

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE

Tecnologie Biomediche
MED/33 – Malattie dell'apparato locomotore

Ciclo XXI

**IDENTIFICAZIONE DI BERSAGLI TERAPEUTICI E
REALIZZAZIONE DI TECNOLOGIE INNOVATIVE IN
ONCOLOGIA ORTOPEDICA**

Tesi di Dottorato

Presentata da:

Dr.ssa Manuela Salerno

Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa Marialuisa Zerbini

Relatore

Chiar.mo Prof. Armando Giunti

Correlatori

Prof. Nicola Baldini

Dr.ssa Elisabetta Cenni

Esame finale anno 2009

SOMMARIO

INTRODUZIONE	4
Metastasi osteolitiche	4
Trattamenti contro le metastasi osteolitiche	7
Nanomedicina.....	10
Nanovettori	13
Nanoparticelle per il drug delivery	15
Tossicità delle nanoparticelle	16
Materiali per la sintesi di nanoparticelle.....	19
Bone targeting	23
Bisfosfonati.....	24
Applicazioni dei bisfosfonati nel bone targeting.....	27
OBIETTIVO DELLO STUDIO	29
MATERIALI E METODI.....	31
Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità del coniugato tra acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) ed alendronato.....	31
Sintesi del coniugato	31
Saggi di emocompatibilità.....	32
Saggi di citocompatibilità	34
Analisi statistica	36
Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità di nanoparticelle per il bone targeting.....	36
Preparazione delle nanoparticelle	36
Saggi di emocompatibilità.....	38
Saggi di citocompatibilità	42
Analisi statistica	45
Valutazione dell'efficacia antiosteolitica.....	45
Isolamento e coltura di osteoclasti.....	45
Formazione di cellule giganti multinucleate	46
Induzione dell'apoptosi degli osteoclasti.....	46
Inibizione della degradazione del collagene di tipo I	47
Analisi statistica	47

Valutazione in vitro dell'efficacia del bone targeting	47
Test di affinità nelle nanoparticelle per l'idrossiapatite.....	48
Preparazione di nanoparticelle caricate con il farmaco antineoplastico.....	49
Preparazione di nanoparticelle caricate con doxorubicina.....	49
Valutazione del legame alla doxorubicina	50
Sterilizzazione delle nanoparticelle	50
Valutazione in vitro dell'efficacia delle nanoparticelle caricate con doxorubicina.....	51
Colture cellulari.....	51
Uptake della doxorubicina incapsulata nelle nanoparticelle	52
Inibizione della proliferazione delle cellule neoplastiche.....	53
Analisi statistica	54
Valutazione dell'efficacia in vivo	55
Induzione delle metastasi osteolitiche	55
Somministrazione dei trattamenti	55
Valutazione dell'efficacia dei trattamenti.....	56
RISULTATI	57
Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità del coniugato tra acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) ed alendronato.....	57
Efficienza di coniugazione	57
Saggi di emocompatibilità.....	60
Saggi di citocompatibilità	61
Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità di nanoparticelle per il bone targeting.....	64
Preparazione e caratterizzazione	64
Saggi di emocompatibilità.....	65
Saggi di citocompatibilità	71
Valutazione dell'efficacia antiosteolitica.....	73
Formazione di cellule giganti multinucleate	73
Induzione dell'apoptosi degli osteoclasti.....	75
Inibizione della degradazione del collagene di tipo I	77
Valutazione in vitro dell'efficacia nel bone targeting	79
Affinità delle nanoparticelle per l'idrossiapatite.....	79
Preparazione di nanoparticelle caricate con il farmaco antineoplastico.....	80

Preparazioni e caratterizzazione	80
Valutazione del legame alla doxorubicina	81
Sterilizzazione delle nanoparticelle	81
Valutazione in vitro dell'efficacia delle nanoparticelle caricate con doxorubicina.....	84
Uptake della doxorubicina incapsulata alle nanoparticelle	84
Inibizione della proliferazione delle cellule neoplastiche.....	86
Valutazione dell'efficacia in vivo	93
Inibizione dell'incidenza di metastasi osteolitiche	93
Valutazione dell'area osteolitica	94
Valutazione del numero di osteoclasti	94
DISCUSSIONE	96
CONCLUSIONE	111
BIBLIOGRAFIA.....	112

INTRODUZIONE

Metastasi osteolitiche

Il cancro è una malattia che colpisce milioni di persone nel mondo: stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità riportano che ogni anno oltre 10 milioni di persone sviluppano questa malattia, e solo nel 2000 sono stati stimati circa 6,5 milioni di decessi (Ferlay J et al, 2004). Lo scheletro rappresenta il terzo organo per frequenza di incidenza di metastasi. Diversi tumori primitivi, quali il carcinoma della mammella, della prostata, del polmone, ed il neuroblastoma causano più frequentemente metastasi scheletriche. In molti pazienti, la presenza di localizzazioni secondarie a livello osseo rappresenta una condizione cronica che influisce profondamente sulla prognosi e sulla sopravvivenza a lungo termine: da un'analisi post-mortem condotta su pazienti deceduti a causa di carcinoma della mammella o della prostata, è risultato che circa il 70% aveva sviluppato metastasi scheletriche (Galasko C, 1981).

I pazienti affetti da metastasi ossee subiscono gravi complicazioni: come riportato in letteratura, su 500 individui con carcinoma della mammella, il 17% presenta ipercalcemia, il 16% fratture patologiche ed il 3% compressione spinale (Coleman RE et al, 1998). Inoltre, il paziente è spesso costretto all'immobilità e accusa forti dolori ossei. Di conseguenza, la necessità di trattamenti capaci di apportare miglioramenti alla qualità della vita ed alla probabilità di

sopravvivenza dei pazienti con metastasi scheletriche comporta un notevole carico sociale ed economico. Le metastasi si localizzano soprattutto allo scheletro assiale, sede di midollo osseo, suggerendo che le proprietà fisiche del sistema circolatorio a livello locale, come la struttura dei capillari e il rallentamento del flusso sanguigno, favoriscano l'attecchimento delle cellule tumorali circolanti e quindi lo sviluppo di metastasi (Coleman RE, 1997).

L'insorgenza di metastasi è un fenomeno molto complesso che avviene attraverso numerosi passaggi: angiogenesi, adesione alla matrice extracellulare, invasione, proliferazione cellulare (Woodhouse EC et al, 1997).

L'angiogenesi, vale a dire la formazione di nuovi vasi sanguigni, è fondamentale per lo sviluppo del tumore e delle metastasi. Un alto grado di vascolarizzazione favorisce l'ingresso delle cellule tumorali nel sistema circolatorio e la loro distribuzione in siti secondari, facilitata anche dalla maggiore permeabilità dei vasi di nuova formazione. Il processo angiogenetico viene sostenuto dalla produzione di fattori di crescita da parte delle cellule tumorali, quali il Vascular Permeability Growth Factor (VPF), il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), il Transforming Growth Factor- α (Denijn M et al, 1993).

Successivamente, le cellule neoplastiche aderiscono alla matrice extracellulare per mezzo delle integrine. Questi recettori cellulari transmembrana sono capaci di legare proteine della matrice quali la laminina, la fibronectina, la vitronectina, il collagene (Danen EH et al, 1995), tramite la sequenza tripeptidica conservata Arg-Gly-Asp (RGD; Humphries MJ et al, 1986).

L'invasione consiste nella traslocazione delle cellule neoplastiche attraverso la barriera costituita dalla matrice extracellulare, ed è un

processo che richiede la proteolisi della componente organica della matrice per azione di metalloproteinasi, come le collagenasi e le gelatinasi (Matrisian LM, 1990), l'estensione di pseudopodi e la migrazione cellulare.

Infine, la proliferazione delle cellule tumorali viene stimolata dai fattori di crescita presenti a livello locale, tra cui interleuchina (IL)-8 (Schadendorf D et al, 1993), Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), Epidermal Growth Factor (Blat C et al, 1989; de Wit PE et al, 1992). La conseguenza di questi eventi è l'attivazione delle cellule deputate al riassorbimento osseo, gli osteoclasti. Queste cellule vengono attivate attraverso la produzione di potenti fattori di crescita e citochine da parte delle cellule metastatiche, come il Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP), IL-11, IL-8, IL-6 e Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B ligand (RANKL; Bendre MS et al, 2005; Mundy GR, 2002; Roodman GD, 2004; Roudier MP et al, 2003).

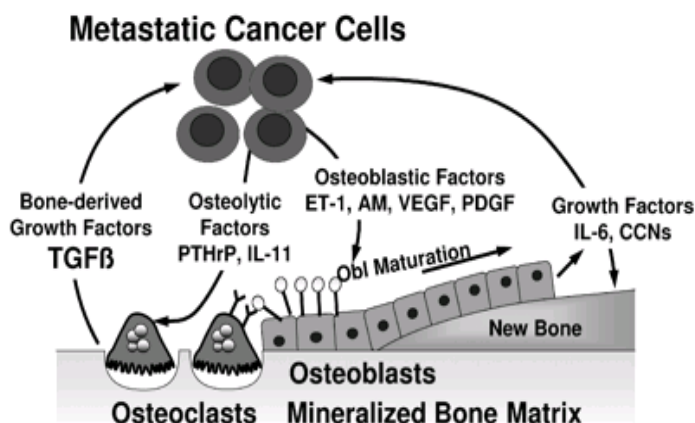


Figura 1. Schema del meccanismo di sviluppo delle metastasi osteolitiche.

degradazione massiccia dell'osso a livello delle metastasi osteolitiche. All'interno della matrice extracellulare ossea, infatti,

Alcuni dati riguardanti le metastasi da carcinoma della mammella dimostrano un ruolo del Transforming Growth Factor- β (TGF- β) e di altri fattori prodotti dal tumore, come PTHrP, in un circolo vizioso che comporta la

sono intrappolati numerosi fattori di crescita, tra cui TGF- β , rilasciati in forma attiva durante la sua degradazione da parte degli osteoclasti (Dallas SL et al, 2002), che stimolano la produzione di PTHrP da parte delle cellule tumorali. Il PTHrP esercita un'ulteriore azione induttiva sugli osteoclasti (Fig. 1). Il risultato di questo circolo vizioso è lo sviluppo di gravi lesioni osteolitiche (Conte P et al, 2004; Guise TA et al, 2006).

I meccanismi che intervengono in ciascuna di queste fasi sono il risultato di eventi molecolari complessi, che rendono difficile lo sviluppo di terapie efficaci.

Trattamenti contro le metastasi osteolitiche

Le metastasi osteolitiche comportano una drastica riduzione della qualità della vita dei pazienti ed incidono negativamente sulla loro sopravvivenza.

Le terapie tradizionali prevedono la combinazione di trattamenti locali, come la chirurgia e la radioterapia, e terapie sistemiche, come la chemioterapia, l'immunoterapia, la terapia ormonale e, più recentemente, l'utilizzo dei bisfosfonati (Clark JC et al, 2008). L'obiettivo principale del trattamento chirurgico è la rimozione delle cellule neoplastiche dal sito della lesione, per un ripristino della corretta funzionalità del tessuto danneggiato, del movimento, ed una riduzione del dolore. I progressi ottenuti nelle tecniche ortopediche e nel disegno di impianti ha reso possibile il conseguimento di migliori risultati, ma vi sono dei limiti rappresentati dagli scarsi effetti di questi trattamenti sulla progressione del tumore. Pertanto, per il controllo a lungo termine della malattia, si ricorre alle terapie sistemiche (Riccio AI et al, 2007). Tra i farmaci convenzionalmente utilizzati in chemioterapia vi sono la doxorubicina (DXR) ed i taxani,

molto potenti nel trattamento del carcinoma mammario (Yu MK et al, 2004). La scarsa efficacia di queste molecole nel trattamento delle metastasi ossee è dovuta principalmente alla mancanza di targeting specifico, che comporta una distribuzione generalizzata a tutto il corpo, e l'elevata velocità di degradazione ed eliminazione. Questi problemi impongono un aumento della frequenza di somministrazione del farmaco ed un incremento del dosaggio, con l'insorgenza di gravi effetti collaterali. Inoltre, molti di questi farmaci sono poco solubili, e rendono necessario l'utilizzo di adiuvanti o eccipienti, anch'essi associati ad effetti indesiderati (Adams JD et al, 1993; Fang J et al, 2003).

La DXR (Fig. 2) è un farmaco antineoplastico appartenente alla famiglia degli antibiotici antracicline ed è molto utilizzato nel trattamento del carcinoma metastatico della mammella e della prostata, così come del neuroblastoma e dell'osteosarcoma. La

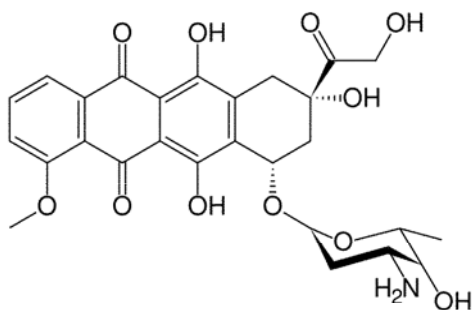


Figura 2. Struttura chimica della doxorubicina.

DXR induce apoptosi delle cellule tumorali ed esercita anche un effetto inibente l'angiogenesi (Houston SJ et al, 1995; Miller KD et al, 2001). La

citotossicità esercitata dalla DXR

sulle cellule neoplastiche è conseguenza di meccanismi molto

complessi, come la generazione di specie reattive dell'ossigeno, l'inibizione del sistema 'DNA mismatch repair', ed il disturbo nel funzionamento della topoisomerasi II (Estlin EJ et al, 2003; Nadin SB et al, 2003). Come tutte le molecole della famiglia delle antracicline, la DXR agisce intercalandosi alla doppia elica del DNA durante la replicazione cellulare. Questo comporta la formazione di complesso ternario con l'enzima ed il filamento di DNA, che

previene lo svolgimento della doppia elica, bloccando la trascrizione e la replicazione (Zunino F et al, 1990). La DXR, come tutte le antracicline, possiede inoltre una naturale fluorescenza rossa (Silvestrini R et al, 1970), e di conseguenza il suo accumulo intracellulare può essere monitorato per semplice osservazione al microscopio (Egorin MJ et al, 1974). La DXR si accumula a livello nucleare nelle cellule sensibili alla sua azione farmacologica, mentre la presenza della glicoproteina P conferisce farmaco-resistenza (Baldini et al, 1995). La glicoproteina P è una pompa ATP-dipendente, attiva a livello delle membrane cellulari e codificata dal gene MDR1, ed è responsabile dell'efflusso dal nucleo di molti farmaci comunemente utilizzati in terapia, come le antracicline, l'actinomicina D ed alcuni alcaloidi (Chen CJ et al, 1990). Osservando il pattern di distribuzione della DXR al microscopio è quindi possibile distinguere *in vitro* le cellule sensibili all'azione della DXR da quelle resistenti: le prime presentano una fluorescenza rossa brillante nel nucleo; al contrario, una fluorescenza debole nel citoplasma ed assente nel nucleo identifica le cellule resistenti (Baldini N et al, 1992). Lo sviluppo di farmaco-resistenza è peraltro dovuta a diversi meccanismi, come l'aumento dell'efflusso del farmaco attraverso la glicoproteina P, l'aumento delle difese antiossidanti e la down-regolazione della topoisomerasi II (Dingemans AM et al, 1998). Questi meccanismi, insieme all'elevata tossicità dose-dipendente esercitata sul tessuto cardiaco e sul midollo osseo, limitano l'efficacia terapeutica del farmaco (Richardson DS et al, 1997).

