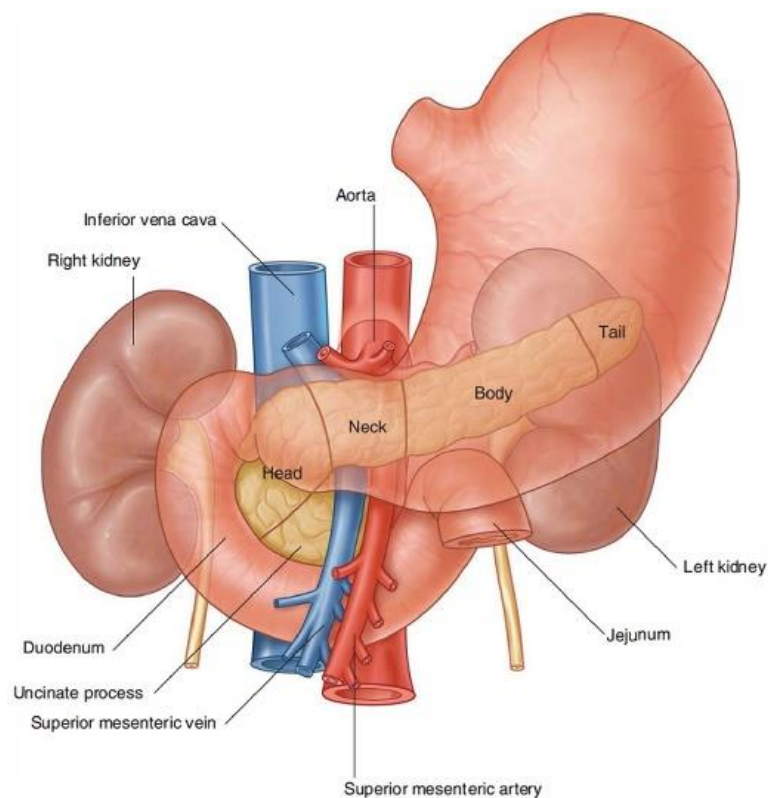


Figura 1.2 - Circolazione sanguigna vicina al pancreas (HealthJade.com,2018)¹

1.2 Il tumore al pancreas

Il tumore al pancreas continua ad essere una delle patologie più difficili da curare: è classificato come 12° in scala di incidenza, ma è la 7° causa di morte da tumori a causa del suo alto tasso di mortalità².

Negli ultimi 30 anni il tasso di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è rimasto intorno al 5% nel caso dell'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) con 460.000 casi a livello mondiale nel 2018³. Nel 95% dei pazienti si tratta di tumore del pancreas esocrino (PDAC), 2/3 dei quali nella testa dell'organo. I tumori neuroendocrini del pancreas (PanNETs, 1-2% dei casi) hanno un indice di sopravvivenza significativamente più alto, circa il 65% dopo 5 anni. È stato sequenziato il genoma di tutti i tumori più frequenti e questo ha permesso di raccogliere una libreria di geni mutati che possono essere utili alla ricerca dei soggetti a rischio⁴.

Tassi di sopravvivenza così nefasti dipendono dalla tarda diagnosi della malattia, quando il tumore ha già indotto metastasi e i sintomi cominciano ad essere infine evidenti; fra i più comuni ci sono dolori addominali, ittero dovuto all'ostruzione dei dotti biliari, pancreatite acuta, perdita di peso dovuta alla perdita della funzione esocrina, costipazione e almeno la metà dei casi sviluppa il diabete tipo II⁵. Una volta raggiunto lo stadio metastatico (nel 70% dei casi si tratta di tumori <2 cm) si diffonde nei linfonodi e successivamente può raggiungere la vena porta (VP) l'arteria e la vena mesenterica superiore (SMA, SMV) e quindi il fegato, la cavità peritoneale, l'intestino crasso o i polmoni⁶.

Stabiliti fattori di rischio ambientali ed ereditari e posto il rischio generico a 1, il dato riportato quantifica la probabilità di contrarre la malattia:

Ambientali	Stima del rischio (95% CI)
❖ Fumo attivo	OR= 2.20 (1.71 - 2.83)
❖ Passato da fumatore	
1-10 anni da non fumatore	OR= 1.64 (1.36 - 1.97)
15-20 anni da non fumatore	OR= 1.12 (0.86 - 1.44)
❖ Diabete mellito	
<3 anni dalla diagnosi	RR= 7.94 (4.70 - 12.55)
>10 anni dalla diagnosi	OR= 1.51 (1.16 - 1.96)
❖ Indice di massa corporea >35	OR= 1.55 (1.16 - 2.07)
❖ Alcolismo >6 drink/giorno	OR= 1.46 (1.16 - 1.83)
❖ Pancreatite	
<2 anni dalla diagnosi	OR= 13.56 (8.72 - 21.90)
>2 anni dalla diagnosi	OR= 2.71 (1.96 - 3.74)
Ereditari	
❖ Generale familiarità	RR= 6.79 (4.54 - 9.75)
❖ >2 familiari con la malattia	RR= 17.02 (7.34 - 33.5)
❖ Mutazione gene BRCA2	RR= 3.51 (1.87 - 6.58)
❖ Mutazione gene PALB2	elevato
❖ Mutazione gene BRCA1	OR= 2.26 (1.26 - 4.06)
❖ Sindrome di Lynch HNPCC	RR= 8.6 (4.7 - 15.7)
❖ Pancreatite ereditaria	RR= 53 (23 - 105) ⁷
❖ Sindrome di Peutz-Jegherz	RR= 132 (44 - 261) ⁸
❖ Familiarità con melanoma, mutazione gene <i>p16/CDKN2A</i>	RR= 38 (10 - 97) ⁹

OR= rapporto di probabilità (odds ratio);

RR= rischio relativo (relative risk);

CI= intervallo di confidenza;

essendo il PDAC relativamente raro OR e RR sono confrontabili.

Inoltre, parenti di malati di cancro al pancreas hanno rischi incrementati di contrarre cancro al seno (1.66 volte, 95% CI 1.15 - 2.34), cancro alle ovaie (2.05 volte, 95% CI 1.10 - 3.49) e cancro dei dotti biliari (2.89 volte, 95% CI 1.04 - 6.39)⁶.

1.3 Classificazione della malattia

Essendo la chirurgia l'unica strategia curativa per questo tipo di cancro, la classificazione dello stesso rispecchia totalmente la sua resecabilità. Il grado di diffusione ai vasi sanguigni, la presenza di una parete di grasso frapposta fra il pancreas e gli altri organi, il coinvolgimento dei linfonodi vicini e la grandezza del tumore sono fattori determinanti¹⁰.

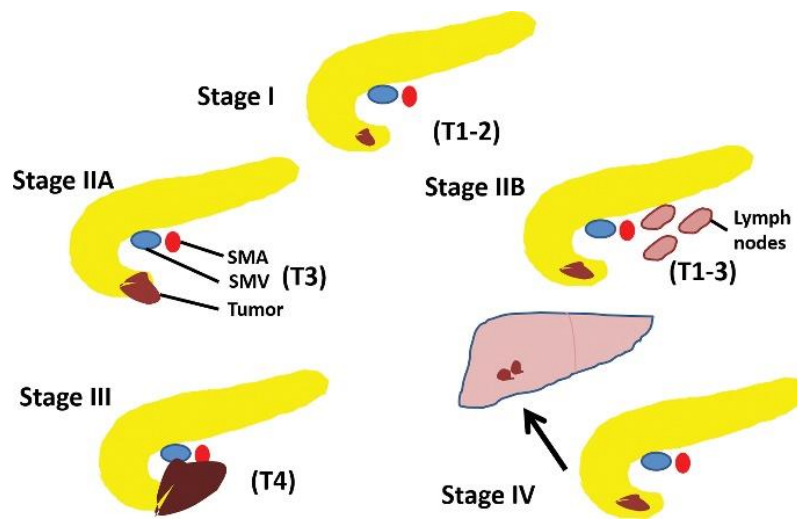


Figura 1.3 - Stadiazione tumorale (Zaky et al., 2017)¹⁰

Tumore resecabile

Stadio I: tumore di dimensioni inferiori a 2 cm o anche superiori, ma comunque limitati dentro l'organo;

Stadio IIA: tumore esteso all'esterno dell'organo, ma non in contatto con SMV o SMA;

Stadio IIB: coinvolgimento dei linfonodi vicini, ma senza contatto con SMV o SMA;

Tumore borderline resecabile

Stadio III: coinvolgimento di SMV o SMA, se ha invaso <180° della parete vasale è ancora resecabile, >180° la resecabilità diventa oggetto di discussione, si può prendere in considerazione anche la chemioterapia neoadiuvante per ridurre anche solo localmente la presenza del tumore e renderlo successivamente operabile; può però essere una scelta rischiosa perché ritarda di diversi mesi la chirurgia;

Tumore inoperabile

Stadio IV: tumore metastatico, le terapie in genere proposte sono la chemioterapia e la radioterapia per ridurre le dimensioni del tumore, rallentare o fermare la metastasi e migliorare la qualità della vita del paziente.

Finora quindi il punto cruciale sulla possibilità di resecabilità è il coinvolgimento dei vasi sanguigni vicini, ma dato che il tasso di mortalità dell'operazione dopo 30 giorni è paragonabile nel caso di coinvolgimento venoso (3,9% nel caso di resezione della vena contro 3% nel caso di non resezione della stessa), questo ha spinto i medici a tentare più spesso la pancreatectomia con resezione della SMV o della vena porta. Tuttavia, a causa del carattere desmoplastico del tumore è difficile distinguere una semplice adesione al tessuto da una vera e propria invasione, rendendo questa pratica a volte (>20% dei casi) inopportuna¹⁰.

Le analisi utili per verificare queste condizioni, così come per fare la diagnosi, sono:

- Tomografia computerizzata (TC)
- Ecografia endoscopica (EUS)

A volte si usano anche:

- Risonanza magnetica (RMI)
- Tomografia ad emissione di positroni (PET)
- Risonanza magnetica colangiopancreatografica
- Ecografia addominale; non è in grado di rilevare i piccoli tumori, può però essere utile a confermare sospette metastasi nel fegato o liquido presente nella cavità addominale¹¹
- Biopsia da agoaspirato; in genere non è utile nel decidere la resecabilità del tumore ed è anche difficile da attuare a causa della compattezza del tessuto.

Il marcatore tumorale CA19-9 risulta spesso elevato nei casi di tumore al pancreas, ma manca di specificità e sensibilità, perciò viene usato solo per monitorare casi già diagnosticati.

1.4 Scopo del lavoro

Il tumore al pancreas continua ad essere una diagnosi senza speranza e le cure proposte finora non hanno avuto successo come per altri tumori; da più di 30 anni infatti non si fanno che miseri progressi con la terapia farmacologica. Ancora meglio sarebbe prevenire o almeno cogliere in uno stadio operabile questa malattia, ma finché non si trovano i marker adatti allo screening la diagnosi arriva tardi e la prognosi rimane infausta. Già molte nanoformulazioni si sono distinte nella cura di altri tumori e alcune anche nel caso del tumore al pancreas.

Lo scopo della tesi è quello di ottimizzare l'efficacia della gemcitabina tramite l'uso di nuovi nanovettori. Questo farmaco per lungo tempo è stato il gold standard della terapia per il tumore al pancreas con risultati insoddisfacenti probabilmente perché non riesce a raggiungere la dose terapeutica all'interno della massa tumorale.

Le nanospugne si sono distinte nel campo biomedico per la facilità di utilizzo, il basso costo, la stabilità e la biocompatibilità, dunque possono essere utili per superare la barriera imposta dal tumore. Sfruttando la loro sensibilità alla differenza di pH presente all'interno del tessuto canceroso, potrebbero liberare il farmaco esclusivamente quando sono al suo interno. Allo stesso modo le nanobolle, ancora più semplici nella sintesi, economiche e versatili, anche se non altrettanto stabili, possono essere sfruttate per la loro capacità di liberazione selettiva del farmaco in seguito a stimolazione esterna con US.

In questo studio, è stata fatta la caratterizzazione chimico-fisica delle nanoparticelle caricate con gemcitabina ed è stata valutata *in vitro* la loro efficacia nell'inibire la proliferazione di alcune linee cellulari di cancro al pancreas, murino e umano.

2 Criticità del tumore al pancreas

2.1 CSCs – Cellule staminali del cancro

Così come in altri tipi di cancro, nell'adenocarcinoma sono presenti specifiche cellule capaci di instaurare una nuova crescita tumorale, farne progredire lo stadio, aiutare a resistere alle terapie e produrre metastasi. Anche se tutte le cellule tumorali posseggono grandi capacità proliferative sono le CSCs ad avere la capacità di generare un nuovo tumore, quindi sarebbero un eccellente bersaglio per evitarne la ricrescita. Attraverso un processo di transizione epitelio-mesenchimale le CSCs sono capaci di modificare la presenza di E-caderina superficiale e di riorganizzare il citoscheletro per migliorare la loro motilità e invasività, mantenendo intatta la loro plasticità di cellule staminali. Nel tumore primario sono capaci di rimanere quiescenti ed essere così meno esposte alla terapia; inoltre esprimono molecole come PD-L1, per inibire l'attivazione delle cellule T, nonché il segnale CD47 che comunica ai macrofagi di non fagocitarle¹².

2.2 TME – Microambiente tumorale

In genere quello che viene definito tumore è un termine collettivo per indicare cellule stromali associate e cellule tumorali vere e proprie, staminali e non. Le cellule staminali vengono confinate in nicchie specializzate con segnali atti a mantenerne la staminalità e a indurne la proliferazione in caso di particolari eventi esterni. Il microambiente del tumore al pancreas è caratterizzato da una forte reazione desmoplastica, con grande presenza di collagene tipo I e III, fibronectina e acido ialuronico, che aumenta la pressione intratumorale e causa ipossia del tessuto.

Se nel generico tumore solido c'è solo una forte stimolazione dell'attività angiogenetica, che normalmente produrrebbe una grande quantità di ramificazioni vasali e giunzioni interendoteliali lasse, nell'adenocarcinoma i vasi più interni collassano a causa della grande pressione interstiziale che si sviluppa a causa della reazione desmoplastica (nel modello di topo la differenza di pressione interstiziale fra il tessuto sano e patologico è di 8-13 mmHg contro 75-130 mmHg)¹³. Proprio a causa della scarsa irrorazione sanguigna è difficile che le normali terapie farmacologiche riescano a passare poco oltre la superficie tumorale.

Il tumore primario poi è supportato da una quantità di fibroblasti associati (CAFs – *cancer associated fibroblasts*) che formano una barriera attorno ad esso e ne supportano la crescita. Nelle terapie convenzionali essi vengono colpiti compromettendo inizialmente la crescita del tumore, ma innescano una risposta paracrina di fattori di crescita che non fa che incrementare la chemoresistenza e la ricostruzione stromale. Inoltre, la distruzione dello stroma superficiale aumenta la permeabilità sanguigna del tumore e può incrementare il rischio di metastasi, liberando le cellule meno adese del tumore principale. Anche se, da come sembra, l'attacco diretto al tumore porta a una decrescita delle generali probabilità di sopravvivenza, un approccio più blando di attacco stromale previene la crescita della chemoresistenza e porta a prognosi migliori^{14,12}.

2.3 CTCs – Cellule tumorali circolanti

Possono essere cellule singole o agglomerati cellulari, e sono costituite dalle CSCs che si sono staccate dal tumore principale o da altri siti metastatici, sfruttando le loro capacità di transizione epitelio-mesenchimale. Espongono preferibilmente i marker CD133 e CXCR4, che ovviamente potrebbero essere usati come target per prevenire la formazione di metastasi^{15,12}.

2.4 Esosomi

Gli esosomi sono delle vescicole costituite da membrana a doppio strato lipidico e vengono usati come mezzo di comunicazione a lungo raggio, per scambiare differenti tipi di sostanze come mRNA, enzimi e proteine. La loro precisa origine non è chiara, ma nel caso dell'adenocarcinoma sono un ulteriore aiuto alla metastatizzazione; in particolare, contribuiscono alla formazione delle nicchie premetastatiche modificando, tramite appositi segnali, il microambiente stromale, reclutando macrofagi e neutrofili per supportare la sopravvivenza di cellule metastatiche e attivando i CAFs¹².

3 Terapie

3.1 Trattamento chirurgico – Procedura di Whipple

Oltre a essere possibile solo nel 20% dei pazienti l'intervento chirurgico non garantisce la completa guarigione, poiché rimane molto alto il rischio di recidiva: la media di sopravvivenza dopo il primo intervento si attesta intorno ai 69 mesi, mentre nel caso di un secondo intervento scende a 26 mesi¹⁶.

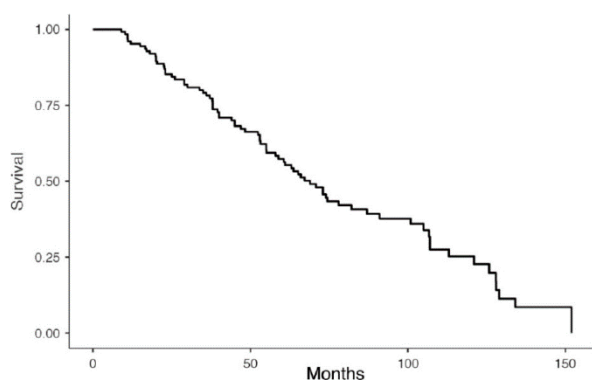


Figura 3.4 - Sopravvivenza dopo il primo intervento

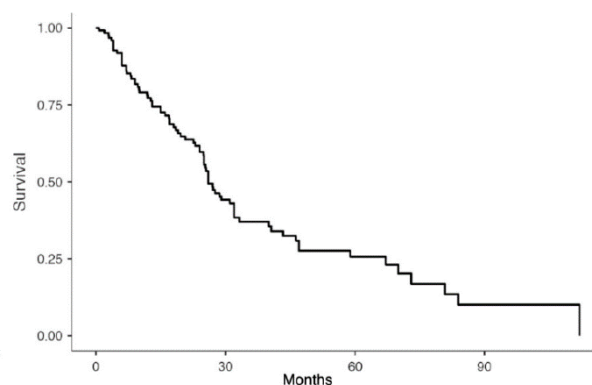


Figura 3.5 - Sopravvivenza dopo il secondo intervento

La procedura di Whipple (Fig. 3.6) è preferibile per tumori confinati nella testa/collo del pancreas e in generale permette di operare pazienti di qualunque età, premesso il giusto stato di salute e l'assenza di metastasi.

Si tratta di un intervento di grande portata che comprende la rimozione della testa del pancreas e del duodeno andando a realizzare un bypass dallo stomaco al digiuno e anastomizzando il digiuno al dotto cistico per il drenaggio della bile.

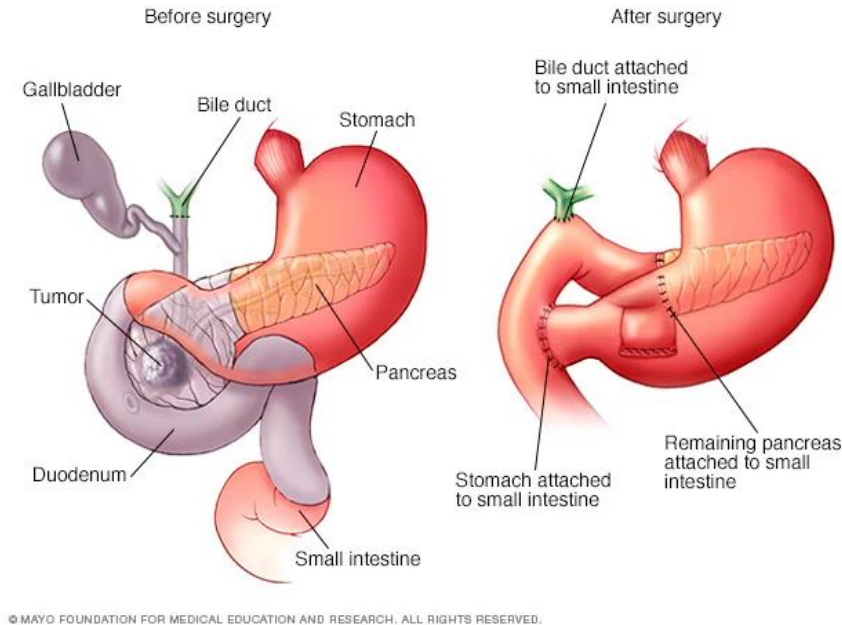


Figura 3.6 - The Whipple procedure (Mayo clinic foundation)

Nel caso di tumori situati nella coda del pancreas, si può intervenire più semplicemente asportando il tumore e se necessario la milza. Se c'è stata una parziale invasione dei vasi sanguigni vicini, questi vengono resecati insieme al resto del tumore e ricostruiti tramite innesti autologhi, protesi o anastomosi (ricollegamento tramite sutura del vaso interrotto). Al seguito dell'intervento è importante una laparoscopia esplorativa per valutare se il tumore sia stato rimosso completamente o se siano rimaste tracce macroscopiche o anche microscopiche ("margini poco puliti").

3.2 *Trattamento adiuvante*

Dopo l'intervento, trascorso un periodo di ripresa, è importante proseguire con un trattamento chemioterapico o radioterapico per massimizzare la percentuale di successo o, se non è possibile raggiungere la completa guarigione, per prolungare e migliorare la qualità della vita. Di seguito sono indicati i farmaci più utilizzati nella chemioterapia adiuvante, con il regime mFOLFIRINOX per ora considerato come migliore terapia di prima linea per sopravvivenza media, pur non essendo adatto a tutti i pazienti a causa dei forti effetti indesiderati.

3.2.1 *Chemioterapia & Drug resistance*

I farmaci chemioterapici più utilizzati come terapia di prima linea sono:

FOLFIRINOX (5-fluorouracile, leucovorina, irinotecano e oxaliplatino)

- ❖ 5-fluorouracile (5-FU): inibisce la timidilato sintasi (TS), bloccando la sintesi del pirimidina timidilato (dTMP), un nucleotide necessario per la replicazione del DNA e

- causando la morte delle cellule che si dividono più rapidamente.
- ❖ Leucovorina: detto anche acido folinico, stabilizza il complesso 5-FU-TS, incrementando la citotossicità del 5-FU.
 - ❖ Irinotecano: si attiva per idrolisi nella forma SN-38, un inibitore della topoisomerasi I, essenziale per la replicazione e la trascrizione del DNA.
 - ❖ Oxaliplatino: farmaco citotossico aspecifico, capace di legarsi fra e dentro le spire del DNA, impedendone replicazione e trascrizione.

mFOLFIRINOX (uguale a FOLFIRINOX con esclusione delle dosi a bolo di 5-fluorouracile)¹⁷

nab-Paclitaxel (nanoparticelle di albumina caricate con paclitaxel, ABRAXANE®)

Il principio attivo agisce sulla tubulina stabilizzandola e impedendone la riorganizzazione, causando quindi difetti nella formazione del fuso mitotico, nella segregazione cromosomica e nella divisione cellulare, impedendo la mitosi e inducendo la cellula all'apoptosi. La formulazione in nanoparticelle di albumina permette di sfruttare l'effetto EPR (vedi dopo) e di ridurre gli effetti collaterali.

Gemcitabina (farmaco gold standard prima delle combinazioni ABRAXANE® + gemcitabina o mFOLFIRINOX)¹⁸

Si inserisce nel pathway dei nucleosidi essendo un analogo della citidina, viene attivata in seguito alla tripla fosforilazione ad opera di diversi enzimi e si inserisce quasi nativamente nel DNA come un errore che però il sistema di riparazione del DNA non riesce a riconoscere, inibendo successive sintesi e portando la cellula all'apoptosi. Nella forma difosforilata inibisce l'enzima ribonucleotide riduttasi, necessario alla creazione dei nucleotidi, che, venendo a mancare, costringono la cellula a recuperarli dall'esterno, incrementando l'introduzione di gemcitabina.

Capecitabina (dimostrata superiore alla gemcitabina se combinata con la stessa)¹⁸

Viene metabolizzata a 5-fluorouracile e ne segue gli stessi meccanismi d'azione.

In questo studio è stata scelta la gemcitabina come chemioterapico e l'utilizzo delle nanoparticelle come vettori mira ad evitare i numerosi e pesanti effetti collaterali causati dalla somministrazione sistemica di quest'ultima: mielosoppressione, nausea, vomito, diarrea, stomatite, sudorazione eccessiva, prurito, alopecia, anemia, leucopenia, piastrinopenia, difficoltà nella respirazione, sangue nelle urine, sanguinamento gengivale, febbre, ritenzione idrica, perdita dei capelli, iperglicemia e carenza di magnesio.

Le terapie fino ad ora disponibili sono comunque soggette ad un certo grado di resistenza, innata o indotta, e mancano ancora i giusti marker per stabilire in anticipo quale sia la migliore terapia. Nel caso del regime FOLFIRINOX, attualmente la terapia d'elezione per sopravvivenza media, il 5-FU potrebbe essere meno indicato nei pazienti con alta presenza di diidropirimidina deidrogenasi (DPD) poiché si tratta di un enzima capace di inattivarlo; stesso discorso vale per la timidilato sintasi (TS), il target del 5-FU, che, se troppo presente, rende necessaria una dose

più alta di farmaco per ottenere lo stesso risultato. È stato dimostrato come possa essere un possibile indicatore di resistenza alla terapia, ma non è predittivo della sopravvivenza media (OS) del paziente¹⁹. Riguardo ai farmaci contenenti composti del platino (es. oxaliplatino), è stata osservata una certa capacità da parte delle cellule di rimediare ai danni arrecati al DNA, principalmente grazie alla proteina ERCC1²⁰, il cui comportamento non è semplice da studiare poiché mancano gli anticorpi specifici per la sua forma funzionale²¹. Invece l'alta espressione dell'enzima carbossil esterasi-2 (CES2), che trasforma l'irinotecano nella sua forma attivata, SN-38, è stata collegata con successo ad una incrementata OS in pazienti trattati con FOLFIRINOX in terapia neoadiuvante^{22,23}.