Le terapie innovative che sono attualmente allo studio per la cura dell'osteolisi tumorale prevedono l'inibizione diretta del riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti, agendo su elementi

chiave del processo come il circuito di RANKL e del suo recettore RANK, l'enzima catepsina K, la tirosina chinasi c-Src (Brounais B et al, 2008; Clark JC et al, 2008; Le Gall C et al, 2007; Lipton A, 2006). In effetti, studi clinici hanno evidenziato che la somministrazione sistemica dei bisfosfonati, che inibiscono il differenziamento e l'attività degli osteoclasti (Rogers MJ et al, 2000), riduce significativamente le complicazioni scheletriche di pazienti con metastasi da carcinoma della mammella (Brounais B et al, 2008; Conte P et al, 2004).

Nanomedicina

Nonostante gli enormi passi avanti compiuti negli ultimi decenni dalla ricerca sui meccanismi biologici alla base del cancro, le attuali terapie presentano ancora numerosi limiti. E' perciò necessario sviluppare approcci più razionali e specifici che possano potenziare gli effetti dei farmaci convenzionali riducendone gli effetti collaterali.

L'applicazione in campo medico dei recenti progressi ottenuti nel settore delle nanotecnologie ha permesso lo sviluppo di una promettente area multidisciplinare che comprende la chimica dei materiali, la fisica e la biologia molecolare, definita come 'nanomedicina' (Lehn JM, 2002). Questa scienza mira a fornire un valido insieme di strumenti di ricerca e di dispositivi clinicamente utili nel campo della medicina rigenerativa, della diagnostica e dello sviluppo di nuovi approcci di *drug delivery*.

La maggior parte degli strumenti utilizzati in nanomedicina come 'carriers' di altre molecole sono chiamati 'nanovettori' (NV). I NV sono complessi sistemi iniettabili di dimensione nanometrica (10-1000 nm), costituiti da almeno tre elementi, che includono un

materiale di partenza, una molecola biologica farmacologicamente attiva 'caricata' nel materiale, come ad esempio un farmaco antineoplastico, ed una modificazione biologica che ne permetta una corretta biodistribuzione ed una localizzazione selettiva (Duncan R, 2003; ^{a,b}Ferrari M, 2005). Gli anticorpi rappresentano il primo esempio di modificazione superficiale, ma in seguito sono stati sviluppati sistemi più complessi. I NV rappresentano strumenti molto utili nel campo del *drug delivery*, in altre parole nel trasporto controllato di chemioterapici al sito di insorgenza del tumore o della metastasi. Questo obiettivo può essere raggiunto attraverso due metodi. Il 'targeting passivo' del vettore e del farmaco in esso incapsulato è possibile grazie alle proprietà chimico-fisiche del costrutto, come dimensione, idrofilicità, carica di superficie, ma soprattutto grazie alle peculiari caratteristiche del tumore. In particolare, l'endotelio vascolare tumorale presenta diverse alterazioni rispetto alle condizioni fisiologiche: si osservano, infatti, un numero elevato di cellule proliferanti, una riduzione dei periciti ed una formazione aberrante della membrana basale vascolare che implica la presenza di aperture intercellulari che possono raggiungere i 2 μm di larghezza (Baban D et al, 1998; McDonald DM et al, 2002; Seymour LW, 1992). Inoltre, nei tessuti neoplastici avviene spesso un serio danneggiamento delle vie linfatiche, che permette un ulteriore accumulo delle molecole trasportate negli interstizi tumorali. Questo particolare concetto, denominato 'effetto EPR' (*Enhanced Penetration and Retention*), spiega come i NV riescano passivamente a giungere nel tumore attraverso i vasi che lo supportano, rilasciando le molecole incapsulate esclusivamente nel sito desiderato (Fig. 3). La possibilità di funzionalizzare i NV attraverso il legame con molecole che conferiscono specificità per la

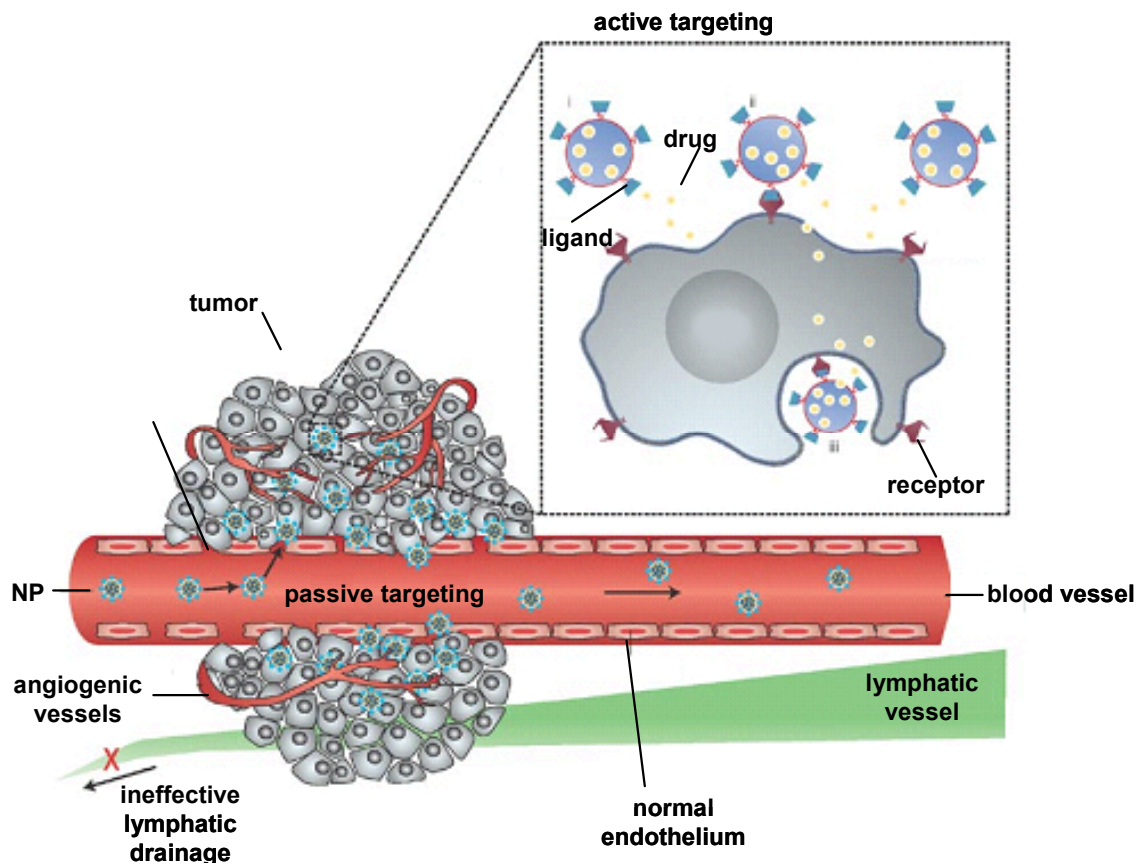


Figura 3. L'alterazione della permeabilità dell'endotelio tumorale (effetto EPR) favorisce il targeting passivo e attivo delle NP.

cellula neoplastica permette inoltre di esercitare un 'targeting attivo' (Moghimi SM et al, 2001). Questa strategia permette ai farmaci l'attraversamento delle barriere biologiche, ad esempio quella emato-encefalica. Nel caso di sistemi per il targeting passivo e attivo è essenziale evitare l'uptake dei NV da parte dei macrofagi del sistema reticoloendoteliale (RES), deputato alla rimozione di particelle estranee dal circolo sistemico. Questo è importante affinché il vettore stesso ed il farmaco ad esso coniugato possano permanere in circolo per un tempo sufficiente da garantire il raggiungimento della vascolarizzazione tumorale.

Le strategie di targeting permettono in definitiva di concentrare il farmaco solo dove necessario, potenziando la sua efficacia

terapeutica e limitandone la presenza nel circolo sistemico, con conseguente riduzione degli effetti collaterali.

Nanovettori

Un esempio di NV per il *drug delivery* nel trattamento del cancro è costituito dai liposomi. I primi studi sui liposomi hanno chiarito il meccanismo di riconoscimento ed eliminazione da parte delle cellule, per mezzo del RES (^aMoghimi SM et al, 2001). Questo ha permesso di sviluppare delle strategie per impedire questo evento, come la 'PEGilazione', vale a dire l'aggiunta di poly(ethylene glycol) (PEG). Tale modificazione permette una stabilizzazione sterica del vettore, proteggendolo dalla fagocitosi e distruzione da parte dei macrofagi residenti nel RES, aumentando la stabilità e quindi l'efficacia terapeutica dell'agente incapsulato (Allen C et al, 2002; Dass CR et al, 1997; Gabizon A et al, 2004). L'applicazione di altri approcci ai liposomi ha aperto la strada al targeting basato sui 'biomarcatori', che rendono i vettori molto specifici per il sito bersaglio. Ad esempio, l'uso di proteine specifiche come il tripeptide RGD, associato alle integrine della matrice extracellulare, si è rivelato molto utile nel targeting dell'endotelio tumorale (Dubey PK et al, 2004). Il peptide vasoattivo intestinale (VIP) è stato molto utilizzato per il targeting dei tumori gastrici (Sethi V et al, 2005).

Il primo esempio di applicazione dell'utilizzo dei liposomi nel trasporto di farmaci antineoplastici è rappresentato dal trasporto controllato della DXR, la cui efficacia è stata dimostrata da studi preclinici. E' stato infatti dimostrato che l'incapsulazione della DXR in liposomi anionici ne riduce significativamente la cardiotossicità, migliorandone allo stesso tempo gli effetti antineoplastici (Forssen E et al, 1983, Treat J et al, 1990). Le attuali applicazioni dei liposomi

comprendono il targeting di cellule tumorali per il trasporto di anticorpi, proteine, peptidi, farmaci antineoplastici, bisfosfonati, e quello di acidi nucleici nella terapia genica (Fenske DB et al, 2008; Samad A et al, 2007).

Tra i NV sono molto utilizzati i coniugati polimerici, come quelli ottenuti dal polimero N-(2-idrossipropil)metacrilamide (HPMA) ed acido ialuronico. Essi sono stati utilizzati in passato per il trasporto della DXR in cellule di tumori ovarici e del colon, che sovraesprimono il recettore per l'acido ialuronico (Luo Y et al, 2002). Gli aptameri, costituiti dall'acido polidrossialcanoico (PLGA) coniugato ad acidi nucleici, sono un recente esempio di coniugato polimerico e sono stati impiegati per il trattamento del carcinoma della prostata (Farokhzad OC et al, 2004).

I dendrimeri, un altro esempio di NV, sono polimeri sintetici auto-assemblanti, la cui conformazione dipende dal microambiente in cui essi si trovano. Sono stati utilizzati nel trasporto di farmaci e di DNA plasmidico per terapia genica (Lee JH et al, 2003).

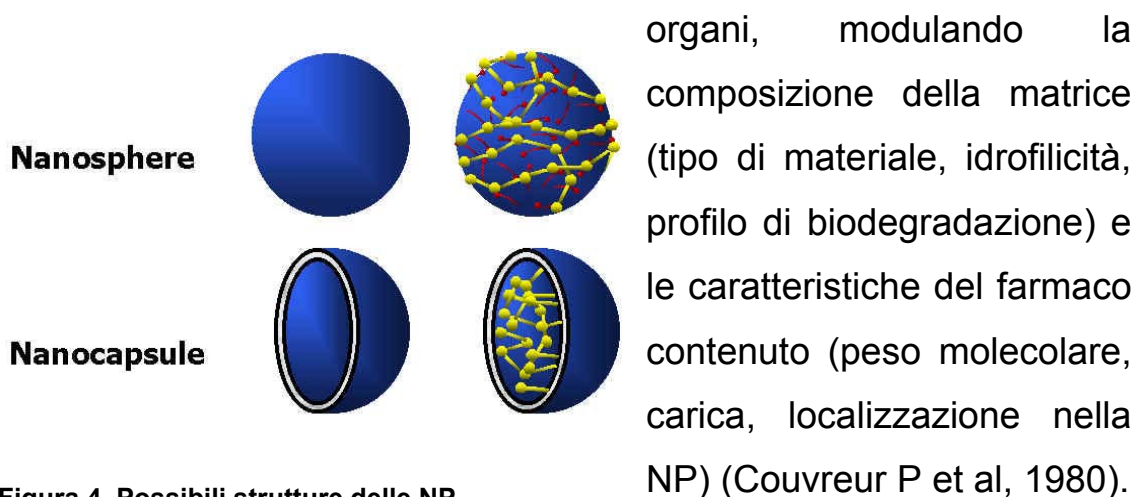
Micelle e nanoparticelle sono NV colloidali che contengono un principio attivo disperso, incapsulato, adsorbito oppure legato alla loro superficie (Rawat M et al, 2006). Il loro utilizzo è applicabile in vari campi della nanomedicina, come l'imaging diagnostico ed il trasporto per via endovenosa di farmaci, acidi nucleici e proteine (Chorny M et al, 2004; Lu W et al, 2006; Mitra A et al, 2006). In particolare, questi NV sono molto utili nel *drug delivery*, poiché permettono il trasporto per via sistemica di farmaci anche insolubili in acqua, come il paclitaxel, ampiamente utilizzato in chemioterapia (Zeng F et al, 2004; Torchilin VP, 2005).

Nanoparticelle per il *drug delivery*

La difficoltà dei farmaci convenzionali nel raggiungere il punto esatto di insorgenza di un tumore o di una metastasi è uno dei principali ostacoli allo sviluppo di terapie efficaci e prive di effetti collaterali.