Nel caso della gemcitabina, la resistenza è più complicata da stabilire in quanto può dipendere da molteplici fattori: modifiche agli enzimi dedicati al metabolismo dei nucleotidi, ai *pathways* di apoptosi, alle pompe di efflusso dei farmaci, presenza di CSCs o transizione epitelio-mesenchimale delle stesse, sovra o sottoespressione di microRNA (miRNA). Attraverso l'azione di specifici miRNA, infatti, regolati dal gene mutato TP53, è stata osservata la sovraespressione di Bcl-2 (possibile marker) nelle cellule di PDAC resistenti alla gemcitabina²⁴. Alterazioni nella proteina responsabile del trasporto dei nucleosidi nella cellula, hENT1, così come nelle proteine deossicitidina chinasi e ribonucleotide riduttasi sono un grave ostacolo all'efficacia della gemcitabina e, se sottoesprese, sono correlabili a inferiori tassi di OS²⁵. Lo stesso vale per l'espressione aberrante dei geni della famiglia S100, associati alla sopravvivenza cellulare e all'apoptosi, che provocano una sottoregolazione del gene BNIP3, normalmente sovraregolato in condizioni di ipossia per indurre la cellula ad apoptosi²⁶. Infine, il *pathway* fosfatidilinositolo 3-chinasi/Akt è stato implicato nella resistenza alla gemcitabina²⁷, insieme alla chinasi legata alle integrine (ILK) per un effetto chemioprotettivo che avviene in associazione alla soppressione dell'attività della caspasi 3^{28,23}.

Proprio per cercare di far fronte alla resistenza alla gemcitabina sono stati introdotti nuovi farmaci che potessero lavorare in sinergia con essa. Fra tutti si è distinto il nab-Paclitaxel, già capace di attività antitumorale da solo, migliorato dal trasporto mediato dall'albumina che permette di superare con maggiore facilità la barriera epiteliale del tumore per transitosi e di impedire la chelazione del principio attivo da parte delle micelle²⁹. Un altro probabile motivo dell'accumulo nel PDAC del nab-paclitaxel è la sovraespressione di proteine SPARC (capaci di legare l'albumina) nei fibroblasti stromali che circondano il tumore³⁰. Purtroppo valutando la quantità di proteine SPARC non fornisce comunque un indice di successo della terapia³¹. La sinergia con la gemcitabina avviene grazie alla disattivazione della citidina deaminasi, il suo principale enzima inattivante^{32,23}.

3.2.2 Radioterapia

In genere viene sempre accoppiata alla chemioterapia, utilizza dei fasci di raggi X ad alta energia focalizzati dall'esterno del corpo ed è adatta a trattare pazienti che non possono ricevere trattamenti più aggressivi. Può essere usata anch'essa come terapia adiuvante o neoadiuvante, per trattare tumori non resecabili oppure anche solo per diminuire il dolore.

Una recente alternativa è la radioterapia stereotassica che ha l'intento di massimizzare la dose ricevuta dal tumore e diminuire invece quella dei tessuti circostanti³³. Essa consiste in una precisa preparazione del paziente per individuare la localizzazione del tumore, in genere tramite TAC, PET o RM e successivamente nell'uso incrociato di fasci di raggi X, in modo tale da esporre ad alte dosi solo le zone individuate precedentemente. La precisione raggiungibile è sub-millimetrica e il resto dei tessuti subisce solo parzialmente l'esposizione permettendo quindi di diminuire gli effetti collaterali della terapia.

4 Nanoformulazioni

4.1 Nanoparticelle & Effetto EPR

Le nanoparticelle (NP) sono costrutti di vario materiale (metallico, ceramico, polimerico, organico) con dimensioni che variano da pochi a poche centinaia di nm. Sono diventate interessanti a livello medicale per la loro capacità di azione diretta (induzione di stress ossidativo nel sito di accumulo) che indiretta (scopi terapeutici, diagnostici, trasporto di sostanze, supporto per azioni congiunte con l'esterno). Possono essere sfruttate come agente di contrasto per diversi esami (nanobolle per US, SPIONS per RM), possono servire per l'ipertermia terapeutica fino a raggiungere possibilità di termoablazione dei tessuti (NP d'oro, SPIONS) e sono anche biodegradabili in modo da non rimanere all'interno dell'organismo del paziente (NP di acido polilattico PLA, acido polilattico-glicolico PLGA, polietilenglicole PEG, nanobolle, nanopugne). Anche se i loro utilizzi sono multipli la loro qualità più sfruttata in nanomedicina è sicuramente quella di poter trasportare farmaci ("drug delivery") e materiale genetico ("gene

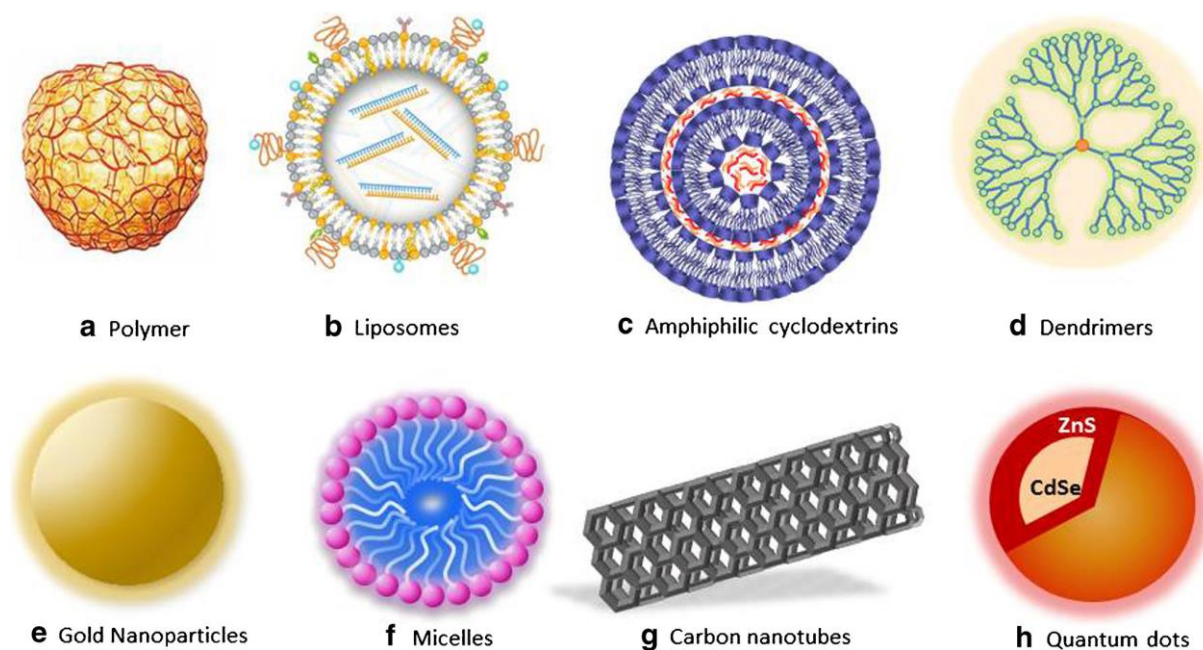


Figura 4.7 - Differenti tipi di nanoparticelle (Mc Carthy et al., 2015)³⁴

delivery"). In questi casi prendono il nome di *nanovettori* o *nanoformulazioni*. Per migliorare la biodistribuzione a volte si aggiungono ligandi che permettono l'accumulo selettivo nel tessuto interessato, mentre se superano i 500 nm vengono captate dal sistema reticolo-endoteliale (RES) e si accumulano preferenzialmente nel fegato.

Nel campo oncologico è essenziale che ci sia una specificità spaziale superiore rispetto a quella per ora offerta dalla comune chemioterapia e uno dei metodi più diffusi e semplici di targeting tumorale si basa sull'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). Esso è sfruttato dalle nanoparticelle come effetto passivo che coinvolge qualunque formulazione superiore ai 40 kDa (soglia superiore di *clearance* renale) e permette di mantenerle in circolazione per un tempo molto più lungo all'interno dell'organismo.

È influenzato anche dalla carica superficiale delle formulazioni e dalle loro interazioni con i recettori *scavenger* del sistema reticolo-endoteliale (RES). Infatti, la superficie interna del lume endoteliale ha una carica negativa, perciò qualunque particella/macromolecola con carica positiva si legherebbe ad essa con conseguenti tempi di circolazione sanguigna della formulazione molto ridotti. Allo stesso tempo il RES, molto presente nel fegato e nella milza, dev'essere superato per permettere alle nanoformulazioni di continuare la circolazione e raggiungere il sito d'azione.

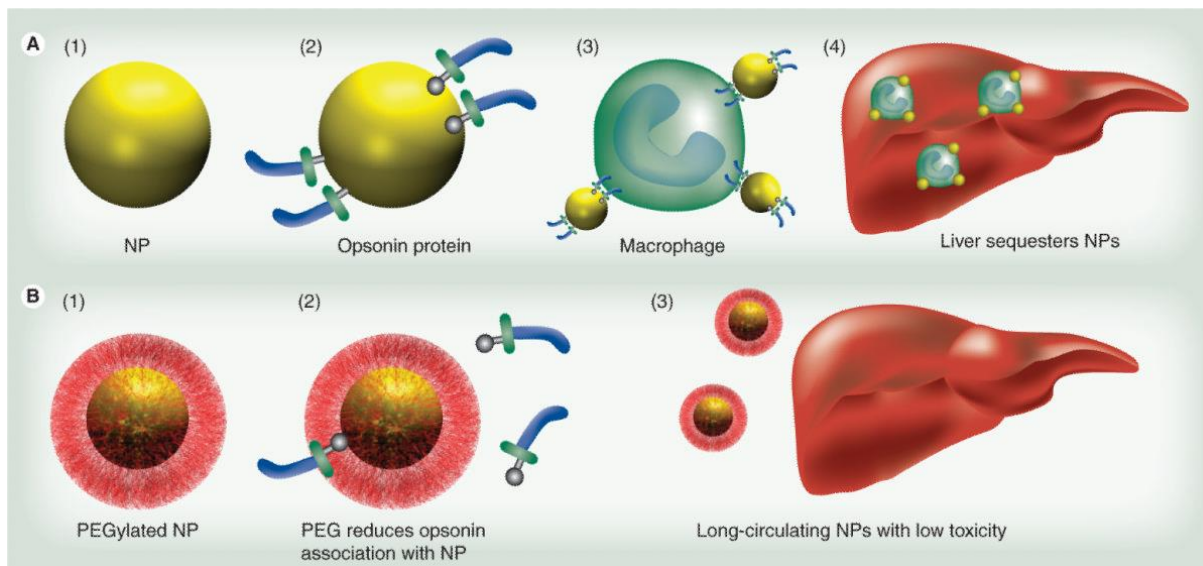


Figura 4.8 - Il coating in PEG previene la captazione da parte dei macrofagi e del RES (Mhatre V. Ho, Kelsey C. Martin, 2012)³⁵

Uno dei primi metodi scoperti è la coniugazione di PEG sulle particelle (Fig. 4.7) come elemento “*antifouling*”, ovvero l’inibizione del legame proteico che avviene per qualunque elemento esterno introdotto invasivamente all’interno dell’organismo. Normalmente è un problema per le nanoformulazioni, perché viene modificata tutta la caratterizzazione superficiale delle particelle, aumentandone il diametro, variandone il potenziale zeta e ottenendo una superficie di proteine spesso denaturate, quindi riconosciute come estranee e dannose dal sistema immunitario. Ciò impedisce il normale funzionamento dei vettori scelti, che vengono eliminati prima di esplicare la loro funzione. Successivamente nacque il cosiddetto PEG-dilemma, perché lo stesso PEG che impediva alle nanoparticelle di essere coniugate alle proteine, impedisce loro anche di penetrare la membrana cellulare, da qui la necessità di aggiungere delle catene di “*spacer*” per permettere il clivaggio delle catene di PEG in presenza delle giuste cellule a cui si vuole somministrare la formulazione³⁶.

Quindi, le nanoparticelle introdotte nell’organismo non vengono escrete dai reni e rimangono più a lungo in circolo, proteggono il farmaco dalla degradazione fisica e chimica, non solo dentro all’organismo, ma durante tutto il periodo di manifattura e stoccaggio. Sempre tramite lo stesso effetto esse si accumulano selettivamente nel tumore che è dotato di vasi sanguigni molto meno organizzati e con frequenti fenestrature, non presenti nei tessuti sani, che permettono alle sostanze di penetrare e permanere in maggiore concentrazione al suo interno. Una volta all’interno devono liberare il principio attivo contenuto al loro interno; questo può avvenire per semplice diffusione o come nelle nanoparticelle di seconda generazione in risposta ad uno stimolo (pH, ambiente ossidativo, ligandi tipici del tumore). Se anche le tempistiche di rilascio sono corrette, ciò permette di diminuire di molto la dose somministrata per errore a

tessuti sani, diminuendo gli effetti collaterali del farmaco sul paziente, e contemporaneamente di usare dosi più elevate per combattere il tumore. Per la sua semplicità di utilizzo e per la varietà di nanovettori disponibili l'effetto EPR è diventato molto famoso e molto sfruttato³⁶.