Le nanoparticelle (NP) forniscono uno strumento utile per la risoluzione di questo problema grazie alle loro caratteristiche. Nonostante, per definizione, le NP possiedano una dimensione inferiore a 100 nm, NP per il *drug delivery* essi possono avere una dimensione maggiore, poiché ciò permette l'incapsulazione di sufficienti quantità di farmaco (De Jong WH et al, 2008).

Variando il metodo di sintesi delle NP è possibile ottenere 'nanocapsule' o 'nanosfere' (Fig. 4). Nel primo caso il farmaco è confinato all'interno di una cavità circondata da una membrana, mentre nel secondo esso è uniformemente disperso in una matrice di varia natura. In entrambe le situazioni è possibile esercitare una grande influenza sulla farmacodistribuzione finale all'interno degli



organi, modulando la composizione della matrice (tipo di materiale, idrofilicità, profilo di biodegradazione) e le caratteristiche del farmaco contenuto (peso molecolare, carica, localizzazione nella NP) (Couvreur P et al, 1980).

Figura 4. Possibili strutture delle NP.

Le NP sono state utilizzate nella terapia oncologica per il targeting di cellule tumorali e di fattori coinvolti nel processo di angiogenesi, dal cui apporto dipende la crescita del tumore (Folkman J, 2003). E' possibile utilizzare un

vasto numero di materiali per preparazione delle NP, e molte caratteristiche del costrutto finale dipendono dalla scelta effettuata.

Tossicità delle nanoparticelle

In generale, qualunque sia l'applicazione della nanomedicina, compreso l'uso di NP per il *drug delivery*, bisogna considerare la possibile insorgenza di effetti collaterali. Ciò è dovuto al fatto che un dispositivo nanostrutturato possiede proprietà chimico-fisiche diverse da quelle di particelle di dimensioni maggiori, che possono risultare in cambiamenti nella distribuzione sistemica, attivare la coagulazione ed influire sul metabolismo cellulare. Le caratteristiche di superficie rappresentano un fattore determinante poiché questa rappresenta l'interfaccia d'interazione con i componenti biologici. La dimensione ridotta, unita all'elevata energia di superficie, rende le NP molto reattive rispetto a particelle più grandi, in quanto il rapporto superficie/volume risulta parecchio elevato, e questo può comportare un aumento della loro tossicità. Ad esempio, particelle di piccole dimensioni con superfici idrofobiche vengono eliminate dalle cellule fagocitiche e di conseguenza si accumulano facilmente nel fegato e nella milza (Borm PJ et al, 2006; Gref R et al, 1994). Uno studio *in vivo* ha dimostrato che NP a base di polistirene con dimensione variabile tra i 50 nm ed i 500 nm mostrano elevati livelli di aggregazione rispetto a particelle più grandi (Nagayama S et al, 2007).

Tuttavia, allo stato attuale, mancano informazioni complete sul comportamento biologico delle NP in termini di distribuzione nei vari organi e suoi loro effetti a livello cellulare. Le NP possono attivare i processi infiammatori (Brown DM et al, 2004), o indurre la generazione di specie reattive dell'ossigeno, che comportano uno

stress ossidativo inibente la funzionalità degli epatociti (Brown DM et al, 2001; Stone V et al, 1994). Pertanto, quando si sviluppano sistemi iniettabili per via parenterale per il targeting di metastasi a livello del tessuto osseo, è obbligatorio verificare l'effettiva biocompatibilità del sistema, poiché da essi dipende l'insorgenza di effetti emo- e cito-tossici, così come l'emivita delle NP nel sistema circolatorio, determinante affinché il farmaco possa giungere nel sito target senza disperdersi.

Molto di ciò che è noto sulla tossicità delle NP deriva dallo studio dagli effetti causati dall'inalazione di queste sostanze. Le NP si accumulano a livello polmonare causando infiammazione (De Jong WH, 2008). Esiste la possibilità che l'infiammazione polmonare comporti cambiamenti della permeabilità della membrana, con la conseguente diffusione delle NP nel sistema circolatorio. I dati ottenuti fino ad ora sono comunque contrastanti, e secondo alcuni studi la traslocazione polmoni-sangue non è stata significativa (Borm PJ et al, 2004).

In seguito all'iniezione endovenosa le NP vengono rapidamente rimosse dalla circolazione dal RES e di conseguenza mostrano un'emivita relativamente breve (Leroux JC et al, 1995). Questo processo avviene poiché le NP presenti nel sangue adsorbono in modo aspecifico alcune proteine sieriche, chiamate 'opsonine', che le rendono facilmente riconoscibili dai macrofagi del RES. Le più comuni opsonine sono le proteine del complemento, come le immunoglobuline C3, C4 e C5 (Owens DE et al, 2006). In seguito all'adsorbimento di opsonine i liposomi possono attivare la via classica o alternativa del complemento (Manjan J et al, 1994). Il processo di opsonizzazione comporta inoltre la rapida aggregazione delle NP e la fagocitosi da parte dei macrofagi circolanti, con

conseguente eliminazione dalla circolazione sanguigna ed accumulo a livello epatico, dove possono causare effetti indesiderati (Lenaerts V et al, 1984). La carica di superficie delle NP ha un ruolo fondamentale nel processo di opsonizzazione: NP neutre vengono opsonizzate molto più lentamente di particelle cariche (Roser et al, 1998). E' stato dimostrato che la 'PEG-ilazione' riduce l'adsorbimento di proteine sieriche, prolungando l'emivita delle NP nel siero (Bazile D et al, 1995). L'utilizzo di polimeri biocompatibili e biodegradabili consente di evitare che l'accumulo a livello epatico danneggi l'organismo (Peracchia MT et al, 1999).

I problemi descritti sopra, che derivano dalla presenza di NP nel sistema circolatorio dopo somministrazione per via endovenosa, devono essere tenuti in considerazione quando si utilizzano dispositivi iniettabili per il *drug delivery*, ma purtroppo i dati attuali che riguardano l'interazione di NP con i componenti ematologici sono pochi e contrastanti. Vi sono evidenze che microparticelle e NP a base di carbonio possono causare aggregazione piastrinica e trombosi, mentre NP a base di fullereni non causano lo stesso effetto, suggerendo che la scelta del materiale per la sintesi del dispositivo può essere determinante (Radomski A et al, 2005). Oltre all'attivazione del complemento dovuta al processo di opsonizzazione, l'interazione delle NP con il sangue può causare altre complicazioni. E' stato dimostrato che NP cationiche, ad esempio a base di oro o di polistirene, causano emolisi ed alterazione della velocità di coagulazione, mentre NP anioniche sono abbastanza atossiche (Borm PJ et al, 2006).

Materiali per la sintesi di nanoparticelle

Affinché il targeting verso le cellule tumorali abbia successo, le NP devono superare barriere biologiche, fisiologiche e fisiche, ed essere rapidamente veicolate nel sito bersaglio.

Una volta somministrate, la loro dimensione, la composizione e le caratteristiche di superficie determinano la solubilità e la stabilità del farmaco ad esse legato. Da ciò dipende la concentrazione nel sito bersaglio, necessaria per evitare effetti indesiderati su altri organi. Una volta giunte nel sito target, le caratteristiche biologiche delle cellule tumorali sono fondamentali per l'uptake cellulare.

Questi eventi possono essere favoriti utilizzando materiali adeguati per la preparazione delle NP. Il giusto compromesso tra il tipo di materiale utilizzato e l'utilizzo di strategie di targeting basate sulle caratteristiche del microambiente tumorale rende possibile la sintesi di un costrutto efficace per il *drug delivery*. Esiste una vasta scelta di materiali organici ed inorganici con cui è possibile preparare NP con varie applicazioni (Tab. 1; De Jong WH et al, 2008)

E' possibile utilizzare materiali organici, come lipidi e colesterolo, per la sintesi di NP per il *drug delivery*, come per i liposomi. La stabilità sterica dei NV derivati dai lipidi può essere migliorata mediante l'incorporazione di derivati artificiali, come anticorpi. Altre molecole biologiche naturali, come proteine o peptidi, sono state utilizzate per la formulazione di NP. L'utilizzo di ferritina, ad esempio, è utile per il trasporto di ossido di ferro nel corpo (Li H et al, 2002). Sono state descritte infine NP a base di gelatina (Balthasar S et al, 2005), ed albumina (Mao SJ et al, 2005).

Classe	Materiali	Applicazione
Materiali naturali o derivati	Chitosano	Drug/Gene delivery
	Destrano	
	Gelatina	
	Alginati	
	Liposomi	
Dendrimeri	Polimeri ramificati	Drug delivery
Fullereni	Carriers a base di carbonio	Fotodinamica
		Drug delivery
Carriers polimerici	Acido polilattico	Drug/Gene delivery
	Policianoacrilati	
	Polietilenimine	
	Copolimeri	
Ferrofluidi	Policaprolattone	Imaging (MRI)
	SPIONS	
	USPIONS	
Quantum dots	Cd/Zn-selenidi	Imaging
		Diagnostica in vitro
Vari	NP a base silicata	Gene delivery
	Miscele di materiali precedenti	

Tabella 1 . Rassegna di alcuni materiali utilizzabili per la sintesi delle NP e loro applicazioni.

Le NP per la terapia contro il cancro possono essere preparate a partire da diversi materiali inorganici. Ad esempio, NP a base di ossido di ferro (Fe_2O_3) sono state utilizzate per il trasporto di farmaci chemioterapici e valutati su modelli di carcinoma della mammella e della prostata (Jain TK et al, 2005). NP a base di precipitati di calcio fosfato, già correntemente utilizzati nella preparazione di vaccini, possiedono buone potenzialità per future applicazioni nell'uomo come potenti adiuvanti per il targeting di chemioterapici (He Q et al, 2000). I quantum dots, nanocristalli colloidali semiconduttori (Zhang Y et al, 2007) sono utilizzati nel campo dell'imaging e della diagnostica *in vivo* grazie alla loro la loro fluorescenza, ma i

materiali utilizzati per la loro preparazione, come i composti del cadmio e del selenio, rilasciano ioni che possono alterare la funzione delle pompe cellulari, risultando citotossici (Kirchner C et al, 2005).

I polimeri sintetici possiedono proprietà molto vantaggiose come la biocompatibilità, la biodegradabilità e la possibilità di effettuare modificazioni e funzionalizzazioni superficiali (Rawat M et al, 2006). Questo permette il controllo del comportamento farmaco-cinetico del farmaco che viene legato alle NP. Per questo motivo i polimeri sono tra le sostanze più utilizzate per il *drug delivery*. Rispetto ai polimeri naturali che, in generale, assicurano la protezione del farmaco dalla degradazione per breve tempo, i polimeri sintetici presentano il vantaggio di garantire il rilascio del farmaco incapsulato dopo un periodo di tempo variabile da pochi giorni a diverse settimane. Ad esempio, il poli- ϵ -caprolattone (PCL), un polimero insolubile biocompatibile, è stato utilizzato per la sintesi di NP PEG-ilate per il trasporto di farmaci anti-infiammatori non steroidei o di chemioterapici (Park EK et al, 2005). NP a base di PCL, modificate mediante l'aggiunta ossido di polietilene (PEO), polimero idrofilico, sono capaci di legare molecole idrofobiche come il tamoxifene e sono state testate con successo su modelli murini di carcinoma della mammella (Shenoy DB et al, 2005).

I polimeri ottenuti dal acido polilattico (PLA) e dall'acido poliglicolico (PGA), ed in particolare il copolimero acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), sono sicuramente tra i più utilizzati per la preparazione di NP applicate al *drug delivery* (Panyam J et al, 2003). Variando le caratteristiche delle NP ottenute da questi polimeri, come il peso molecolare, il rapporto tra i polimeri costituenti, il tipo di legame con il farmaco, la dimensione, la porosità e le condizioni di sintesi, è

possibile creare sistemi per il *drug delivery* con varie proprietà e varie cinetiche di degradazione. Questi polimeri possiedono degli ottimi livelli di biocompatibilità e biodegradabilità, e sono stati pertanto approvati per uso umano dalla Food and Drug Administration. All'interno dell'organismo, il legame estere presente in tali polimeri molecole è soggetto ad idrolisi. I prodotti della reazione, gli acidi lattico e glicolico, risultano atossici e vengono eliminati attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici sotto forma di biossido di carbonio ed acqua (Jain RA, 2000; Panyam J et al, 2003). La velocità di formazione dei prodotti di degradazione è inoltre molto ridotta, e non interferisce con le normali funzioni cellulari (Shive MS et al, 1997). La sicurezza di questi polimeri è stata ampiamente dimostrata in studi *in vivo* e sono già correntemente utilizzati per dispositivi medici quali suture riassorbibili, impianti ossei e contraccettivi, e scaffolds per ingegneria tissutale (Langer R, 1995; Matsusue Y et al, 1995). La somministrazione endovenosa *in vivo* di NP a base di tali polimeri ha permesso di dimostrare la biocompatibilità a lungo termine di questi dispositivi (Guzman LA et al, 1996). Le applicazioni delle NP costituite da PLGA e PLA sono molteplici, come il trasporto di estrogeni (Hariharan S et al, 2006), il rilascio di farmaci attraverso la barriera emato-encefalica (Costantino L et al, 2005), il targeting delle cellule dendritiche (Elamanchili P et al, 2004). Molti studi hanno dimostrato la loro efficacia nell'aumentare gli effetti terapeutici di agenti chemioterapici. Le NP sono state utilizzate nel trasporto del desametasone (Panyam J et al, 2004), ed ottimi risultati si sono avuti nel trasporto di vari chemioterapici. NP sono state utilizzate, ad esempio, per il trasporto del paclitaxel, un farmaco insolubile che richiede l'utilizzo di un adiuvante chiamato

‘Cremophor EL’, responsabile di seri effetti collaterali (Dorr RT, 1994; Koziara JM et al, 2006), del 5-fluorouracile (Bhadra D et al, 2003), e della DXR. Il PLGA è stato ampiamente utilizzato per la preparazione di NP grazie al suo periodo di degradazione facilmente controllabile (da 1 a 6 mesi), e si presta molto bene ad applicazioni per il rilascio controllato di farmaci. Il PLA, al contrario, ha un periodo di degradazione poco flessibile, circa 12 mesi, per cui è utilizzato preferibilmente per applicazioni che richiedono stabilità nel tempo (Choi SW et al, 2007).

E’ stato dimostrato che il legame della DXR alle NP a base di PLGA ha notevolmente migliorato l’uptake del farmaco da parte di cellule di epatocarcinoma umano. Prove *in vivo* hanno dimostrato che una singola somministrazione di DXR attraverso NP a base di PLGA aveva un effetto paragonabile a quello del farmaco libero quando somministrato giornalmente (Yoo HS et al, 2000). Questi studi, che fino ad ora hanno fornito risultati molto promettenti, dimostrano che NP biodegradabili a base di PLGA rappresentano un ottimo strumento per il trasporto di farmaci contro il cancro.

Bone targeting

La concentrazione di sostanze terapeutiche nel sito della lesione osteolitica attraverso strategie di *bone targeting* presenta due grandi vantaggi: primo, si può potenziare l’efficacia terapeutica dei farmaci correntemente utilizzati nel trattamento delle malattie ossee, riducendo a parità di dose gli effetti collaterali; secondo, molecole poco utilizzate in terapia a causa dei gravi effetti collaterali potranno essere considerate per una possibile applicazione. Risultati promettenti nel campo del *bone targeting* sono stati ottenuti

mediante l'impianto locale di biomateriali riassorbibili coniugati a farmaci (Wang D et al, 2005).

Per ottenere tuttavia un sistema iniettabile in grado di raggiungere rapidamente il tessuto osseo si deve tenere conto di alcuni problemi. L'accesso di sostanze esogene alla superficie dell'osso è innanzi tutto limitato dalla presenza di una 'barriera cellulare midollo-sangue'. Inoltre, fatta eccezione per i denti e le calcificazioni patologiche, nessun altro tessuto presenta una concentrazione di sostanza minerale così elevata. La matrice extracellulare ossea è composta infatti da una componente inorganica a base di calcio-idrossiapatite, in cui è dispersa la componente organica, costituita in prevalenza da collagene di tipo I (Xu S et al, 2006). In un tessuto di questo tipo, la disponibilità di molecole potenzialmente sfruttabili come target di sistemi per il *drug delivery* (come enzimi, recettori, antigeni) è molto scarsa. Data la sua enorme abbondanza nella matrice inorganica dell'osso, la soluzione più logica a questo problema è la sintesi di sistemi capaci di legare l'idrossiapatite ossea (HA), grazie alla presenza di molecole 'osteotropiche'. Tra le poche molecole che possiedono un'elevata affinità per l'HA vi sono i metalli pesanti ed i bisfosfonati (BP). Questi ultimi sono già ampiamente utilizzati per la terapia medica dell'osteoporosi, ma questa loro caratteristica affinità per il tessuto osseo li rende particolarmente idonei all'utilizzo nel *bone targeting* (Stepensky D, 2003).

Bisfosfonati

È stato dimostrato *in vivo* che, in seguito a somministrazione orale o sistemica, i BP vengono rapidamente trasportati dal sangue alla superficie dell'osso, e si localizzano nei siti interessati da intensa

attività di riassorbimento osteoclastico (Barrett J et al, 2006; Masarachia P et al, 1996). Per questo motivo vengono utilizzati nella *bone targeting*, allo scopo di veicolare agenti terapeutici nelle aree osteolitiche.

I BP sono analoghi sintetici non idrolizzabili del pirofosfato (Fig. 5), una molecola molto abbondante nel siero e nelle urine, capace di prevenire la calcificazione dei tessuti molli legandosi ai cristalli di HA di nuova formazione (Fleisch H et al, 1966). I BP sono composti dotati di una potente attività antiosteolitica: il primo di essi ad essere utilizzato nell'uomo fu l'etidronato, nella terapia contro la malattia di Paget (Von Baeyer H et al, 1897).

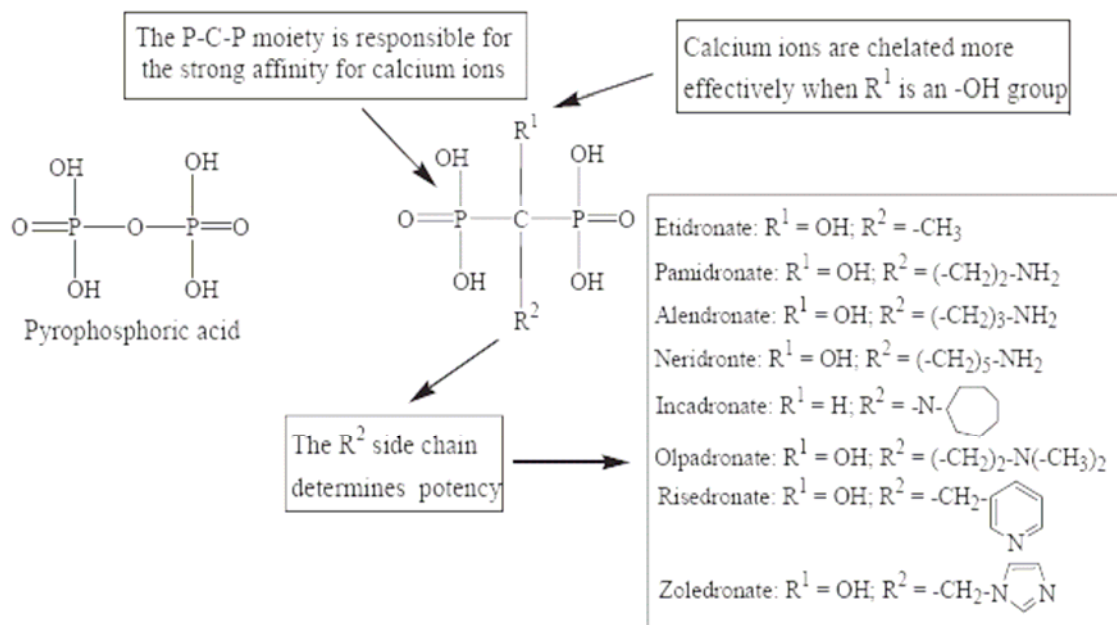


Figura 5. Struttura del pirofosfato e di alcuni tra i più comuni BP. La presenza di un gruppo OH in R¹ determina un'elevata affinità per l'osso. La catena R² determina invece il potere farmacologico.

Attualmente, i BP vengono utilizzati nella prevenzione dell'eccessiva calcificazione ossea, nell'osteoporosi e nel trattamento delle metastasi ossee (Russell RG, 2006). E' stato inoltre dimostrato *in vitro*, *in vivo* e da dati clinici che i BP, in particolare l'acido

zoledronico, sono capaci di ridurre le dimensioni delle metastasi attraverso l'inibizione dell'adesione, della proliferazione, dell'invasione delle cellule tumorali (Cleazardin P et al, 2005; Hashimoto K et al, 2005), e dell'angiogenesi (Giraud E et al, 2004; Gittens SA et al, 2005).

Da un punto di vista chimico, la forte affinità per l'HA ossea è dovuta alla presenza del legame P-C-P. Le proprietà farmacologiche dipendono invece dalla struttura delle due catene laterali (Fleisch HA, 1997). La catena R¹ determina l'affinità per la calcio-HA, e la presenza in questa posizione di un gruppo ossidrilico OH aumenta ulteriormente l'affinità per il calcio mediante l'instaurazione di un legame trivalente (Ebrahimpour A et al, 1995). Le differenze nell'affinità di legame all'osso possono influenzare molte importanti proprietà biologiche dei BP, come l'uptake e la ritenzione nello scheletro, la diffusione ed il rilascio del farmaco che trasportano, e gli effetti sulle funzioni cellulari all'interno del microambiente osseo (Nancollas GH et al, 2005). La catena R² è invece responsabile dell'effetto antiosteolitico. La presenza di un atomo di azoto primario in questa catena rende l'azione antiosteolitica da 10 a 100 volte più potente (Russell RG, 2006). In base alla catena laterale R² è possibile classificare i BP dal più potente al più debole, secondo l'attività antiosteolitica: zoledronato > alendronato > ibandronate = risedronato > etidronato. Infine, è stato dimostrato che l'idrofobicità dei BP influenza la capacità di *bone targeting* (Hirabayashi H et al, 2001).

I BP esercitano la loro attività antiosteolitica attraverso due meccanismi differenti. I non-amino BP vengono incorporati come analoghi non idrolizzabili dell'adenosin trifosfato (ATP). L'accumulo intracellulare di metaboliti non idrolizzabili come analoghi dell'ATP

ha degli effetti negativi sul metabolismo, sulla funzionalità e sulla sopravvivenza degli osteoclasti (Russell RG, 2006). Diversamente, gli amino-BP come l'alendronato (ALE), che contengono un atomo di azoto basico primario nella catena alchilica, sono molto più potenti dei BP che non contengono azoto. Essi esercitano la loro azione antiosteolitica attraverso l'inibizione del pathway del mevalonato, critico per la produzione del colesterolo, di altri steroli e dei lipidi isoprenoidi, come il farnesildifosfato (FPP) ed il geranilgeranildifosfato (GGPP). FPP e GGPP sono richiesti per la prenilazione post-traduzionale delle 'small GTPases' (Luckman SP et al, 1998; Rogers MJ et al, 2000). Le 'small GTPases' (come Ras, Rho e Rac), regolano alcuni aspetti chiave della funzionalità degli osteoclasti, come la morfologia, l'organizzazione del citoscheletro, la formazione dell'orletto a spazzola, il traffico vescicolare e la sopravvivenza (Ridley AJ et al, 1992).

La sintesi di un coniugato tra un polimero biocompatibile, come il PLGA, ed una molecola della famiglia dei BP rappresenta un sistema intelligente per il rilascio controllato di molecole farmacologicamente attive nell'osso.

Applicazioni dei bisfosfonati nel bone targeting

Le applicazioni dei BP che riguardano il targeting del tessuto osseo sono molteplici. Ad esempio, la capacità dei BP di chelare isotopi radioattivi, come il ^{99m}Tc e il ^{186}Re , senza perdere la loro affinità per l'HA, li ha resi molto utili nella scintigrafia ossea per la diagnosi di patologie. Infatti, il normale uptake di BP radiomarcanti da parte del tessuto osseo mostra tipicamente le aree di turnover osseo, mentre un uptake localizzato e molto elevato indica la presenza di eccessivo rimodellamento osseo, tipico delle

localizzazioni neoplastiche primarie e/o secondarie (Wang K et al, 2005).

I BP sono già molto utilizzati per il trasporto controllato di molecole nel tessuto osseo, inclusi agenti antibatterici ed antiosteoporotici. I BP sono stati coniugati, con buoni risultati *in vitro* ed *in vivo*, a NP a base di albumina per il trasporto nell'osso di sostanze antinfiammatorie (Markovsky E et al, 2007), e per facilitare il trasporto del chemioterapico insolubile paclitaxel evitando così l'utilizzo di solventi che risultano dannosi (Stinchcombe TE, 2007). I BP vengono inoltre utilizzati nel trasporto di agenti antibatterici, come la ciprofloxacina, strategia che si rivela molto utile per via della difficoltà nel trattamento della colonizzazione batterica a livello del tessuto osseo, e di estrogeni per il trattamento dell'osteoporosi associata alla menopausa. Negli ultimi anni si è verificata una crescita del numero degli studi preclinici per la valutazione dell'efficacia dei BP nel bone targeting di agenti antineoplastici, come il 5-fluorouracile (El-Mabhouh A et al, 2004; Zhang S et al, 2007). NP a base di PLGA ed ALE sono già state testate per valutare l'efficienza di legame con l'HA, dimostrando ottime capacità di bone targeting (Choi SW et al, 2007).

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Questo studio è finalizzato all'applicazione delle recenti conoscenze ottenute dalla nanomedicina alla terapia contro le metastasi osteolitiche, che rappresentano una frequente e grave complicazione del cancro. Dati i limiti che rendono parzialmente inefficaci i trattamenti convenzionali, come la mancanza di targeting dei farmaci antineoplastici e gli elevati effetti collaterali ad essi associati, una strategia innovativa è strettamente necessaria.

Le NP oggetto di questo studio, formulate per essere somministrate per via endovenosa, sono state sintetizzate a partire da un coniugato a base di PLGA ed ALE. Il PLGA, biodegradabile e biocompatibile, è stato coniugato con l'alendronato di sodio che, come tutte le molecole appartenenti alla classe dei bisfosfonati, possiede un'elevata affinità per l'HA della matrice minerale ossea. L'ALE appartiene al gruppo degli amino-BP, che presentano due grossi vantaggi. Innanzitutto, essi esercitano un'azione antiosteolitica molto più potente rispetto ai BP privi di azoto. Inoltre, la presenza del gruppo amminico reattivo primario rende possibile la formazione di un legame ammidico con il PLGA. La formazione di un legame forte, piuttosto che di un legame estere, tra il polimero e la sostanza 'bone-seeking' conferisce al coniugato resistenza all'idrolisi enzimatica nel plasma, permettendogli di raggiungere il tessuto osseo senza essere soggetto a degradazione. Successivamente, la DXR è stata incapsulata nelle NP ottenute dal coniugato, per ottenere un costrutto finale con attività antineoplastica. La scelta della DXR è stata guidata, oltre che dalla sua elevata azione antitumorale limitata dai gravi effetti collaterali,

anche dalla sua naturale fluorescenza rossa che semplifica l'analisi del suo pattern di distribuzione cellulare *in vitro*.

Obiettivo globale dello studio è stato sintetizzare e caratterizzare le NP costituite dal coniugato PLGA-ALE e contenenti la DXR. Il coniugato e le NP successivamente ottenute sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico. Per escludere eventuali effetti tossici su componenti biologici come sangue e cellule, la emo- e citocompatibilità del sistema sono state valutate *in vitro*. Gli effetti antiosteolitici delle NP sono stati valutati *in vitro* su colture primarie di osteoclasti umani. L'attività antineoplastica della DXR incapsulata alle NP è stata invece valutata *in vitro* su modelli cellulari umani di tumori primitivi dell'osso, come l'osteosarcoma, di tumori primitivi che frequentemente metastatizzano all'osso, come il carcinoma della mammella e del rene, e di metastasi ossee, come una linea derivata da metastasi midollari di neuroblastoma. L'attività *in vivo* è stata infine valutata su un modello murino di metastasi osteolitiche di carcinoma della mammella, uno dei tumori che più di frequente sviluppano metastasi a livello del tessuto osseo.

MATERIALI E METODI

Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità del coniugato tra acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) ed alendronato

Il coniugato tra il polimero biocompatibile PLGA e l'ALE è stato sintetizzato e caratterizzato. Prima di procedere alla preparazione delle NP a base del coniugato PLGA-ALE, sono stati effettuati dei saggi di biocompatibilità.