4.2 Nanospugne

Le nanospugne sono una classe di nanoparticelle polimeriche biocompatibili e biodegradabili, basate sulla reticolazione di α , β e γ (con 6, 7 o 8 monomeri di D-glucopiranosio) ciclodestrine attraverso diversi tipi di *crosslinker* che gli conferiscono differenti proprietà. Di base sono oligosaccaridi ciclici con ottime proprietà chelanti e scarsa citotossicità che, in questo caso unite in un complesso reticolo, diventano capaci di adsorbire una grande varietà di sostanze, sia idrofiliche (nei pori interstiziali creati dal *crosslinker*) che lipofiliche (nella cavità interna delle ciclodestrine), mantenendo la loro citocompatibilità. Il grado di reticolazione permette di caratterizzare anche la quantità di principio attivo assorbibile e il grado di protezione dall'esterno che si desidera per il trasporto delle sostanze. La loro grande abilità di *carrier* capaci di migliorare la solubilità, stabilità, attività e biodisponibilità dei farmaci racchiusi all'interno, la protezione dalla degradazione delle condizioni fisiologiche e dalla luce durante lo stoccaggio, ha loro valso grande notorietà nell'ambito della nanomedicina^{37,38}.

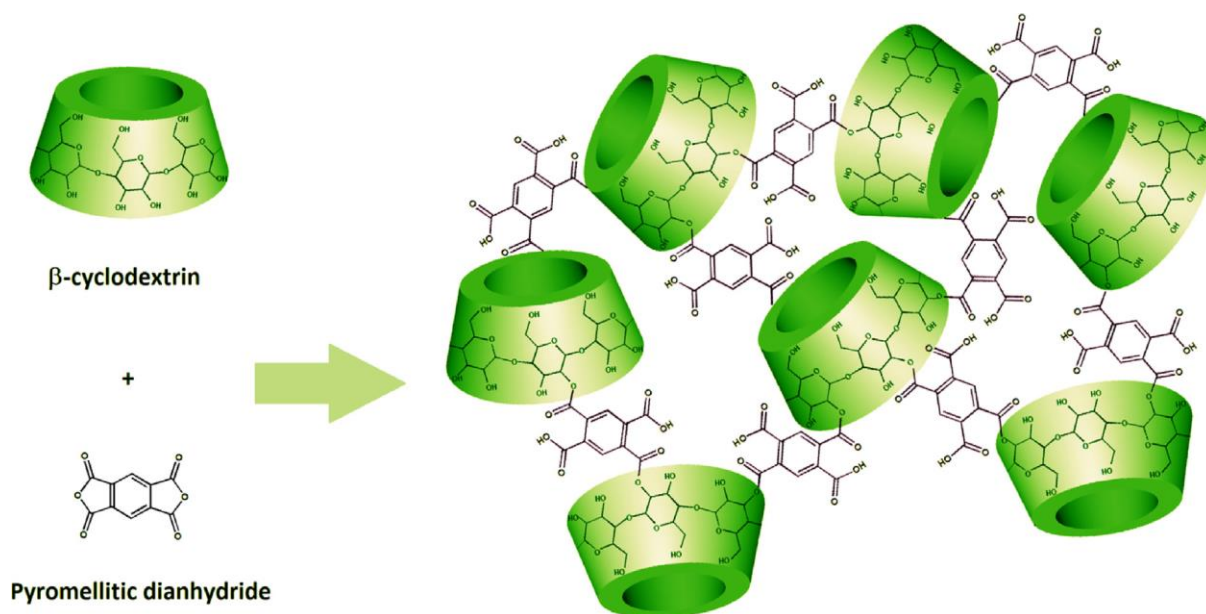


Figura 4.9 - Rappresentazione schematica sintesi nanospugne di β -CD (Caldera et al., 2017)³⁹

In questo caso il *crosslinker* scelto è la dianidride piromellitica che lega le β -ciclodestrine attraverso un legame estereo, che a differenza di altri legami usati per le nanospugne (uretano, carbonato o etere) sono molto idrofilici e più prone all'idrolisi; il *crosslinker* piromellitico lascia esposti gruppi -COOH in tutto il reticolo polimerico ed essi rendono le nanospugne sensibili al pH, mentre i gruppi -OH presenti, capaci di complessare una vasta gamma di sostanze nelle cavità formate dalle ciclodestrine e dalla reticolazione, permettono ulteriori modifiche superficiali. Sono state usate con successo come supporto per enzimi, garantendone un'attività

prolungata rispetto ad altri substrati come l'agarosio. Sono capaci di adsorbire una grande quantità d'acqua e formare idrogeli in base al grado di reticolazione (meno sono reticolate, maggiori sono le capacità di "swelling"). Le loro abilità di *drug delivery* non vengono usate solo come *nanocarrier*, ma anche come capsule, pellets, granulati, sospensioni, dispersioni solide, stoccaggio gas o applicazioni topiche³⁸.

Sono recentemente risultate molto interessanti nel campo della terapia antitumorale come veicolo di nuovi e vecchi farmaci. Molti lavori pubblicati dimostrano, *in vitro* e *in vivo*, la capacità di queste formulazioni di rilasciare selettivamente il farmaco nel sito tumorale, aumentandone notevolmente l'efficacia terapeutica e diminuendone significativamente gli effetti collaterali^{40,41,42}. Una vasta gamma di farmaci antitumorali è stata incorporata nelle nanospugne, come la camptotecina⁴³, il paclitaxel³⁹, la doxorubicina⁴¹, il 5-fluorouracile⁴⁴, la curcumina⁴⁵, il resveratrolo⁴⁶, la temozolomide⁴⁷, l'erlotinib⁴⁸.

4.3 Nanobolle

Le nanobolle, un tipo di nanoparticelle molto versatili, facilmente personalizzabili oltre che biocompatibili e biodegradabili, hanno una struttura "*core-shell*" riempita di gas, che permette loro di essere un agente di contrasto per l'imaging ad ultrasuoni. Lo *shell* può essere composto da proteine, lipidi o polimeri, così come il *core* può essere riempito di gas differenti (ossigeno O₂, perfluoropentano PFP, decafluorobutano DFB, octafluoropropano OFP). Avendo un'interfaccia fra un gas in genere idrofobico e un surfattante possono trasportare molecole idrofobiche e idrofiliche. Esistono anche in versione di microbolle, ma quest'ultime non sono capaci di attraversare l'endotelio dei vasi sanguigni. In questo caso sono state prodotte nanobolle con un *core* di perfluoropentano e uno *shell* di destrano. Il perfluoropentano è un liquido a temperatura ambiente, il che rende la preparazione delle nanobolle molto semplice, ma a temperatura corporea esso è un gas. Le nanobolle non scoppiano grazie alla presenza della pressione di Laplace,

$$\Delta p = 2\gamma/r$$

γ = tensione superficiale r = raggio della bolla

secondo cui la pressione esercitata sulla nanobolla è controbilanciata dalla tensione superficiale su una bolla di dimensioni nanoscopiche. La pressione esercitata inoltre aumenta la temperatura di ebollizione del PFP che non si scioglie nel plasma sanguigno grazie alla sua scarsissima solubilità. Quest'equilibrio di forze può essere rotto da una stimolazione ad ultrasuoni, che incrementa il rilascio delle sostanze nelle zone dove vengono concentrate le onde acustiche⁴⁹.

Data la loro capacità di trasporto di gas all'interno del "*core*" vengono spesso impiegate come *carrier* di O₂ per raggiungere le zone di maggiore ipossia del tumore e aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questo permette non solo di danneggiare direttamente il tumore che costruisce un microambiente atto ad evitare la produzione di ROS, ma anche di diminuire la resistenza alla radioterapia (che agisce in sinergia con l'ossigeno poiché il suo principale meccanismo è la creazione di ROS) e alla chemioterapia, poiché in ambiente ipossico le cellule tumorali proliferano lentamente eludendo il suo target tipico ovvero le cellule a veloce proliferazione. Possono essere ulteriormente funzionalizzate con l'aggiunta di NP più piccole all'interno dello *shell* (in genere SPIONS) oppure ligandi sempre legati a quest'ultimo⁵⁰.

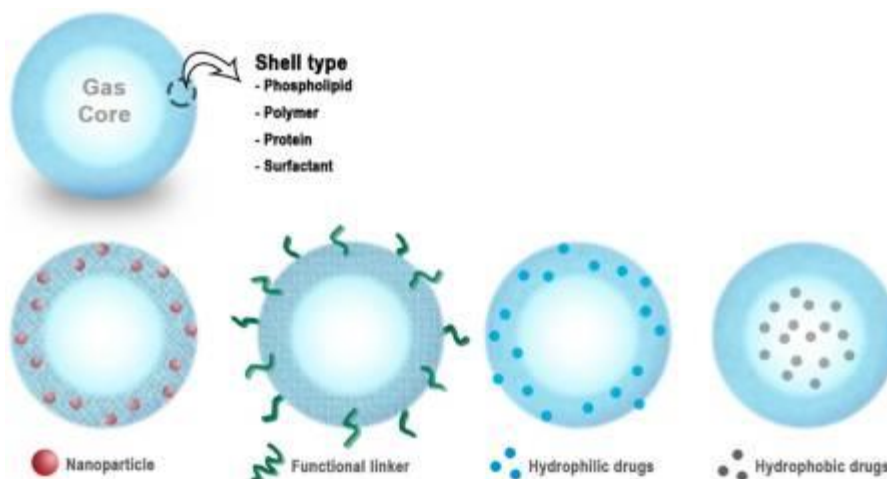


Figura 4.10 - Rappresentazione schematica struttura nanobolle (Khan et al., 2018)³⁸

Le nanobolle stanno diventando di recente molto utilizzate come dispositivo diagnostico e terapeutico⁵¹. Grazie alla loro compatibilità con le tecniche di imaging a ultrasuoni permettono un rilascio programmabile con grande precisione⁵²; tramite l'incameramento di ossigeno agiscono in sinergia con la radioterapia incrementando la citotossicità per i tessuti tumorali^{52,51}; attraverso l'incorporamento di SPIONS permettono, attraverso stimolazione esterna a radiofrequenza, la generazione di calore localizzato che porta il tessuto in ipertermia causando fenomeni vasodilatatori, denaturazione proteica e induzione apoptotica amplificando gli effetti della chemioterapia sulla massa tumorale^{52,51}. Sono state già usate con successo *in vitro* e *in vivo* per il rilascio di paclitaxel⁵³, doxorubicina⁵⁴, 5-fluorouracile⁵⁵, come mezzo di contrasto per MRI⁵⁶ e "gene delivery"⁵⁷.

5 Materiali e metodi

5.1 Nanoformulazioni

5.1.1 Nanobolle

❖ Materiali

Tutti i materiali per la preparazione delle nanobolle sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tutti i reagenti sono di grado analitico. Epikuron 200® è stato fornito per gentile concessione da Cargill. L'acqua deionizzata e milliQ® sono state ottenute con un sistema di depurazione Millipore Direct-QTM 5.

❖ Sintesi

Si prepara una soluzione al 2.5% w/w di Epikuron 200® (fosfatidilcolina) e acido palmitico come co-surfattante 0.5% w/w dissolti in etanolo. 300 µl della soluzione si aggiungono a 400 µl di perfluoropentano (PFP C₅F₁₂) in una fiala a bagnomaria nel ghiaccio per limitare l'evaporazione di PFP. Per gocciolamento si aggiungono 4.8 ml di acqua deionizzata per formare un'emulsione. Successivamente si omogeneizza per 2 minuti usando un turboemulsore Ultra-Turrax® (omogeneizzatore ad alto sforzo di taglio, IKA, Königswinter, Germania) fino alla formazione di una nanoemulsione. Dopodiché si lascia riposare a 37 °C per 15 minuti e durante il riscaldamento si gocciolano 400 µL del polimero scelto per lo *shell*, in questo caso destrano solfato (2% w/v).

❖ Caratterizzazione

Il diametro medio delle nanobolle, l'indice di polidispersione e il potenziale zeta vengono determinati tramite *dynamic light scattering* (DLS) usando un 90plus *particle sizer* (Brookhaven Instruments Corporation, USA) a 25 °C. Il potenziale zeta è stato valutato tramite cella per elettroforesi applicando un campo di 15V/cm. Il pH viene misurato a 25 °C tramite un pHmetro (Orion model 420A).

❖ Caricamento della gemcitabina

Si gocciola sotto agitazione magnetica una soluzione acquosa di gemcitabina (2 mg/ml) e si lascia in incubazione per un'ora. In seguito ad agitazione per 24 ore, la sospensione viene purificata tramite dialisi (Spectrapore, membrana in cellulosa, cutoff 12000-14000 Da) per eliminare il farmaco non legato.

5.1.2 Nanospugne

❖ Materiali

Roquette Frères (Lestrem, Francia) ha fornito le beta-ciclodestrine, che sono state asciugate in forno a 80 °C per una notte prima di essere utilizzate. Etanolo, acetone, dimetilsolfossido (DMSO), trietilammina (TEA) e dianidride piromellitica (PMDA) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Monaco, Germania). L'acqua deionizzata e milliQ® sono state ottenute con un sistema di depurazione Millipore Direct-QTM 5. Tutti i reagenti sono di grado analitico.