Sintesi del coniugato

La sintesi del coniugato solubile è stata condotta presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Catania (Pignatello R et al, 2009). In breve, l'ALE (0,25 mmol) è stato dissolto in acido acetico 10%, congelato e liofilizzato. I gruppi carbossilici terminali del PLGA (Resomer 502 H, Boehringer Ingelheim) sono stati attivati dissolvendo 0,25 mmol di polimero in una miscela 1:1 di dimetilsolfossido (DMSO) e 3-diclorometano (DCM). Successivamente sono stati aggiunti 0,25 mmol di 1-idrossibenzotriazolo (HOBt), 0,37 mmol di NO-(3-dimetilaminopropil)-N-etil carbodiimide idrocloruro (EDAC) e 0,37 mmol di trietilamina. La soluzione è stata mantenuta a 0°C per 2 ore in agitazione. L'ALE, precedentemente liofilizzato, è stato ricostituito in 1 ml di DMSO ed aggiunto alla miscela di reazione, poi mantenuta a 2°C per 2 ore in agitazione, e successivamente a temperatura ambiente (RT) per circa 8 ore. L'andamento della reazione è stato monitorato mediante cromatografia su strato sottile (TLC). Il solvente è stato parzialmente rimosso sotto vuoto e la soluzione rimanente è stata purificata per dialisi in H₂O per 48 ore (CelluSep

H1 MWCO 2000, M-Medical). In seguito, il coniugato PLGA-ALE è stato congelato in azoto liquido e poi liofilizzato.

Analisi spettroscopica

La caratterizzazione del coniugato è stata effettuata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e MALDI-TOF.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati acquisiti mediante lo strumento Varian Uniti INOVA operante a 500 MHz, utilizzando come standard il tetrametil silano come standard interno e il DMSO come solvente.

L'analisi MALDI-TOF è stata condotta presso il CNR di Padova, utilizzando lo strumento Ultraflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), dotato di un laser UV a 337 nm. I 'chemical shifts' sono riportati in ppm.

Saggi di emocompatibilità

Tutti gli esperimenti di emocompatibilità sono stati eseguiti utilizzando sangue periferico da donatori sani. In tutti i saggi biologici eseguiti, il coniugato e le altre soluzioni utilizzate sono state sterilizzate per filtrazione attraverso filtri sterili con pori del diametro di 0,22 μm (Whatman Inc., Florham Park, NJ, USA).

Test di emolisi

L'emolisi è stata valutata sul sangue addizionato di eparinato di litio (119 UI). Gli eritrociti, isolati entro 2 ore dal prelievo, sono stati lavati e risospesi in phosphate buffered saline (PBS) ad una diluizione di 1:10 w/v. Il PLGA-ALE è stato dissolto in DMSO, con una concentrazione finale di 52,45 mg/ml. Da questa soluzione sono state preparate delle diluizioni scalari in PBS, in modo da ottenere concentrazioni finali di ALE da 100 μM a 10 nM. Il DMSO puro alle

stesse diluizioni è stato utilizzato come controllo. Le diluizioni scalari di PLGA-ALE e DMSO sono state aggiunte alla sospensione di eritrociti. La saponina (Sigma, 25 mg/ml in PBS) è stata utilizzata come controllo positivo. Dopo un'incubazione di 4 ore a 37°C, i campioni sono stati centrifugati a 1000 rpm per 15 minuti per rimuovere gli eritrociti non lisati. Il rilascio di emoglobina nel sovrantante è stato valutato mediante lettura spettrofotometrica a 540 nm. I campioni sono stati testati in triplicato. Per ottenere 0 e 100% di emolisi, sono stati aggiunti alla sospensione di eritrociti rispettivamente PBS ed acqua distillata. Il grado di emolisi è stato calcolato mediante la seguente equazione: $(\%) = (Abs - Abs_0) / (Abs_{100} - Abs_0) \times 100$, dove Abs, Abs₀ e Abs₁₀₀ rappresentano rispettivamente l'assorbanza dei campioni, della soluzione allo 0% di emolisi e della soluzione al 100% di emolisi.

Valutazione degli effetti sulla fase plasmatica della coagulazione

Il sangue periferico dei donatori sani è stato raccolto in tubi di silicone contenenti 1 parte di sodio citrato al 3,8% per 9 parti di sangue. Il plasma ricco di piastrine (PRP) è stato ottenuto mediante centrifugazione a 1000 rpm per 5 minuti. Sono state preparate diluizioni scalari di PLGA-ALE e DMSO. Ogni diluizione (0,1 ml) è stata addizionata a 0,9 ml di PRP in provette siliconate. Il controllo negativo è stato ottenuto aggiungendo 0,1 ml di PBS a 0,9 ml di PRP. I tubi sono stati mantenuti in blanda agitazione per 30 minuti a RT, e dopo centrifugati a 3000 rpm per 15 minuti. Per valutare l'attività protrombinica (PT) ed il tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) sono stati utilizzati reagenti commerciali (PT-Fibrinogen HS, Hemosil, IL, per il PT, e APTT-SP liquid, Hemosil, IL, per l'APTT), e lo strumento ACL 300 (Instrumentation Laboratory). Il

PT dei campioni è stato estrapolato da una curva di calibrazione ottenuta con diluizioni scalari di un plasma calibrante commerciale (Calibration Plasma, Hemosil).

Saggi di citocompatibilità

Colture di cellule endoteliali

Le cellule endoteliali umane da vena ombelicale (HUVEC) sono state ottenute mediante il metodo di Jaffe EA et al (1973). Le cellule sono state coltivate fino alla confluenza in un terreno composto da un'uguale quantità di medium RPMI 1640 (Sigma) e medium 199 (Sigma) addizionato con 20% di siero bovino fetale (FBS), ed i seguenti reagenti: Endothelial Cell Growth Supplement (25 µg/ml) (BD Biosciences), L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/ml, streptomicina 100 mg/ml. Le colture sono state mantenute a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Le cellule sono state coltivate in fiasche rivestite da collagene di tipo I (Biocoat, BD Biosciences). Durante gli esperimenti le cellule sono state seminate in fiasche di polistirene per colture cellulari rivestite da gelatina bovina allo 0,2% (Sigma).

Isolamento e coltura di osteoblasti trabecolari

Il protocollo per la raccolta di campioni ossei è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli ed eseguito in osservanza dei principi enunciati nella Dichiarazione di Helsinki del 1975 rivista nel 1996. I campioni sono stati ottenuti, dopo consenso informato, da pazienti sottoposti ad impianto primario di artroprotesi d'anca per osteoartrosi. Il materiale di scarto della fresatura del canale femorale durante la preparazione all'impianto dello stelo protesico è stato trattato secondo il metodo di

Di Silvio L et al (2001) per isolare gli osteoblasti primari umani (HOB). Questi sono stati coltivati in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) al 10% FBS addizionato di L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/ml, e streptomina 100 mg/ml. Il fenotipo osteoblastico è stato dimostrato mediante colorazione citochimica per la fosfatasi alcalina (ALP) (Sigma). Per gli esperimenti sono state utilizzate le colture che presentavano almeno il 60% di cellule ALP-positive.

Test del rosso neutro

La citotossicità del PLGA-ALE sulle HUVEC e sugli HOB trabecolari è stata valutata mediante il test del rosso neutro. La soluzione stock allo 0,4% in acqua distillata del colorante rosso neutro testato per colture cellulari (Colour Index 50040) è stata preparata e conservata a 4°C. La soluzione di lavoro (50 µg/ml) è stata preparata al momento dell'uso diluendo la soluzione stock in terreno completo. Le cellule sono state risospese in terreno completo e seminate alla densità di 3×10^4 cellule/pozzetto in pozzetti di micropiastre in polistirene trattate per colture cellulari, ed incubate a 37°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate in PBS ed incubate con 0,2 ml di soluzioni di PLGA-ALE o DMSO a concentrazioni scalari preparate al momento dell'uso. Il terreno completo è stato utilizzato come controllo negativo, ed una soluzione di fenolo allo 0,64% (Sigma), preparata in terreno completo al momento dell'uso, è stata utilizzata come controllo positivo. Le colture sono state incubate a 37°C per 24 ore. Successivamente, dopo aver eliminato il sovrnatante, le cellule sono state lavate con PBS e lisate con 0,1 ml di soluzione lisante (etanolo al 50% in acido acetico all'1%). L'intensità della colorazione

di ciascun pozzetto è stata misurata come densità ottica a 540 nm. La vitalità cellulare è stata calcolata come percentuale rispetto al controllo negativo. Una vitalità cellulare inferiore all'80% è stata considerata come indice di tossicità del campione testato.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il software StatView™ 5.0.1 per Windows. I risultati sono espressi come media aritmetica \pm errore standard della media (media \pm SEM). Il confronto tra i gruppi di dati è stato effettuato mediante il test di Kruskal-Wallis, mentre il confronto tra i dati appaiati è stato eseguito mediante il test di Mann Whitney. I dati sono stati considerati significativi quando presentavano un $p < 0,05$.

Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità di nanoparticelle per il bone targeting

Il coniugato osteotropico PLGA-ALE è stato utilizzato per la preparazione di NP adatte al trasporto controllato della DXR nel tessuto osseo. Una particolare attenzione è stata rivolta alla selezione delle condizioni di sintesi, per evitare che il dispositivo finale presentasse effetti tossici residui. Il sistema così ottenuto è stato caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico.

Preparazione delle nanoparticelle

Le NP a base di PLGA-ALE o PLGA puro sono state preparate secondo il metodo di nanoprecipitazione (Tosi G et al, 2005; Yoo HS et al, 1999), mediante la tecnica di evaporazione emulsione/solvente. In breve, 100 mg di PLGA o PLGA-ALE sono

stati disciolti in 10 ml di acetone o miscela acetone/DMSO (1:1, v/v). La fase organica è stata aggiunta goccia a goccia in 25 ml di PBS a pH=7,4 contenente 100 mg di Pluronic F68. La sospensione è stata mantenuta in agitazione a RT per 10 minuti. L'acetone è stato rimosso a 30°C in condizioni di bassa pressione e la soluzione è stata purificata mediante dialisi in acqua (CelluSep H1 MWCO 2000; M-Medical). Le NP sono state risospese in PBS alla concentrazione di 10 mg/ml.

Calcolo della dimensione media e del potenziale ζ

La dimensione media e le cariche nette di superficie (potenziale ζ) delle NP sono state misurate tramite prove di Dynamic Light-Scattering, utilizzando rispettivamente la spettroscopia a correlazione di fotoni (PCS) e l'analisi della mobilità elettroforetica e della distribuzione del potenziale, mediante un analizzatore Zetamaster (Malvern Instruments Ltd) equipaggiato con il software Malvern PCS. Le sospensioni sono state opportunamente diluite prima dell'analisi con acqua per iniezione, e la lettura è stata eseguita ad un'angolo di 90°. Il diametro medio e l'indice di polidispersione (PI) sono stati determinati e riportati come media di trenta misurazioni. La mobilità elettroforetica è stata ottenuta con un laser Doppler anemometro (LDA) contenuto nello stesso strumento. 80 μ l di ciascun campione sono stati diluiti in 20 ml di acqua di lavaggio per HPLC ed iniettati nella cella elettroforetica dello strumento. Il potenziale ζ è stato calcolato del software dello strumento mediante l'equazione di Smoluchowski.

Analisi morfologica

La morfologia delle NP è stata osservata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Le NP a base di PLGA-ALE sono state montate su un supporto mediante un film bioadesivo a base di carbone, coperte con un film di oro-palladio dello spessore di 20 nm, ed osservate a 15 kV con un microscopio elettronico a scansione (Philips SEM 515).

Saggi di emocompatibilità

L'uso di NP per il *drug delivery* richiede un'accurata analisi della biocompatibilità. La loro piccola dimensione, infatti, può ridurre la biocompatibilità del materiale di partenza a causa dell'elevato rapporto superficie/volume e la presenza di gruppi reattivi superficiali. Per evitare la formazione di trombi, le NP formulate per somministrazione endovenosa non dovrebbero attivare le piastrine né la fase plasmatica della coagulazione. D'altra parte, le NP non dovrebbero ridurre i livelli dei fattori di coagulazione causando fenomeni emorragici. Inoltre, eventuali effetti tossici sugli eritrociti potrebbero causare emolisi. Infine, l'attivazione del complemento, favorita dal fenomeno di opsonizzazione nel plasma, potrebbe comportare emolisi ed infiammazione.

Test di emolisi

Il test di emolisi *in vitro* è stato condotto come descritto in precedenza. Le NP PLGA-ALE sono state aggiunte alla sospensione degli eritrociti alle concentrazioni finali di 56 µg/ml, 5,6 µg/ml, 0,56 µg/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml.

Effetti delle NP sul numero dei leucociti

Il sangue periferico di donatori sani è stato raccolto in tubi di silicone contenenti 119 UI di eparinato di litio. Le NP PLGA-ALE sono state aggiunte ai campioni alle concentrazioni finali di 56 µg/ml, 5,6 µg/ml, 0,56 µg/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml. Il PBS è stato utilizzato come controllo negativo. I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti, ed il conteggio totale dei leucociti (WBC) è stato effettuato in camera di Burker. Per determinare la percentuale di ogni popolazione leucocitaria è stato effettuato uno striscio, sottoposto poi a colorazione May-Grunwald-Giemsa e conteggio al microscopio ottico.

Effetti delle NP sulle piastrine

Il PRP è stato preparato secondo il metodo descritto in precedenza. Le NP a base di PLGA-ALE sono state aggiunte al PRP alle concentrazioni finali di 56 µg/ml, 5,6 µg/ml, 0,56 µg/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml. I campioni sono stati mantenuti in blanda agitazione per 30 minuti a RT.

Conteggio piastrinico

Dopo 30 minuti di contatto con le NP, il PRP è stato diluito 1/100 in ossalato di ammonio per la lisi dei globuli rossi (Unopette®, Becton Dickinson), ed il numero di piastrine è stato determinato al microscopio in camera di Burker.

Dosaggio del fattore piastrinico 4

Dopo 30 minuti di contatto con le NP, il PRP è stato addizionato con un inibitore dell'attività piastrinica (una parte per 9 parti di PRP,

costituito da EDTA 2,5%, procaina/HCl 7%, 2-cloroadenosina 0,025%). Dopo incubazione a 4°C per 15 minuti, i campioni sono stati centrifugati per 45 minuti a 2000 g per ottenere il plasma povero di piastrine (PPP). Il fattore piastrinico 4 (PF4) è stato determinato sul PPP mediante dosaggio immunoenzimatico (Asserachrom PF4[®], Stago).

Valutazione degli effetti sulla fase plasmatica di coagulazione

Il PRP è stato centrifugato a 3000 rpm per 15 minuti per raccogliere le piastrine e le NP. Il PT e l'APTT sono stati determinati nel sovranatante secondo il metodo descritto in precedenza.