❖ Sintesi

16.6 mL di DMSO sono inseriti in un pallone da 100 ml a fondo tondo, a questi si aggiungono 14.10 g di beta-ciclodestrine precedentemente disidratate e si miscela la soluzione fino alla completa omogeneizzazione. Successivamente si pipettano 4.17 ml di TEA nella soluzione, seguiti da 3.13 g di PMDA (1:4 mol ratio). Le nanospugne appaiono come un gel scuro semisolido che si estrae dal pallone e si lascia a solidificare per tutta la notte. Dopodiché si macina il solido ottenuto in un mortaio per ridurlo a una polvere e viene lavato con 500 ml d'acqua e 500 ml di acetone attraverso un imbuto Buchner. Una volta asciugata la polvere viene posta a riflussare in un estrattore Soxhlet con acetone a 60-70 °C per 48 ore. Una volta asciutta può essere conservata in un luogo fresco e asciutto.

❖ Preparazione della nanosospensione

Si pesano 100 mg di polvere di nanospugne e si forma una sospensione 10 mg/ml in soluzione salina (0.9% NaCl w/v) a temperatura ambiente. Procedendo in un processo top-down si disperde la sospensione usando un turboemulsore Ultra-Turrax® (omogeneizzatore ad alto sforzo di taglio, IKA, Königswinter, Germania) per 5 minuti a 24000 rpm. La sospensione così ottenuta viene nuovamente omogeneizzata ad alta pressione (500 bar) per 90 minuti usando un EmulsiFlex C5 (Avastin, USA) e riducendo ulteriormente la dimensione delle nanoparticelle. Infine, si purifica la nanosospensione da reagenti residui della sintesi tramite dialisi (Spectrapore, membrana in cellulosa, cutoff 12000-14000 Da), si porta il pH a 6 con una soluzione di NaOH 0.1 M e si conservano a 4 °C in una fiala di vetro chiusa.

❖ Caratterizzazione

Il diametro medio delle nanospugne, l'indice di polidispersione e il potenziale zeta vengono determinati tramite *dynamic light scattering* (DLS) usando un 90plus *particle sizer* (Brookhaven Instruments Corporation, USA) a 25 °C. Il potenziale zeta è stato valutato tramite cella per elettroforesi applicando un campo di 15V/cm. Il pH viene misurato a 25 °C tramite un pHmetro (Orion model 420A).

❖ Caricamento della gemcitabina

Si aggiunge una quantità di gemcitabina complessata con acido oleico (1 mg/ml) alla sospensione acquosa (10 mg/ml). In seguito ad agitazione per 24 ore, la sospensione viene purificata tramite dialisi (Spectrapore, membrana in cellulosa, cutoff 12000-14000 Da) per eliminare il farmaco non legato.

5.1.3 Efficacia incapsulamento, capacità di carico e stabilità temporale

300 µl delle rispettive formulazioni sono inserite in un filtro per centrifuga (Amicon® Ultra-0.5) e centrifugati per 15 minuti a 15000 rpm in una ultracentrifuga (Beckman Coulter 64R Centrifuge, Indianapolis, USA). 100 µl del filtrato vengono diluiti in 1 ml d'acqua e analizzati attraverso uno spettrofotometro per ottenere la quantità di farmaco libero (Beckman Coulter DU 730 UV/Vis spectrophotometer, Indianapolis, USA). L'efficacia di incapsulamento (EE) è stata calcolata tramite la formula:

$$EE (\%) = \frac{(Farmaco\ totale - Farmaco\ libero)}{Farmaco\ totale} * 100$$

Le NP caricate con gemcitabina vengono liofilizzate in 24 ore, si pesa la polvere asciutta ottenuta e si risospende in 1 ml di acqua ed etanolo rispettivamente. I campioni vengono sonicati per 15 minuti e poi centrifugati a 15000 rpm in una ultracentrifuga (Beckman Coulter 64R

Centrifuge, Indianapolis, USA) e il surnatante viene analizzato attraverso uno spettrofotometro per ottenere la quantità di farmaco libero (Beckman Coulter DU 730 UV/Vis spectrophotometer, Indianapolis, USA). La capacità di carico (LC) è stata calcolata tramite la formula:

$$LC (\%) = \frac{(Farmaco\ totale - Farmaco\ libero)}{Peso\ NP\ caricate - Peso\ Gem} * 100$$

La stabilità delle due nanoformulazioni è stata valutata a 25 °C e a temperatura fisiologica (37 °C). Non è stato osservato nessun cambiamento dei parametri fisico-chimici e nessun fenomeno di aggregazione dopo 48 ore di incubazione alle due temperature, sia per le nanospugne che per le nanobolle. Inoltre, la concentrazione della gemcitabina all'interno delle due formulazioni non è cambiata dopo 48 ore, confermando la stabilità delle due formulazioni.

5.1.4 Cinetica di rilascio

La cinetica di rilascio della gemcitabina dalle nanoparticelle è stata valutata *in vitro* per 24 ore trasferendo 3 ml di formulazione in una membrana da dialisi (Spectrapore, membrana in cellulosa, cutoff 12000-14000 Da) inserita in 25 ml di tampone fosfato a pH 7.4 (fase ricevente) sotto costante mescolamento. La misurazione del farmaco rilasciato è stata misurata tramite spettrofotometro (Beckman Coulter DU 730 UV/Vis spectrophotometer, Indianapolis, USA) prelevando a istanti fissati di tempo 1 ml di fase ricevente, sostituita a ogni prelievo.

5.2 Colture cellulari

Le cellule di adenocarcinoma murino PANC-02 (ATTC, Manassas, VA, USA) sono state coltivate in RPMI + 1% sodio piruvato, 10% FCS, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomycin a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata. Le cellule di adenocarcinoma umano CFPAC e PT45 (ATTC, Manassas, VA, USA) sono state coltivate in DMEM +10% FCS, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomycin a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata.

5.3 Saggio MTT

Pur essendo un saggio enzimatico, che valuta la vitalità cellulare, viene considerato anche come saggio proliferativo. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in differenti quantità (300/pz PANC-02, 2000/pz CFPAC, 2000/pz PT45) nei rispettivi terreni. Dopo 24 ore sono state aggiunte le differenti formulazioni e dopo 72 ore di incubazione, le cellule vitali sono state valutate aggiungendo al medium il reagente 2,3-di[2-metossi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carbossanilide (MTT, Sigma-Aldrich) (0,5 mg/ml) per 4 ore a 37 °C. L'MTT, da giallo, viene ridotto a formazano viola dalle cellule viventi. La riduzione dipende dagli enzimi ossidoriduttasi NADP(H)-dipendenti, presenti in larga misura nel compartimento citoplasmatico delle cellule. Perciò, più le cellule sono vitali, maggiore sarà la riduzione dell'MTT e quindi la colorazione viola. Quindi, il terreno è stato eliminato e i cristalli di

formazano sono stati solubilizzati utilizzando 100 µl di DMSO (Sigma-Aldrich). L'assorbanza è stata misurata a 570 nm in uno spettrofotometro per micropiastre VICTOR (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). La vitalità cellulare è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{Inibizione vitalità cellulare} = \left(\frac{\text{assorbanza del campione}}{\text{assorbanza del controllo}} - 1 \right) * 100 \quad (n = 5)$$

5.4 Test clonogenico

Questo saggio *in vitro* si basa sulla capacità di una singola cellula di proliferare fino a formare una colonia. Il saggio essenzialmente valuta ogni cellula della popolazione ancora in grado, dopo essere stata esposta al farmaco, di andare incontro a divisioni illimitate. Visto che i risultati dei saggi MTT hanno dimostrato la maggior efficacia delle nanopugne rispetto alle nanobolle, questo test è stato eseguito solo sulle nanopugne di gemcitabina. Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti in differenti quantità (300/pz PANC-02, 2000/pz CFPAC, 2000/pz PT45) nei rispettivi terreni e lasciate in incubazione per 24 ore. In seguito, si aggiungono le nanoformulazioni con gemcitabina per 3 ore, successivamente si toglie il farmaco e si lasciano le cellule a crescere nel solo terreno di coltura 7 giorni. Per valutare i risultati del test, le cellule vengono fissate e colorate sulla piastra con una soluzione all'80% di cristalvioletto (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 20% di metanolo. Le colonie così formate e colorate vengono poi fotografate. Per ottenere un dato non solo qualitativo, ma anche quantitativo, alle cellule fissate si aggiunge acido acetico al 30% v/v che solubilizza il cristalvioletto; si valuta poi l'entità della colorazione e quindi della proliferazione, leggendo l'assorbanza a 570 nm in uno spettrofotometro per micropiastre VICTOR (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Le colonie formate sono state calcolate con la seguente formula:

$$\text{Inibizione clonogenicità} = \left(\frac{\text{assorbanza del campione}}{\text{assorbanza del controllo}} - 1 \right) * 100 \quad (n = 5)$$

5.5 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test di Mann-Whitney utilizzando il software GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I dati sono espressi come media ed errore standard della media (SEM) e la significatività statistica è stata posta a $P < 0.05$.

6 Risultati

6.1 Caratterizzazione delle nanoparticelle

Per ottenere una nanoformulazione che fosse adatta alla somministrazione e al rilascio di gemcitabina *in vitro* dopo la sintesi rispettiva di nanobolle e nanospugne sono state analizzate le caratteristiche relative a diametro, indice di polidispersione (PDI), potenziale zeta e pH. Grazie alla sola preparazione con Ultraturrax le nanobolle hanno raggiunto un diametro medio di circa 360 nm con un basso PDI e un potenziale zeta di circa -35 mV. Le nanospugne presentano dimensioni medie di circa 310 nm e carica superficiale negativa. I valori di potenziale zeta sono in entrambi i casi sufficientemente elevati da evitare l'aggregazione delle nanoparticelle e le interazioni con il RES. L'incorporazione della gemcitabina non modifica significativamente la dimensione delle nanoparticelle, ma determina una riduzione della carica superficiale negativa, minore nel caso delle nanospugne, più pronunciata per le nanobolle per l'interazione del farmaco con i gruppi solfato del destrano.

			NB vuote	NB caricate con gemcitabina	NS vuote	NS caricate con gemcitabina
Diametro medio	±		364.5 ± 12.3	360.2 ± 10.5	305.4 ± 10.5	310.2 ± 9.8
SD [nm]						
Indice Polidispersione	±		0.282 ± 0.02	0.284 ± 0.03	0.230 ± 0.03	0.224 ± 0.02
SD						
Potenziale Zeta	±		- 35.15 ± 1.45	- 24.42 ± 1.12	- 30.65 ± 1.23	- 25.24 ± 1.40
SD [mV]						
pH			6.00	6.80	6.00	6.00

Le nanobolle sono risultate in grado di incorporare la gemcitabina mostrando un'efficienza di incapsulamento del 66% e una capacità di caricamento del 9%, mentre le nanospugne hanno mostrato un'efficienza di incapsulamento del 98% e una capacità di caricamento del 5%.

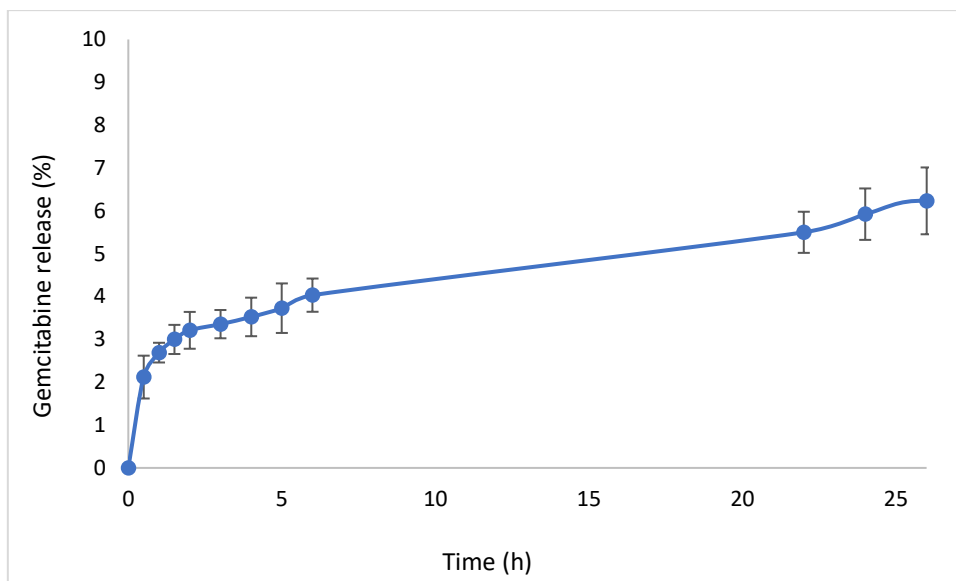


Figura 6.11 - Cinetica di rilascio in vitro della gemcitabina dalle nanobolle

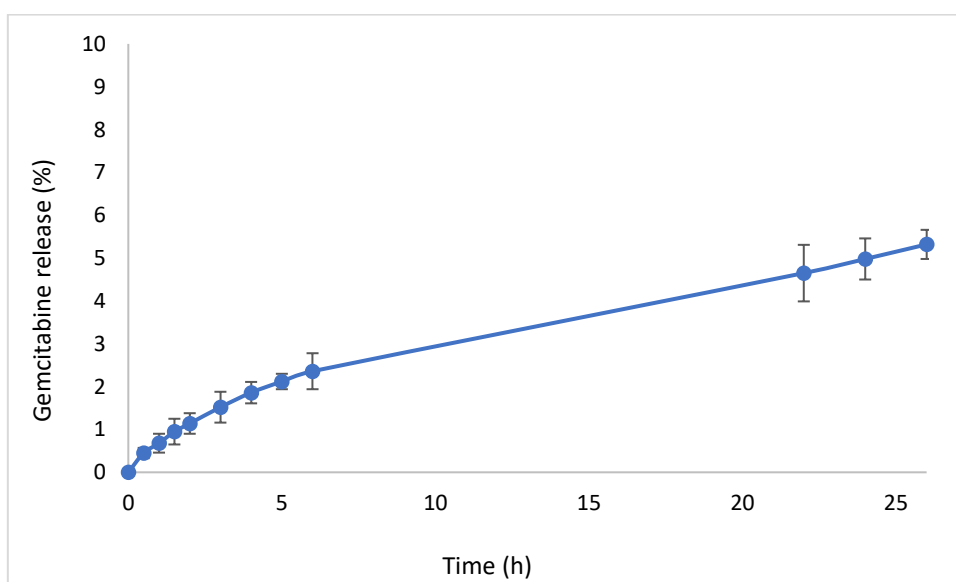


Figura 6.12 - Cinetica di rilascio in vitro della gemcitabina dalle nanospugne

La gemcitabina ha una cinetica di rilascio prolungata nel tempo per entrambe le formulazioni ed è possibile osservare dal grafico che dopo 24 ore viene rilasciato meno del 7% per le nanobolle e meno del 5% per le nanospugne. Per quest'ultime è possibile notare l'assenza di *burst release* che conferma l'avvenuta incorporazione del farmaco nella matrice interna e non il solo adsorbimento superficiale.

6.2 Saggio MTT

Per constatare la reale efficacia delle due nanoparticelle con gemcitabina, è stata valutata la tossicità cellulare tramite saggio MTT su linee cellulari di adenocarcinoma di topo, nel caso delle PANC-02 (in vista di una futura sperimentazione *in vivo*), e umane nel caso delle CFPAC e PT45. Le cellule sono state incubate con farmaco libero, con le due nanoparticelle vuote e con le corrispettive caricate di gemcitabina, a concentrazioni da 4 a 100 nM (400 nM solo nel caso delle cellule PT45, le più resistenti). È visibile come l'efficacia massima delle nanoformulazioni, quando si usano alte concentrazioni, non sia differente da quella del farmaco non veicolato. Nel caso di concentrazioni inferiori, invece, è possibile vedere gli effetti della veicolazione con nanoparticelle, che permette una più efficace penetrazione della formulazione all'interno delle cellule. Sia nel caso delle linee cellulari murine che umane la formulazione di gemcitabina caricata in nanospugne si è dimostrata superiore a quella caricata in nanobolle. L'effetto massimo è intorno all'80-90% per le tutte le formulazioni, sia per quanto riguarda le PANC-02 che per le CFPAC, ma le nanospugne e le nanobolle di gemcitabina sono già efficaci a concentrazione 20 nM, mentre non lo è la gemcitabina libera. Le PT45 sono risultate più resistenti alla gemcitabina, ma anche in questo caso le nanoformulazioni sono già efficaci a 40 nM, mentre non lo è il farmaco libero.

Calcolando l' IC_{50} (concentrazione a cui viene inibita la vitalità cellulare del 50% rispetto all'effetto massimo) è possibile confrontare quantitativamente i risultati: nel caso delle PANC-02 le nanobolle e le nanospugne sono circa 2 e quasi 3 volte più efficaci del solo farmaco; per le CFPAC sono rispettivamente sono circa 1/3 e 2/3 volte più efficaci; per le PT45, il risultato maggiormente significativo, sono rispettivamente 3 e 4.5 volte più efficaci. È importante anche sottolineare l'assenza di effetti citotossici delle nanospugne e nanobolle libere (dati non riportati in figura).

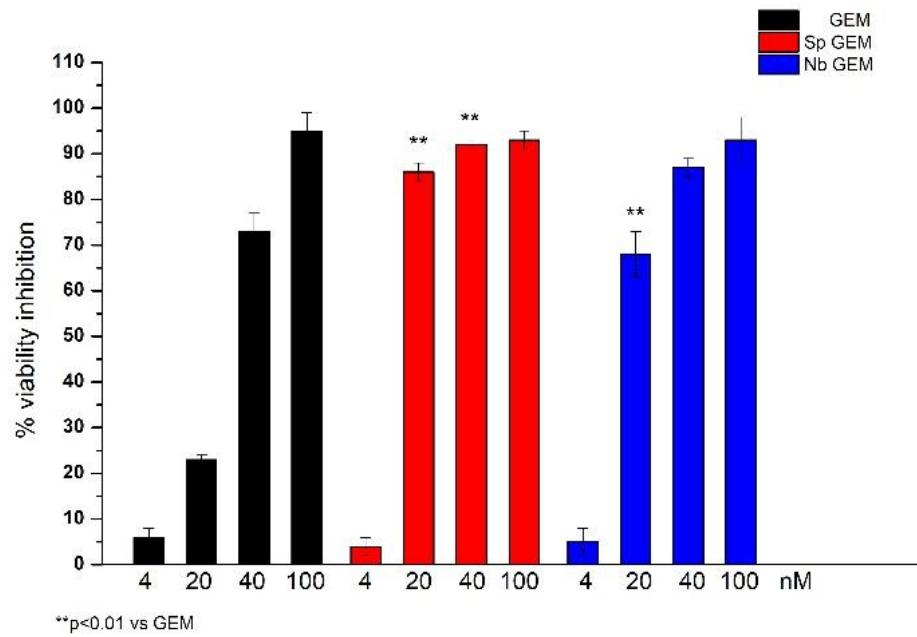


Figura 6.13 - Risultati MTT PANC-02 con gemcitabina

Calcolo IC₅₀ per PANC-02

■ Gemcitabina	28.2±3 nM
■ Nanospugne + GEM	10.3±0.2 nM
■ Nanobolle + GEM	13.5±0.3 nM

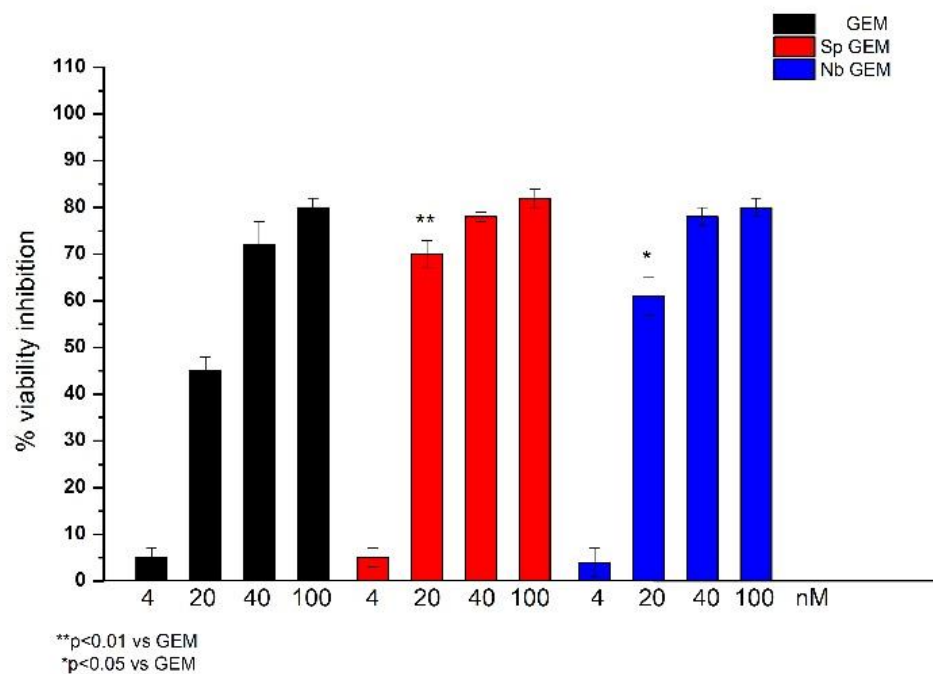


Figura 6.14 - Risultati MTT CFPAC con gemcitabina

Calcolo IC₅₀ per CFPAC

■ Gemcitabina	18.2±0.1 nM
■ Nanospugne + GEM	10.7±0.1 nM
■ Nanobolle + GEM	13.4±0.1 nM

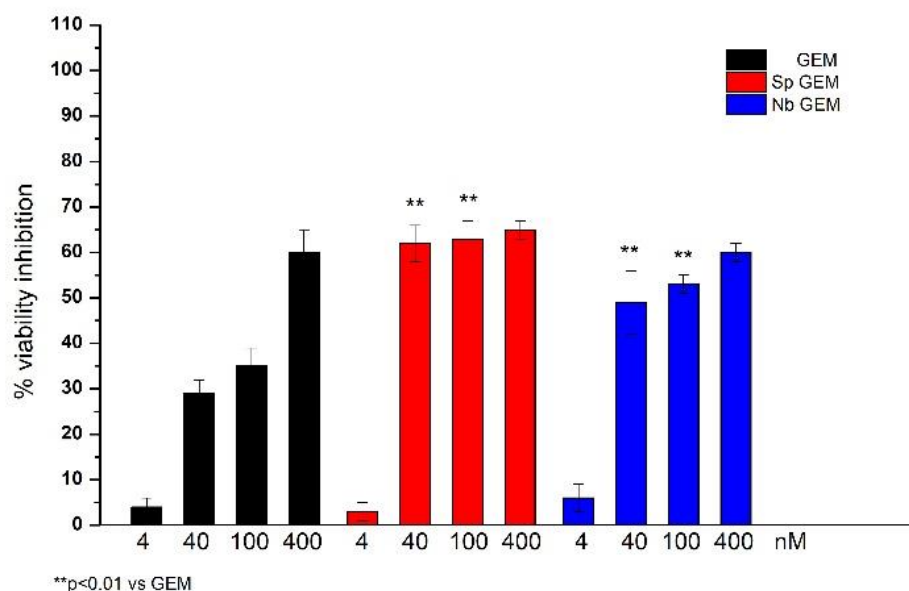


Figura 6.15 - Risultati MTT PT45 con gemcitabina

Calcolo IC₅₀ per PT45

■ Gemcitabina	61.4±4 nM
■ Nanospugne + GEM	13.4±2 nM
■ Nanobolle + GEM	20.1±6 nM

6.3 Test clonogenico

La capacità di formare nuove colonie cellulari dopo l'esposizione al farmaco, così come la velocità di penetrazione della formulazione è stata valutata tramite test clonogenico sulle stesse linee cellulari. Le cellule sono state incubate con il farmaco libero, con le due nanospugne vuote e con le stesse caricate di gemcitabina, in concentrazioni da 2 a 200 nM per 3 ore, poi i farmaci sono stati rimossi e le cellule lasciate crescere per una settimana. Come si può vedere dalle figure, anche in questo test le nanospugne risultano più efficaci del farmaco libero, in particolare, il risultato che riguarda le PANC-02 dimostra come solo alla concentrazione maggiore la gemcitabina sia in grado di inibire la formazione delle colonie, mentre se veicolata risulta efficace già a 20 nM. Nelle CFPAC le nanospugne risultano più efficaci del farmaco libero solo a 20 nM, avendo quest'ultimo una buona efficacia. Nel caso delle PT45, varia anche l'effetto massimo, che arriva circa al 70% nel caso del farmaco veicolato e solo al 50% nel caso del libero.

Calcolando l' IC_{50} (in questo caso la concentrazione a cui viene inibita la capacità di formare nuove colonie del 50% rispetto all'effetto massimo) è possibile notare che, per le PANC-02 le nanospugne caricate con gemcitabina sono più efficaci di 3 volte rispetto al solo farmaco, per le CFPAC più di 3 volte e per le PT45 sono 2 volte più efficaci e con un effetto massimo superiore. Anche in questo caso, le nanospugne vuote non hanno dimostrato effetti citotossici. Dato che le cellule sono state esposte solo per 3 ore ai composti, i dati qui mostrati hanno anche dimostrato come le nanospugne vengano internalizzate più velocemente del farmaco libero.