Valutazione del consumo del complemento per via classica

Prima dell'analisi degli effetti delle NP sul consumo di complemento, è stata valutata la minima dose emolitica (MHD) di un siero di coniglio anti-pecora in una sospensione di eritrociti di pecora (Sclavo). L'ultima diluizione di siero anti-pecora capace di indurre emolisi completa della sospensione di eritrociti è stata considerata come 1 MHD. Gli eritrociti di pecora anticorpo-sensibilizzati sono stati preparati mediante incubazione con un siero emolitico di coniglio anti-pecora contenente 4 MHD. Il campione di siero umano è stato incubato con le NP PLGA-ALE alle concentrazioni finali di 56 µg/ml, 5,6 µg/ml, 0,56 µg/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml. Il PBS è stato utilizzato come controllo negativo, mentre come controllo positivo è stato utilizzato lo zymosan (Sigma) alla concentrazione di 2,5 mg/ml. Le condizioni basali consistevano in un campione di siero incubato senza additivi. Dopo incubazione di 1 ora a 37°C, quantità seriali di sovrinatante sono state addizionate con gli eritrociti anticorpo-sensibilizzati. Dopo una seconda incubazione,

l'emoglobina rilasciata nel sovrinatante in seguito all'eventuale emolisi dovuta all'attivazione del complemento è stata misurata a 405 nm. La percentuale di consumo di complemento è stata calcolata secondo il metodo di Salvador-Morales C et al (2006).

Valutazione del consumo di complemento per via alternativa

Gli eritrociti di coniglio (Sclavo) sono stati risospesi in tampone Mg-EGTA (10 mM EGTA (acido etilene glicol bis (2-amino etil etere)-N,N,N,N'- tetraacetico), 7 mM MgCl₂, 2,1 mM sodio barbitale, 59 mM NaCl, glucosio 2,08%, gelatina 0,08%, pH=7.4). Il siero umano, diluito in buffer Mg-EGTA, è stato incubato con le NP PLGA-ALE alle concentrazioni finali di 56 µg/ml, 5,6 µg/ml, 0,56 µg/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml. Il PBS è stato utilizzato come controllo negativo, mentre come controllo positivo è stato utilizzato lo zymosan (Sigma) alla concentrazione di 2,5 mg/ml. Le condizioni basali venivano valutate su un campione di siero incubato senza additivi. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C, quantità seriali di sovrinatante sono state addizionate alla sospensione di eritrociti di coniglio. Dopo una seconda incubazione, l'assorbanza nel sovrinatante è stata misurata a 540 nm. Il consumo di complemento è stato calcolato secondo il metodo di Salvador-Morales C et al (2006).

Valutazione del frammento Bb del Fattore B della via alternativa

Il sangue periferico di donatori sani è stato raccolto in tubi di silicone contenenti 119 UI di eparinato di litio. Le NP PLGA-ALE sono state aggiunte ai campioni alle concentrazioni finali di 56 µg/ml, 5,6 µg/ml, 0,56 µg/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml. Il PBS è stato utilizzato come controllo negativo. I campioni sono stati incubati per 30 minuti

a 37°C, successivamente addizionati con EDTA disodico 5 mM, e centrifugati a 4°C a 2000 g per 15 minuti. Il frammento Bb è stato determinato mediante dosaggio immunoenzimatico (Bb Fragment Enzyme Immunoassay, Quidel).

Saggi di citocompatibilità

L'obiettivo delle NP per il *bone targeting* è giungere nel tessuto osseo attraverso il circolo vascolare e rilasciare il farmaco ad esse coniugato senza danneggiare le cellule endoteliali né la funzionalità degli osteoblasti. E' stata quindi effettuata un'analisi *in vitro* per escludere eventuali effetti sulla vitalità cellulare.

Test del rosso neutro sulle cellule endoteliali

Le cellule endoteliali umane sono state isolate e coltivate come descritto in precedenza. Per valutare la citotossicità delle NP PLGA-ALE è stato eseguito il test del rosso neutro secondo la metodica precedentemente descritta. Le cellule sono state seminate in terreno completo in alla densità di 3×10^4 cellule/pozzetto in pozzetti da di micropiastre in polistirene trattate per colture cellulari. Dopo 24 ore, sono state aggiunte al terreno di coltura, in triplicato, diluizioni seriali di NP alle concentrazioni finali di 56 µg/ml, 5,6 µg/ml, 0,56 µg/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml. Il PBS diluito in terreno completo è stato considerato come controllo negativo, mentre come controllo positivo è stata utilizzata una soluzione di fenolo allo 0,64% in terreno completo .

Isolamento e coltura di cellule stromali midollari

I prelievi di midollo osseo sono stati ottenuti dal canale femorale di pazienti sani sottoposti ad artroprotesi d'anca dopo consenso

informato. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale sulla sperimentazione umana ed eseguito in osservanza dei principi enunciati nella Dichiarazione di Helsinki del 1975 rivista nel 1996. Le cellule stromali midollari (MSC) sono state separate mediante centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hystopaque, Sigma). Le MSC sono state seminate alla densità di 250000 cellule/cm² in α -Modification of Eagle's Medium (α -MEM, Sigma) al 10% FBS addizionato con i seguenti reagenti: L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/ml, streptomina 100 mg/ml, acido ascorbico 100 μ g/ml (Sigma). Dopo 4 giorni, il terreno di coltura è stato addizionato con desametasone 10⁻⁸ M. Il differenziamento in senso osteoblastico delle cellule utilizzate per gli esperimenti è stato dimostrato mediante la valutazione di markers biochimici e molecolari descritti in letteratura (Ciapetti G et al, 2006).

Test del rosso neutro sulle cellule stromali midollari

Per valutare la citotossicità delle NP PLGA-ALE sulle MSC è stato eseguito il test del rosso neutro secondo la metodica precedentemente descritta. Diluizioni seriali di NP alle concentrazioni finali di 56 μ g/ml, 5,6 μ g/ml, 0,56 μ g/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml sono state aggiunte alle colture. Il PBS diluito in terreno completo è stato considerato come controllo negativo.

Attività della fosfatasi alcalina

Le MSC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 5 x 10⁴ cellule/pozzetto in terreno completo addizionato con desametasone 10⁻⁸ M. Dopo 24 ore, le MSC sono state trattate con le NP PLGA-ALE diluite in terreno completo alle concentrazioni finali di 56 μ g/ml, 5,6 μ g/ml, 0,56 μ g/ml, 56 ng/ml, 5,6 ng/ml, 0,56 ng/ml. Il

PBS ed il terreno completo sono stati utilizzati come controlli negativi. Dopo 6 giorni di coltura, le cellule sono state lisate con una soluzione allo 0,01% di sodio dodecil fosfato (SDS) per 10 minuti a 37°C, e successivamente sonicate per 5 minuti. I livelli di ALP intracellulare sono stati calcolati sui lisati cellulari sfruttando la reazione di conversione del substrato incolore p-nitrofenil fosfato nel prodotto colorato p-nitrofenolo (Sigma), catalizzata dall'enzima ALP. La variazione colorimetrica è stata misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 405 nm, e la quantità di enzima nei campioni è stata estrapolata da una curva standard. I livelli di ALP sono stati normalizzati rispetto al contenuto di proteina totale nei lisati, determinato a 562 nm mediante il kit BCA protein Assay (Pierce). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato, e ripetuti cinque volte.

Test del rosso neutro su cellule di osteosarcoma

Sono stati valutati infine gli effetti delle NP sulla vitalità della linea cellulare di osteosarcoma U-2 OS, fornita dall'American Type Culture Collection (ATCC, codice HTB-96), per escludere nelle fasi successive dello studio eventuali risultati falsi positivi dovuti ad effetti tossici delle NP indipendentemente dalla presenza del farmaco antineoplastico. Le U-2 OS sono state seminate alla densità di 5×10^4 cellule/pozzetto in piastre da 24 pozzetti in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma) al 10% FBS addizionato con L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/ml, streptomycin 100 mg/ml. Dopo 24 ore, le U-2 OS sono state trattate con NP diluite in terreno completo, ed il test del rosso neutro è stato eseguito come descritto in precedenza.

Analisi statistica

I dati sono presentati come media aritmetica \pm SEM. Le differenze tra i campioni trattati con le NP ed i controlli negativi sono state analizzate mediante il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati. I dati sono stati considerati significativi quando presentavano un $p < 0.05$.

Valutazione dell'efficacia antiosteolitica

L'ALE è stato utilizzato nella formulazione delle NP per via del suo elevato tropismo osseo. Come tutti i BP, però, esso possiede una potente attività antiosteolitica. Sono stati quindi effettuati dei saggi per valutare la residua attività antiosteoclastica in seguito al legame con il PLGA.

Isolamento e coltura di osteoclasti

Gli osteoclasti (OC) sono stati ottenuti dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) (Granchi D et al, 2004). Dopo aver diluito i buffy coats in PBS (1:1), le PBMC sono state separate mediante centrifugazione a 2000 rpm per 30 minuti su gradiente di densità (Ficoll-Hystopaque, Sigma), e lavate con PBS. Le cellule sono state poi seminate alla densità di 3×10^6 cellule/cm² in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ad alto contenuto di glucosio (Euroclone) al 10% FBS (Pierce). Dopo 1 ora, le cellule non aderenti sono state rimosse ed il terreno di coltura è stato addizionato con Receptor Activator of NF-kappaB Ligand (RANKL, 30 ng/ml, Peprotech) e Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF, 25 ng/ml, Peprotech). Il terreno di coltura è stato cambiato 2 volte alla settimana.

Formazione di cellule giganti multinucleate

Dopo 7 giorni di coltura, è stata valutata la formazione di cellule multinucleate (MNC) positive per l'enzima fosfatasi acida tartrato-resistente (TRACP). Le cellule sono state fissate con paraformaldeide 3% più 2% saccarosio in PBS per 30 minuti a RT e permeabilizzate con Hapes-Triton allo 0,5% per 5 minuti a RT. Successivamente, l'attività della TRACP è stata valutata per mezzo di una colorazione citochimica (Acid Phosphatase kit, Sigma) per 60 minuti a 37°C. Al termine dell'incubazione, i nuclei sono stati colorati con Hoechst 33258 (2,25 µg/ml, Sigma) per 30' a RT. Le cellule rosse TRACP+ sono state osservate al microscopio ottico, mentre i nuclei blu sono stati osservati mediante microscopia a fluorescenza. Le cellule TRACP+ con 3 o più nuclei sono state considerate come osteoclasti.

Incubazione degli osteoclasti con le NP

Le NP sono state aggiunte alle colture di cellule MNC/TRACP+ dopo 7 giorni dalla semina, a concentrazioni equivalenti a 0,64 µM e 6,4 µM di ALE. Come controllo positivo è stato utilizzato l'ALE (Sigma) alle stesse concentrazioni e inoltre a 100 µM, concentrazione impiegata in letteratura per indurre l'apoptosi degli osteoclasti (Rogers MJ et al, 1996).

Induzione dell'apoptosi degli osteoclasti

L'apoptosi è stata valutata dopo 3 e 7 giorni dall'aggiunta delle NP e dell'ALE, mediante l'analisi della presenza di corpi apoptotici in cellule MNC positive per la presenza del caratteristico anello di actina. Le cellule sono state fissate con paraformaldeide 3% + 2% di saccarosio in PBS per 30 minuti a RT e permeabilizzate con Hapes-

Triton 0,5% per 5 minuti a RT. La colorazione del citoscheletro è stata eseguita mediante incubazione con falloidina-TRITC (Sigma) per 30 minuti a RT, seguita da incubazione con Hoechst 33258 (2,25 µg/ml) per 30' a RT per la colorazione dei nuclei. Le MNC positive per l'anello di actina con corpi apoptotici sono state contate al microscopio a fluorescenza su tutta la superficie del pozzetto.

Inibizione della degradazione del collagene di tipo I

Per la valutazione della degradazione del collagene umano di tipo I da parte degli OC, le PBMC sono state seminate in micropiastre ricoperte con collagene coniugato ad europio (Osteolyse Assay Kit, Lonza). Dopo 7 giorni di coltura, le cellule sono state incubate con NP o ALE come precedentemente descritto. Dopo altri 7 giorni di coltura, la presenza di europio nel sovrinatante è stata determinata con un fluorimetro a fluorescenza risolta nel tempo (Wallac Victor).

Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media aritmetica \pm SEM. Il confronto tra i gruppi di dati è stato effettuato mediante il test di Kruskal-Wallis, mentre il confronto tra i dati appaiati è stato eseguito mediante il test Mann Whitney. I dati sono stati considerati significativi quando presentavano un $p < 0.05$.

Valutazione in vitro dell'efficacia del bone targeting

L'efficacia del bone targeting di un sistema osteotropico somministrabile per via sistemica dipende fortemente sia dalla capacità di sfuggire alla fagocitosi da parte dei monociti/macrofagi, sia dalla capacità di legarsi selettivamente al tessuto osseo. Per

verificare che il naturale tropismo osseo dell'ALE rimanga anche dopo la preparazione delle NP, è stata effettuata un'analisi *in vitro* dell'adesione delle NP ad un preparato di HA sintetica.

Test di affinità nelle nanoparticelle per l'idrossiapatite

NP a base di PLGA-ALE e di PLGA sono state preparate con il metodo descritto in precedenza, utilizzando una miscela acetone/DMSO contenente lo 0,1% della sonda lipofila Oil Red O (Sigma). Un'aliquota di 2 ml di ogni sospensione di NP è stata mescolata con 2 ml di una soluzione acquosa di HA a due diverse concentrazioni (1 o 5 mg/ml), e mescolate gentilmente per 15 o 30 minuti a RT. La soluzione è stata filtrata attraverso pori del diametro di 1,2 μm per eliminare le particelle di HA e le NP ad essa legate, e successivamente sottoposta ad ultracentrifugazione a 15000 rpm per 1 ora a 4°C, per raccogliere le NP non legate ad HA. Il pellet di ciascun campione è stato liofilizzato ed una quantità nota di campione è stata disciolta in DMSO. L'assorbanza del Red Oil O è stata misurata a 523 nm mediante analisi UV/VIS e rapportata ad una curva standard costruita con Oil Red O in DMSO. La quantità relativa di NP rimasta legata all'HA è stata calcolata attraverso la riduzione dell'assorbanza dei campioni rispetto all'assorbanza iniziale delle NP incubate senza HA e trattate alle stesse condizioni. Le NP senza Oil Red O sono state trattate allo stesso modo ed analizzate per compensare l'effetto della torbidità nell'analisi finale. L'esperimento è stato condotto in quadruplicato.