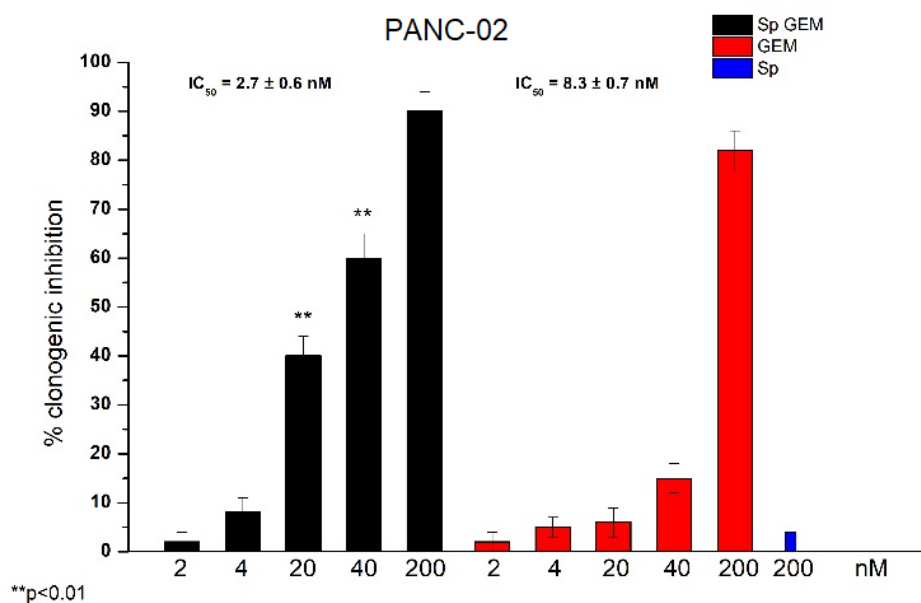


Figura 6.16 - Risultati clonogenic PANC-02 con nanospugne + GEM

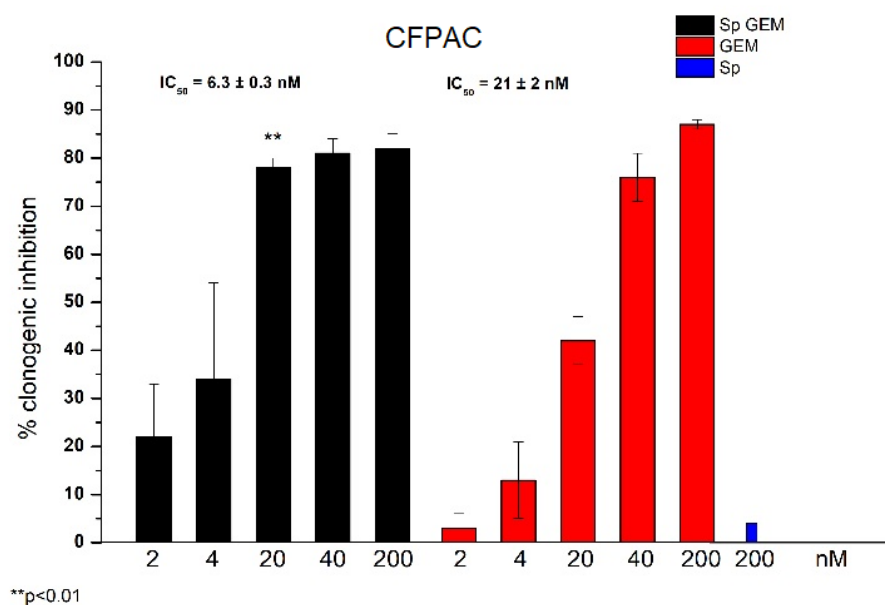


Figura 6.17 - Risultati clonogenic CFPAC con nanospugne + GEM

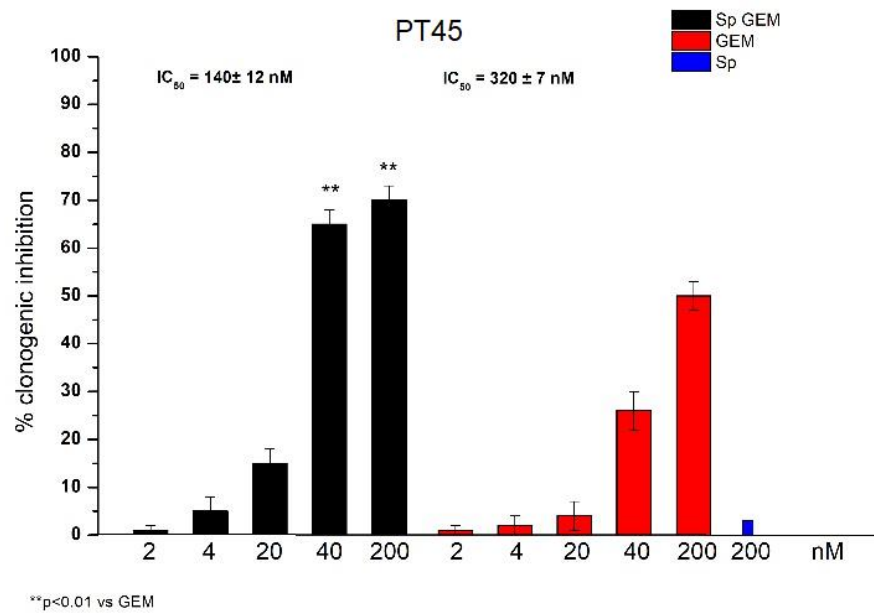


Figura 6.18 - Risultati clonogenic PT45 con nanospugne + GEM

7 Discussioni

Il tumore al pancreas continua ad essere una delle patologie tumorali più difficili da curare, con un bassissimo tasso di sopravvivenza. Il microambiente dell'adenocarcinoma pancreatico, caratterizzato da una forte reazione desmoplastica, scarsa irrorazione sanguigna e ipossia del tessuto, rende difficile la penetrazione dei farmaci nel tessuto tumorale, che risultano per lo più poco efficaci *in vivo*, pur dimostrando un'ottima efficacia *in vitro*. La comparsa di cellule resistenti e gli effetti collaterali dovuti alle massicce dosi richieste rendono ancora più complicata la chemioterapia. Per tutti questi motivi si ritiene che la normale chemioterapia sia inadatta ed è necessario lo sfruttamento di nuove vie per attaccare questa malattia: le nanoparticelle potrebbero essere uno strumento utile a raggiungere lo scopo.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di dimostrare la capacità di nanospugne e nanobolle di poter incapsulare efficacemente la gemcitabina, rilasciarla correttamente, cioè solo una volta all'interno delle cellule tumorali, e di rimanere stabili una volta messe a contatto con il medium. Le nanoformulazioni così ottenute dovevano dare prova di citotossicità superiore rispetto al solo farmaco, sia tramite saggio MTT, che verifica l'inibizione della vitalità cellulare, sia tramite saggio clonogenico, che verifica gli effetti del farmaco sulle cellule del tumore nella loro capacità di formare nuove colonie, quindi la possibilità di ricostruire la massa tumorale a seguito della terapia. Dopo il saggio MTT si è scelto di proseguire con il test clonogenico solo con le nanospugne per le migliori prestazioni esposte. Il risultato atteso era la migliorata capacità di penetrazione cellulare e una maggiore attività citotossica già a dosi basse grazie alla prolungata capacità di rilascio tipica delle nanoformulazioni.

In questo studio si è dimostrato come le nanospugne di gemcitabina siano state in grado di inibire la vitalità e la proliferazione cellulare in modo significativamente maggiore delle nanobolle di gemcitabina e del farmaco libero in tutte e tre le linee di tumore al pancreas, più o meno resistenti al farmaco. Essendo i due vettori molto differenti, il farmaco viene internalizzato e rilasciato in maniera diversa. Le nanospugne di gemcitabina hanno un diametro medio ed un indice di polidispersione leggermente inferiore a quello delle nanobolle di gemcitabina e un potenziale zeta simile. Non è stato osservato nessun cambiamento dei parametri fisico-chimici e nessun fenomeno di aggregazione dopo 48 ore a 25 e 37 °C, confermando la stabilità delle due formulazioni. Questo è importante *in vitro* per non causare fenomeni citotossici, ma soprattutto *in vivo* per evitare la captazione da parte del RES o dei macrofagi.

C'è invece una certa differenza nel comportamento delle due nanoparticelle nel rilascio iniziale del farmaco: probabilmente per migliori capacità chelanti, le nanospugne non hanno un picco iniziale di rilascio; questo non vuol dire che le nanobolle non siano adatte ma che le nanospugne hanno una cinetica di rilascio migliore. Probabilmente, avendo la possibilità di immagazzinare il farmaco solo nella parte più esterna della nanoparticella, lo *shell*, le nanobolle lo rilasciano più facilmente delle nanospugne, che invece hanno a disposizione l'intero volume per adsorberlo. Questo spiegherebbe anche le differenze di incapsulamento e capacità di carico espresse dalle due formulazioni. La gemcitabina è un farmaco idrofilico, perciò il vettore deve impedire che essa si dissolva nel plasma sanguigno prima di aver raggiunto il sito d'azione.

I risultati del test di rilascio e del saggio MTT hanno dimostrato come le nanospugne di gemcitabina siano più efficaci del farmaco libero. Durante questo saggio le cellule sono state esposte al farmaco per un tempo prolungato (72 ore), situazione che non si crea *in vivo*, se non con dosi massicce del farmaco, che inducono anche spesso notevoli effetti collaterali.

Il test clonogenico rappresenta meglio la situazione *in vivo*, perché le cellule sono state esposte al farmaco solo per un tempo limitato (3 ore), inoltre valuta anche la capacità o meno della cellula di riparare il danno causato dal farmaco e quindi la sua capacità di riprendersi e riprodursi. Il test ha evidenziato come le nanospugne siano già internalizzate dopo 3 ore e come siano in grado di rilasciarlo poi lentamente nel citoplasma, rendendolo quindi capace di agire più a lungo ed amplificarne gli effetti.

Mentre la gemcitabina entra nella cellula tramite le proteine di trasporto dei nucleosidi, essendo un analogo della citidina, le nanospugne e le nanobolle vengono internalizzate per endocitosi, liberando il farmaco nella parte più interna della cellula. Normalmente, il farmaco libero viene velocemente espulso dalla cellula tramite le pompe di efflusso presenti sulla membrana; l'uso di nanovettori può eliminare questo inconveniente, perché essi possono fungere da protezione e da deposito del farmaco, permettendogli di agire indisturbato.

Esperimenti futuri potranno valutare quale nanoformulazione sarà in grado di inibire in modo migliore la vitalità delle PANC-02 in un modello 3D, molto più simile alla situazione *in vivo* del semplice modello in 2D del saggio MTT. Come step successivo potrebbero essere interessanti esperimenti basati su *Organ-on-a-Chip*, che attraverso l'uso di bioreattori mimano ancora meglio l'ambiente *in vivo*, tramite flussi di nutrienti e scarti e l'utilizzo di più tipi di cellule per andare a simulare il microambiente dell'organo con i tessuti che vengono in contatto nel pancreas. Esperimenti *in vivo* su topi (es. C57BL6/J) sarebbero certamente utili a confermare le qualità delle formulazioni, magari utilizzando un modello ortotopico, cioè iniettando le cellule PANC-02 direttamente nel pancreas. I risultati ci permetteranno di capire la reale superiorità dei nanovettori rispetto al farmaco libero, supponendo che questi siano in grado di penetrare più facilmente attraverso la compattezza esibita dal tumore solido. La minore efficacia delle nanobolle rispetto alle nanospugne *in vitro* non dovrebbe essere una limitazione alla sua sperimentazione *in vivo* in quanto l'utilizzo di ultrasuoni potrebbe aumentarne l'effetto rispetto ai risultati *in vitro*.

Esperimenti preliminari sono stati fatti anche utilizzando nanobolle contenenti ossigeno e gemcitabina, che possono avere una triplice azione: 1) la nanobolla può facilitare la veicolazione della gemcitabina nel sito tumorale; 2) la gemcitabina può agire indisturbata all'interno della cellula, venendo rilasciata lentamente e non venendo espulsa dalle pompe di efflusso; 3) l'ossigeno potrebbe indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno e aumentare il danno cellulare.

8 Conclusioni

I risultati ottenuti *in vitro* indicano che attraverso l'incorporazione all'interno di nanobolle o nanospugne la gemcitabina è stata internalizzata più velocemente dalle cellule tumorali e meglio trattenuta al loro interno, permettendo un'amplificata azione citotossica. In questo studio le nanospugne si sono dimostrate superiori alle nanobolle nella veicolazione, nell'immagazzinamento del farmaco e nei test di efficacia studiati. Queste capacità indicano che anche un farmaco ormai usato da molto tempo come la gemcitabina può essere ancora meglio sfruttato nella lotta contro il tumore, se ben veicolato. Le nanoparticelle utilizzate per il *drug delivery* hanno confermato anche in questo caso il loro potenziale in ambito biomedicale e potranno permettere in una futura sperimentazione anche l'utilizzo di più farmaci in contemporanea per attaccare in modo sinergico il PDAC. Ulteriori studi potranno offrire la possibilità di una più precisa caratterizzazione delle nanoparticelle per aumentare la specificità della terapia e le capacità di rilascio del farmaco.