Preparazione di nanoparticelle caricate con il farmaco antineoplastico

Dopo la caratterizzazione, le NP costituite dal coniugato PLGA-ALE sono state preparate in presenza della DXR e caratterizzate. La DXR è un noto agente antineoplastico, la cui azione risulta limitata dalla sua elevata tossicità sul tessuto cardiaco. Il trasporto del farmaco nel sito metastatico attraverso NP osteotropiche dovrebbe aumentare la specificità d'azione del farmaco riducendo gli effetti collaterali. L'efficacia di questo farmaco è già stata testata *in vitro* su linee di osteosarcoma umano con buoni risultati (Baldini N et al, 1992).

Preparazione di nanoparticelle caricate con doxorubicina

Il coniugato PLGA-ALE e la DXR sono stati disciolti in acetone/DMSO. La fase organica è stata aggiunta goccia a goccia in una soluzione di PBS contenente Pluronic F68. La sospensione è stata mantenuta in agitazione a RT per 10 minuti. L'acetone è stato rimosso a 30°C in condizioni di bassa pressione e la sospensione è stata purificata mediante dialisi in acqua (M.W. cutoff:2000, M Medical). Il volume finale della sospensione è stato corretto con PBS. Variando la percentuale di farmaco nella reazione, il volume del solvente organico o della fase acquosa, la quantità di emulsionante (Pluronic F68) o infine la velocità di agitazione, sono stati preparati diversi tipi di NP coniugate alla DXR (NP-DXR) (Tab. 2).

numero campione	% farmaco w/w	PLGA-ALE (mg)	DXR (mg)	volume solvente organico ¹ (ml)	volume fase acquosa ² (ml)	Velocità di agitazione (rpm)	Emulsificatore Pluronic F68 (mg)
1	5	95	5	10 (1:1)	25	20500	100
2	3	97	3	5 (1,5:1)	100	20500	30
3	3	97	3	5 (1,5:1)	150	13500	30
4	2	98	2	5 (1,5:1)	150	20500	30
5	2	98	2	5 (1,5:1)	100	13500	30

Tabella 2. Preparazioni delle NP-DXR.

¹ come solvente organico è stata utilizzata una miscela acetone/DMSO (1:1 o 1.5:1 v/v)

² come fase acquosa è stata utilizzata una soluzione di PBS

Valutazione del legame alla doxorubicina

Le NP preparate in soluzione acquosa sono state raccolte dopo tre differenti tempi di dialisi (0, 21, 44 ore) mediante ultracentrifugazione a 15000 rpm per 1 ora a 4°C, ed il pellet di ciascun campione è stato liofilizzato. Una quantità nota di campione è stata disciolta in DMSO e l'assorbanza della DXR è stata misurata a 480 nm. L'efficienza di incapsulazione è stata calcolata in base al rapporto la quantità incorporata alle NP rispetto alla quantità iniziale.

Sterilizzazione delle nanoparticelle

Per la sterilizzazione delle NP (coniugate con DXR o base di PLGA-ALE) sono stati utilizzati due differenti metodi. Nel primo caso, le NP sono state sterilizzate mediante filtrazione attraverso filtri sterili con pori dal diametro di 0,45 µm (filtri in polisulfone, 13 mm, Whatman Shecher& Schuell). Nel secondo caso, i campioni sono stati sterilizzati mediante radiazioni gamma (5, 10 or 25 Kgy)

(Gammatom, CO, Italy). L'analisi delle dimensioni medie ed del PI è stata ripetuta in seguito alla sterilizzazione con entrambi i metodi.

Valutazione *in vitro* dell'efficacia delle nanoparticelle caricate con doxorubicina

L'efficacia farmacologica della DXR incapsulata nelle NP è stata valutata *in vitro* e confrontata con quella della DXR libera. In particolare, sono stati effettuati su modelli di linee cellulari di origine umana dei saggi funzionali, come la valutazione dell'uptake nucleare delle NP-DXR e la capacità di inibizione della proliferazione cellulare. La DXR è un fluorocromo naturale e la sua localizzazione a livello nucleare, tipica delle cellule sensibili alla sua azione farmacologica, può essere verificata mediante una semplice osservazione al microscopio a fluorescenza. Il pattern di distribuzione delle NP-DXR è stato confrontato con quello della DXR libera. La concentrazione delle NP è stata calcolata considerando la percentuale di legame del farmaco alle NP, in modo da utilizzare per gli esperimenti la stessa concentrazione di DXR libera o incapsulata. Per escludere eventuali effetti aspecifici sulla proliferazione cellulare, gli esperimenti sono stati effettuati anche in seguito ad incubazione con NP PLGA-ALE.

Colture cellulari

L'efficacia *in vitro* delle NP-DXR è stata valutata su sei linee cellulari umane modello, fornite dall'ATCC (Tab. 3). Le cellule sono state mantenute in IMDM al 10% di FBS addizionato con L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/ml, streptomina 100 mg/ml.

Linea cellulare	Origine	Codice ATCC
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mammario	HTB-26
MCF7	Adenocarcinoma mammario	HTB-22
Saos-2	Osteosarcoma	HTB-85
U-2 OS	Osteosarcoma	HTB-96
ACHN	Adenocarcinoma renale	CRL-1611
SH-SY5Y	Metastasi midollare da neuroblastoma	CRL-2266

Tabella 3. Linee cellulari utilizzate per gli esperimenti *in vitro*.

Uptake della doxorubicina incapsulata nelle nanoparticelle

La concentrazione ottimale della DXR per gli esperimenti di uptake nucleare è stata standardizzata mediante esperimenti preliminari. Le linee sono state seminate in chamber-slides (MDA-MB-231, SHSY5Y e U-2 OS: 3000 cellule/pozzetto; Saos-2, ACHN e MCF7: 6000 cellule/pozzetto) in IMDM completo. Dopo 24 ore, il terreno è stato cambiato con terreno completo contenente 10 µg/ml e 50 µg/ml di DXR (doxorubicina idrocloreuro, Sigma) e le colture sono state incubate a 37°C per 30, 60, 90, 120 e 180 minuti. Il controllo negativo è stato incubato con terreno completo per 180 minuti. Ad ogni end-point, le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza per verificare la presenza della fluorescenza rossa nucleare. È stata verificata la presenza della DXR in tutte le linee cellulari dopo un'incubazione di 30 minuti alla concentrazione di 10 µg/ml. Questa condizione è stata utilizzata per i successivi esperimenti di uptake delle NP-DXR. L'uptake nucleare delle NP-DXR è stato inizialmente verificato sulle U-2 OS a differenti end-points. Le cellule sono state seminate in chamber-slides (12000 cellule/pozzetto) in IMDM completo. Dopo 24 ore, il terreno è stato

cambiato con terreno addizionato con NP-DXR (concentrazione equivalente a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di DXR libera), DXR 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e terreno completo. Dopo 30 minuti di incubazione, le colture sono state lavate con PBS e l'uptake del farmaco è stato verificato al microscopio a fluorescenza. A questo punto, il citoscheletro cellulare è stato marcato con falloidina-FITC (Sigma) e le cellule sono state osservate al microscopio confocale per verificare la presenza intracellulare della DXR libera o coniugata alle NP. Brevemente, le cellule sono state lavate con PBS, fissate in paraformaldeide 3% più 2% saccarosio in PBS per 30 minuti a RT e permeabilizzate con Hapes-Triton allo 0,5% per 5 minuti a RT. Dopo 3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati montati con PBS al 15% in glicerolo ed osservati al microscopio confocale.

L'uptake cellulare è stato poi verificato sulle U-2 OS alle medesime concentrazioni impiegate successivamente negli esperimenti di inibizione della proliferazione. Le U-2 OS sono state seminate alla stessa densità ed incubate con NP-DXR a concentrazioni equivalenti a 580 ng di DXR/ml e 1 μg di DXR/ml. L'incubazione è stata mantenuta per 3, 6 e 24 ore. I migliori risultati sono stati ottenuti alla concentrazione di NP-DXR equivalente a 580 ng di DXR/ml e con il tempo di incubazione di 24 ore, ed utilizzate per la valutazione dell'uptake delle NP-DXR sulle altre linee cellulari.

Inibizione della proliferazione delle cellule neoplastiche

La concentrazione di DXR capace di inibire la proliferazione delle 6 linee tumorali è stata valutata mediante esperimenti preliminari. Le cellule sono state seminate in duplicato in piastre da 6 pozzetti (U-2 OS, SHSY5Y e MDA-MB-231: 30000 cellule/pozzetto; ACHN: 50000 cellule/pozzetto; Saos-2 e MCF7: 80000 cellule/pozzetto). Dopo 24

ore, il terreno è stato cambiato con IMDM addizionato con DXR libera (580 ng/ml, 58 ng/ml e 5,8 ng/ml). Il controllo negativo è stato incubato in terreno completo. Le cellule sono state incubate per 72 ore (MCF7) o 48 ore (tutte le altre linee), in base al tempo di raddoppiamento caratteristico di ciascuna linea cellulare. Dopo l'incubazione, le cellule vitali sono state contate in camera di Burker in seguito a colorazione Trypan Blue. Successivamente è stato valutato l'effetto inibente delle NP-DXR. Le cellule sono state seminate alle stesse densità descritte in precedenza ed incubate in IMDM completo. Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato addizionato con DXR libera, NP-DXR, NP a base di PLGA-ALE senza farmaco, PBS o terreno completo per 48 o 72 ore. Le NP-DXR erano state sterilizzate per filtrazione. Al termine dell'incubazione, il numero di cellule vitali è stato determinato in camera di Burker mediante la colorazione Trypan Blue. L'efficacia delle NP-DXR sterilizzate mediante raggi gamma è stata valutata alle stesse condizioni sperimentali e confrontata con i risultati ottenuti.

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media aritmetica \pm SEM. Le differenze tra i campioni trattati con NP-DXR, con DXR ed i controlli negativi sono state analizzate mediante il test di Kruskal-Wallis, mentre il confronto tra i due gruppi è stato eseguito mediante il test Mann Whitney. I dati sono stati considerati significativi quando presentavano un $p < 0.05$.

Valutazione dell'efficacia *in vivo*

L'efficacia delle NP-DXR nel ridurre *in vivo* lo sviluppo di metastasi osteolitiche è stata valutata su un modello murino di metastasi ossee da carcinoma delle mammella. Gli esperimenti sono stati condotti presso il Dipartimento di Patologia Sperimentale dell'Università di L'Aquila (Prof. Anna Teti), in conformità con le leggi nazionali ed internazionali (CEE Consiglio Direttivo 86/09, OJ L 358, 1, Dec. 12, 1987; Decreto Legislativo Italiano 116/92, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 40, Feb. 18, 1992; NIH guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985) ed approvati dal Comitato Etico-Scientifico dell'Istituzione. Sono stati condotti due esperimenti, ed i dati presentati come media ed errore standard dei risultati.

Induzione delle metastasi osteolitiche

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati utilizzati femmine dell'età di 4 settimane di topi BALB/c-nu/nu immunodepressi (Charles River), mantenuti in condizioni di sterilità. Gli animali sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intraperitoneale di sodio pentobarbitale (60 mg/Kg). Cellule della linea MDA-MB-231 di adencarcinoma mammario (1×10^4) sono state risospese in 25 ml di PBS ed iniettate nello spazio intramidollare della tibia prossimale. Questa tecnica permette di ottenere un'elevata incidenza di metastasi osteolitiche entro 20-25 giorni dall'inoculo.

Somministrazione dei trattamenti

A partire dal giorno dopo l'iniezione, e per un totale di sei settimane, gli animali sono stati sottoposti settimanalmente ad iniezione intraperitoneale secondo il seguente protocollo preventivo:

- gruppo 1: trattamento con il veicolo (PBS)
- gruppo 2: trattamento con 0,2 mg/Kg DXR (DXR)
- gruppo 3: trattamento con 0,2 mg/Kg NP PLGA-ALE (BP-NP)
- gruppo 4: trattamento con 0,2 mg/Kg NP-DXR
- gruppo 5: trattamento con 1 mg/Kg DXR (DXR)
- gruppo 6: trattamento con 1 mg/Kg NP PLGA-ALE (BP-NP)
- gruppo 7: trattamento con 1 mg/Kg NP-DXR

Per monitorare l'insorgenza e la progressione delle lesioni osteolitiche gli animali sono stati sottoposti settimanalmente ad analisi radiografica (36 KPV per 10 sec), a partire dal 28esimo giorno dall'iniezione e fino alla fine dell'esperimento (42esimo giorno), utilizzando un sistema a raggi X (Faxitron modello n.43855A). Al termine dell'esperimento, gli animali sono stati sacrificati e sottoposti a dissezione anatomica, e le tibie sono state sezionate e processate per l'analisi istologica.

Valutazione dell'efficacia dei trattamenti

L'incidenza delle lesioni osteolitiche è stata valutata mediante conteggio del numero di zampe con presenza di lesioni, rapportato al numero totale di zampe per ciascun gruppo. Per l'analisi istologica, le tibie sono state sezionate, pulite dai tessuti molli e fissate in formaldeide 4% in buffer fosfato 0,1 M pH=7,2. I campioni sono stati poi decalcificati in EDTA ed inclusi in paraffina. Le sezioni sono state tagliate e sottoposte a colorazione ematossilia-eosina per valutare lo spostamento del midollo osseo da parte delle cellule tumorali ed il diametro del tumore. Le sezioni sono state inoltre colorate per i tipici marcatori degli OC (TRACP) e sottoposte ad analisi istomorfometrica.

RISULTATI

Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità del coniugato tra acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) ed alendronato

Efficienza di coniugazione

La sintesi del coniugato PLGA-ALE ha fornito una resa di produzione del 70-75%. La struttura chimica del coniugato è stata confermata mediante analisi MALDI MS e ¹H-NMR. Nell'analisi ¹H-NMR il copolimero puro ha mostrato il segnale tipico intorno a 1,55 ppm, dovuto alla presenza di gruppi metilici delle unità degli acidi D- e L-lattico, e le multiplette a 5,2 e 4,8 ppm, corrispondenti ai gruppi CH dell'acido lattico e CH₂ dell'acido glicolico (Fig 6A). L'ALE ha dato uno spettro piuttosto semplice caratterizzato principalmente da due singoletti centrati a 1,86 e 2,71 ppm (Fig 6B). Nello spettro NMR del coniugato PLGA-ALE è stata ovviamente osservata una prevalenza dei segnali dei polimeri (Fig 6C), ma la presenza dell'ALE è stata confermata da un piccolo picco a 1,79 ppm. L'accumulo e l'allargamento di questi segnali ha permesso di calcolare il grado della sostituzione dell'ALE nello scheletro del polimero, dando una resa media di coniugazione del 38%.