9 Bibliografia

1. Pancreas - HealthJade.com (2018) <https://healthjade.com/pancreas/>
2. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
3. Cancer Today – IARC. (2018). <https://gco.iarc.fr/today/home>
4. McGuire, S. (2016). World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Advances in Nutrition*, 7(2), 418–419. <https://doi.org/10.3945/an.116.012211>
5. Chari, S. T., Leibson, C. L., Rabe, K. G., Ransom, J., de Andrade, M., & Petersen, G. M. (2005). Probability of Pancreatic Cancer Following Diabetes: A Population-Based Study. *Gastroenterology*, 129(2), 504–511. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.007>
6. Cohn, I. (1980). Recent progress in pancreatic cancer. *Seminars in Ultrasound*, 1(3), 228–230. <https://doi.org/10.3322/caac.21190>
7. Lowenfels, A. B., Eugene, P., Elitsur, Y., Gates, L. K., & Whitcomb, D. C. (1997). 442 Reports. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(6), 442–446.
8. Giardiello, F. M., Brensinger, J. D., Tersmette, A. C., Goodman, S. N., Petersen, G. M., Booker, S. V., Cruz-Correa, M., & Offerhaus, J. A. (2000). Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*, 119(6), 1447–1453. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.20228>
9. Goldslein, A. M., Struewing, J. P., Fraser, M. C., Smith, M. W., & Tucker, M. A. (2004). Prospective risk of cancer in CDKN2A germline mutation carriers. *Journal of Medical Genetics*, 41(6), 421–424. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.019349>
10. Zaky, A. M., Wolfgang, C. L., Weiss, M. J., Javed, A. A., Fishman, E. K., & Zaheer, A. (2017). Tumor-vessel relationships in pancreatic ductal adenocarcinoma at multidetector CT: Different classification systems and their influence on treatment planning. *Radiographics*, 37(1), 93–112. <https://doi.org/10.1148/rg.2017160054>
11. Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. Pancreatic adenocarcinoma. *BMJ*. 2012 May 16;344:e2476. doi: 10.1136/bmj.e2476. PMID: 22592847.
12. Li, Y. J., Wu, J. Y., Wang, J. M., & Xiang, D. X. (2020). Emerging nanomedicine-based strategies for preventing metastasis of pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release*, 320(January), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.041>
13. Zhang, Z., Ji, S., Zhang, B., Liu, J., Qin, Y., Xu, J., & Yu, X. (2018). Role of angiogenesis in pancreatic cancer biology and therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108(June), 1135–1140. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.136>
14. Kota, J., Hancock, J., Kwon, J., & Korc, M. (2017). Pancreatic cancer: Stroma and its current and emerging targeted therapies. *Cancer Letters*, 391, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.035>
15. Raj, D., Aicher, A., & Heeschen, C. (2015). Concise Review: Stem Cells in Pancreatic Cancer: From Concept to Translation. *Stem Cells*, 33(10), 2893–2902. <https://doi.org/10.1002/stem.2114>
16. Moletta, L., Serafini, S., Valmasoni, M., Pierobon, E. S., Ponzoni, A., & Sperti, C. (2019). Surgery for recurrent pancreatic cancer: Is it effective? *Cancers*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11070991>
17. Nevala-Plagemann, C., Hidalgo, M., & Garrido-Laguna, I. (2020). From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(2), 108–123. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0281-6>

18. Klaiber, U., Hackert, T., & Neoptolemos, J. P. (2019). Adjuvant treatment for pancreatic cancer. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 4(April). <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.04.04>
19. Kurata, N., Fujita, H., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Mahawithitwong, P., Sakai, H., Onimaru, M., Manabe, T., Ohtsuka, T., & Tanaka, M. (2011). Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil. *International Journal of Oncology*, 39(2), 473–482. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1058>
20. Chaney, S. G., & Sancar, A. (1996). DNA repair: Enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(19), 1346–1360. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.19.1346>
21. Friboulet, L., Olausson, K. A., Pignon, J.-P., Shepherd, F. A., Tsao, M.-S., Graziano, S., Kratzke, R., Douillard, J.-Y., Seymour, L., Pirker, R., Filipits, M., André, F., Solary, E., Ponsonnailles, F., Robin, A., Stoclin, A., Dorvault, N., Commo, F., Adam, J., ... Soria, J.-C. (2013). ERCC1 Isoform Expression and DNA Repair in Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(12), 1101–1110. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1214271>
22. Capello, M., Lee, M., Wang, H., Babel, I., Katz, M. H., Fleming, J. B., Maitra, A., Wang, H., Tian, W., Taguchi, A., & Hanash, S. M. (2015). Carboxylesterase 2 as a Determinant of Response to Irinotecan and Neoadjuvant FOLFIRINOX Therapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(8), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv132>
23. Grasso, C., Jansen, G., & Giovannetti, E. (2017). Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 114, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.03.026>
24. Dhayat, S. A., Mardin, W. A., Seggewiß, J., Ströse, A. J., Matuszcak, C., Hummel, R., Senninger, N., Mees, S. T., & Haier, J. (2015). MicroRNA profiling implies new markers of gemcitabine chemoresistance in mutant p53 pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143755>
25. Nakano, Y., Tanno, S., Koizumi, K., Nishikawa, T., Nakamura, K., Minoguchi, M., Izawa, T., Mizukami, Y., Okumura, T., & Kohgo, Y. (2007). Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. *British Journal of Cancer*, 96(3), 457–463. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603559>
26. Erkan, M., Kleeff, J., Esposito, I., Giese, T., Ketterer, K., Büchler, M. W., Giese, N. A., & Friess, H. (2005). Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene*, 24(27), 4421–4432. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208642>
27. Bondar, V. M., Sweeney-Gotsch, B., Andreeff, M., Mills, G. B., & McConkey, D. J. (2002). Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(12), 989–997.
28. Duxbury, M. S., Ito, H., Benoit, E., Waseem, T., Ashley, S. W., & Whang, E. E. (2005). RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3433–3438. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1510>
29. Yardley, D. A. (2013). Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *Journal of Controlled Release*, 170(3), 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.041>
30. Desai, N., Trieu, V., Damascelli, B., & Soon-Shiong, P. (2009). SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer

- patients. *Translational Oncology*, 2(2), 59–64. <https://doi.org/10.1593/tlo.09109>
31. Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., ... Renschler, M. F. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1304369>
 32. Zhang, Y., Hochster, H., Stein, S., & Lacy, J. (2015). Gemcitabine plus nab-paclitaxel for advanced pancreatic cancer after first-line FOLFIRINOX: Single institution retrospective review of efficacy and toxicity. *Experimental Hematology and Oncology*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40164-015-0025-y>
 33. Glicksman, R. M., Chung, H., Myrehaug, S., Erler, D., Korol, R., Karotki, A., Taggar, A., & Ung, Y. C. (2020). Stereotactic Radiotherapy for Pancreatic Cancer: A Single-Institution Experience. *Cureus*, 12(December 2017). <https://doi.org/10.7759/cureus.10618>
 34. Mc Carthy, D. J., Malhotra, M., O'Mahony, A. M., Cryan, J. F., & O'Driscoll, C. M. (2015). Nanoparticles and the blood-brain barrier: Advancing from in-vitro models towards therapeutic significance. *Pharmaceutical Research*, 32(4), 1161–1185. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1545-6>
 35. Mhatre V. Ho and Kelsey C. Martin, J.-A. L. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.19.Nanoparticle>
 36. Fang, J., Nakamura, H., & Maeda, H. (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
 37. Appleton, S. L., Tannous, M., Argenziano, M., Muntoni, E., Rosa, A. C., Rossi, D., Caldera, F., Scomparin, A., Trotta, F., & Cavalli, R. (2020). Nanosponges as protein delivery systems: Insulin, a case study. *International Journal of Pharmaceutics*, 590(September), 119888. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119888>
 38. Trotta, F., Zanetti, M., & Cavalli, R. (2012). Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8, 2091–2099. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.235>
 39. Caldera, F., Tannous, M., Cavalli, R., Zanetti, M., & Trotta, F. (2017). Evolution of Cyclodextrin Nanosponges. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(2), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.072>
 40. Daga, M., Ullio, C., Argenziano, M., Dianzani, C., Cavalli, R., Trotta, F., Ferretti, C., Zara, G. P., Gigliotti, C. L., Ciamporcerio, E. S., Pettazzoni, P., Corti, D., Pizzimenti, S., & Barrera, G. (2016). GSH-targeted nanosponges increase doxorubicin-induced toxicity “in vitro” and “in vivo” in cancer cells with high antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.009>
 41. Caldera, F., Argenziano, M., Trotta, F., Dianzani, C., Gigliotti, L., Tannous, M., Pastero, L., Aquilano, D., Nishimoto, T., Higashiyama, T., & Cavalli, R. (2018). Cyclic nigerosyl-1,6-nigerose-based nanosponges: An innovative pH and time-controlled nanocarrier for improving cancer treatment. *Carbohydrate Polymers*, 194(February), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.027>
 42. Argenziano, M., Lombardi, C., Ferrara, B., Trotta, F., Caldera, F., Blangetti, M., Koltai, H., Kapulnik, Y., Yarden, R., Gigliotti, L., Dianzani, U., Dianzani, C., Prandi, C., & Cavalli, R. (2018). Glutathione/pH-responsive nanosponges enhance strigolactone delivery to prostate cancer cells. *Oncotarget*, 9(88), 35813–35829. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26287>
 43. Gigliotti, C. L., Minelli, R., Cavalli, R., Occhipinti, S., Barrera, G., Pizzimenti, S.,

- Cappellano, G., Boggio, E., Conti, L., Fantozzi, R., Giovarelli, M., Trotta, F., Dianzani, U., & Dianzani, C. (2016). In Vitro and In Vivo Therapeutic Evaluation of Camptothecin-Encapsulated β -Cyclodextrin Nanosponges in Prostate Cancer. *Journal of biomedical nanotechnology*, 12(1), 114–127. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2144>
44. Cavalli R., Trotta F., Tumiatti W., Serpe L., & Zara G.P. (2006). 5-Fluorouracil loaded β -cyclodextrin nanosponges: in vitro characterization and cytotoxicity. *Proceedings XIII International Cyclodextrin Symposium*, 14–17 May, p. 207.
 45. Pushpalatha, R., Selvamuthukumar, S., & Kilimozhi, D. (2018). Cross-linked, cyclodextrin-based nanosponges for curcumin delivery - Physicochemical characterization, drug release, stability and cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 45(November 2017), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.03.004>
 46. Ansari, K. A., Vavia, P. R., Trotta, F., & Cavalli, R. (2011). Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), 279–286. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9584-3>
 47. Dilnawaz, F., & Sahoo, S. K. (2013). Enhanced accumulation of curcumin and temozolomide loaded magnetic nanoparticles executes profound cytotoxic effect in glioblastoma spheroid model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3 PART A), 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.013>
 48. Dora, C. P., Trotta, F., Kushwah, V., Devasari, N., Singh, C., Suresh, S., & Jain, S. (2016). Potential of erlotinib cyclodextrin nanosponge complex to enhance solubility, dissolution rate, in vitro cytotoxicity and oral bioavailability. *Carbohydrate Polymers*, 137, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.080>
 49. Cavalli, R., Argenziano, M., Vigna, E., Giustetto, P., Torres, E., Aime, S., & Terreno, E. (2015). Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 129, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.023>
 50. Khan, M. S., Hwang, J., Lee, K., Choi, Y., Kim, K., Koo, H. J., Hong, J. W., & Choi, J. (2018). Oxygen-carrying micro/nanobubbles: Composition, synthesis techniques and potential prospects in photo-triggered theranostics. *Molecules*, 23(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules23092210>
 51. Ficiarà, E., Ansari, S. A., Argenziano, M., Cangemi, L., Monge, C., Cavalli, R., & D'Agata, F. (2020). Beyond oncological hyperthermia: Physically drivable magnetic nanobubbles as novel multipurpose theranostic carriers in the central nervous system. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092104>
 52. Zullino, S., Argenziano, M., Ansari, S., Ciprian, R., Nasi, L., Albertini, F., Cavalli, R., & Guiot, C. (2019). Superparamagnetic oxygen-loaded nanobubbles to enhance tumor oxygenation during hyperthermia. *Frontiers in Pharmacology*, 10(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01001>
 53. Chandan, R., & Banerjee, R. (2018). Pro-apoptotic liposomes-nanobubble conjugate synergistic with paclitaxel: A platform for ultrasound responsive image-guided drug delivery. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21084-8>
 54. Meng, M., Gao, J., Wu, C., Zhou, X., Zang, X., Lin, X., Liu, H., Wang, C., Su, H., Liu, K., Wang, Y., Xue, X., & Wu, J. (2016). Doxorubicin nanobubble for combining ultrasonography and targeted chemotherapy of rabbit with VX2 liver tumor. *Tumor Biology*, 37(7), 8673–8680. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4525-5>
 55. Li, Q., Li, H., He, C., Jing, Z., Liu, C., Xie, J., Ma, W., & Deng, H. (2017). The use of 5-fluorouracil-loaded nanobubbles combined with low-frequency ultrasound to treat hepatocellular carcinoma in nude mice. *European Journal of Medical Research*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40001-017-0291-8>

56. Cavalli, R., Argenziano, M., Vigna, E., Giustetto, P., Torres, E., Aime, S., & Terreno, E. (2015). Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 129, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.023>
57. Cavalli, R., Bisazza, A., Trotta, M., Argenziano, M., Civra, A., Donalisio, M., & Lembo, D. (2012). New chitosan nanobubbles for ultrasound-mediated gene delivery: Preparation and in vitro characterization. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3309–3318. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30912>