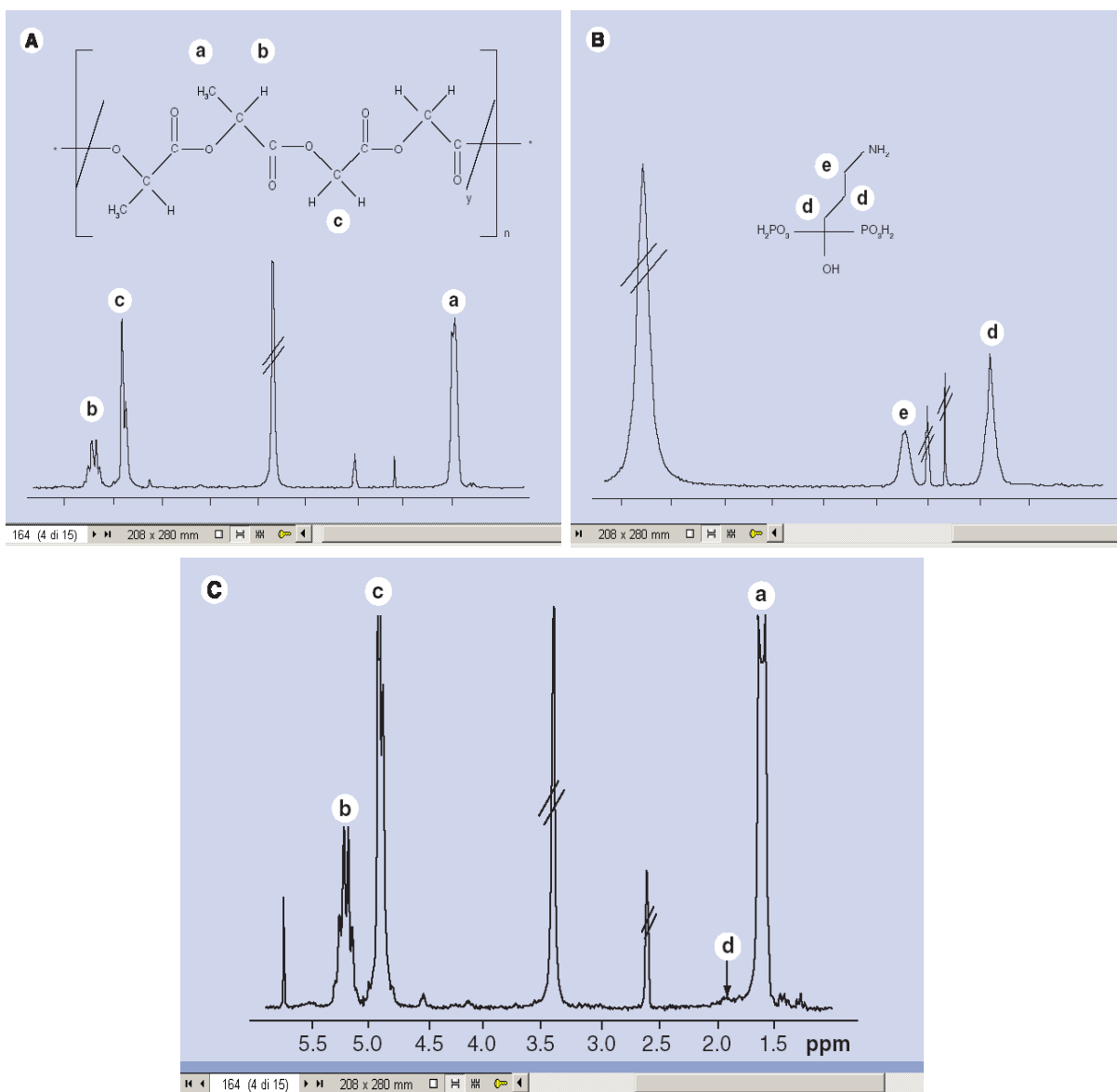


Figura. 6. Spettri $^1\text{H-NMR}$ del: A) PLGA; B) ALE; C) PLGA-ALE

La struttura chimica del PLGA-ALE è stata confermata dall'analisi MALDI-MS. In particolare, è visibile nello spettro MS del coniugato (Fig. 7B) un aumento nell'abbondanza dello ione a m/z 1585 rispetto al copolimero puro PLGA (Fig. 7A). Questo tipo di segnale, che corrisponde alle specie cationizzate (Na^+) che derivano dalla condensazione dell'ALE al polimero, ha dimostrato che è avvenuta una reazione chimica tra il PLGA e l'ALE, suggerendo una resa

diconiugazione media del 30-35%, non molto diversa da quella calcolata dall'analisi $^1\text{H-NMR}$.

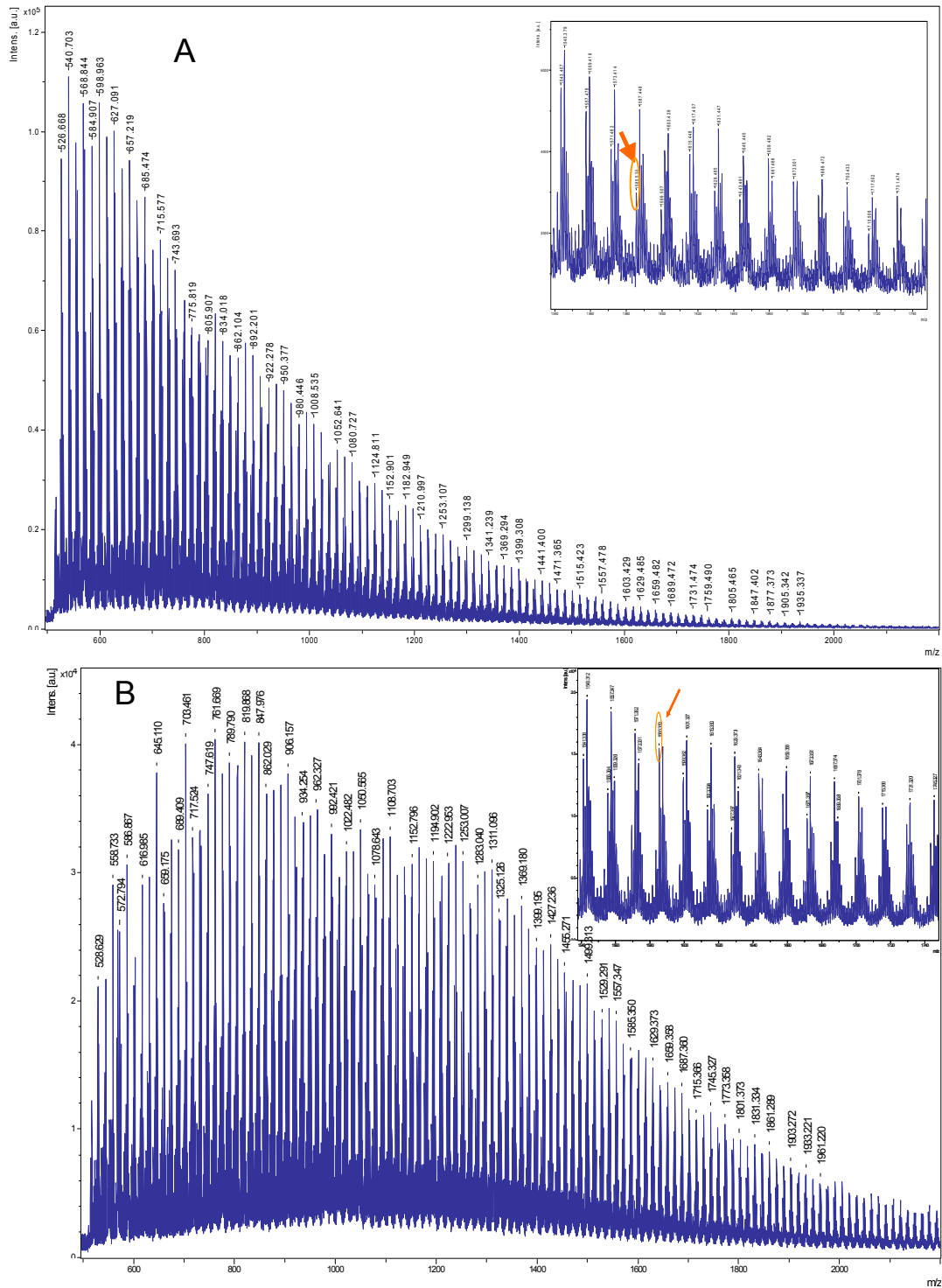


Figura. 7. Spettri MALDI-TOF del: A) PLGA; B) PLGA-ALE. In ascissa è rappresentata l'intensità del segnale (unità arbitrarie).

Saggi di emocompatibilità

Test di emolisi

Gli effetti del PLGA-ALE sugli eritrociti sono stati valutati in due esperimenti condotti in triplicato. Il PLGA-ALE, così come il DMSO, ha indotto un'attività emolitica inferiore all'1%. Il controllo positivo costituito dalla saponina, al contrario, ha indotto in entrambi gli esperimenti una percentuale di emolisi superiore al 100% (Tab. 4).

Campione	Concentrazione	% di emolisi
PLGA-ALE	3,14 mg/ml	0,01 ± 0,40
PLGA-ALE	314 µg/ml	0,01 ± 0,20
PLGA-ALE	31,4 µg/ml	0,01 ± 0,13
PLGA-ALE	3,14 µg/ml	0,17 ± 0,35
PLGA-ALE	314 ng/ml	0,01 ± 0,31
Saponina	25 mg /ml	100
H ₂ O distillata	-	100

Tabella. 4. Media aritmetica ± errore standard della percentuale di emolisi indotta in seguito ad incubazione con il coniugato PLGA-ALE.

Valutazione degli effetti sulla fase plasmatica della coagulazione

Per valutare gli effetti del coniugato sulla fase plasmatica di coagulazione sono stati condotti due esperimenti in duplicato. In condizioni basali, il PT e l'APTT sono stati rispettivamente di 140,2 ± 2,5 % e 35,6 ± 0,3 secondi. Nel plasma incubato con il PLGA-ALE a diverse diluizioni, il PT e l'APTT non sono stati significativamente differenti da quelle misurate nel plasma incubato con PBS. Inoltre, il DMSO alle stesse diluizioni non ha alterato il PT né l'APTT (Fig. 8A-B).

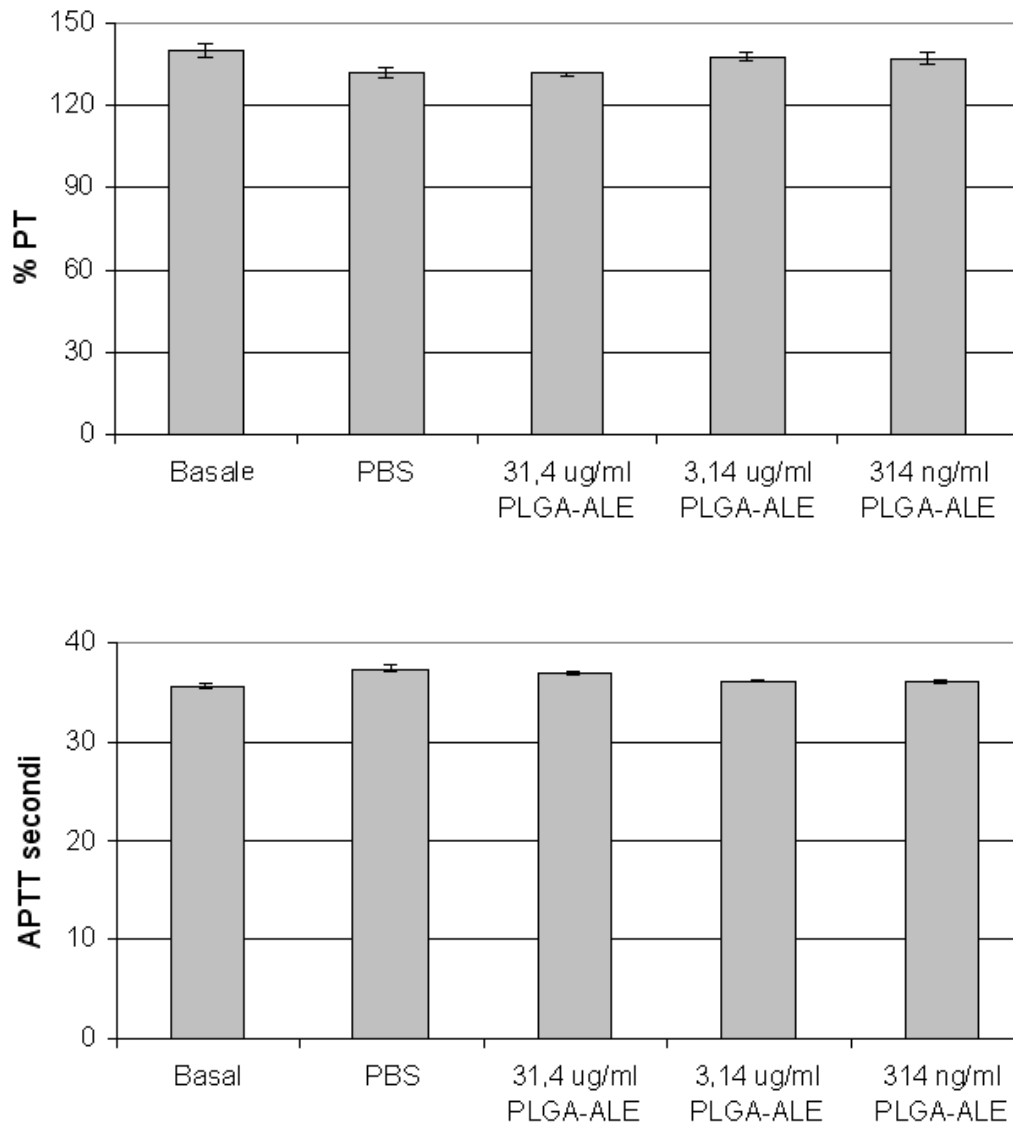


Figura 8. Attività protrombinica (A) e tempo di protrombina parziale attivata (B) dopo incubazione con il coniugato PLGA-ALE

Saggi di citocompatibilità

Test del rosso neutro sulle cellule endoteliali

Il test del rosso neutro sulle colture di cellule endoteliali è stato eseguito per tre volte in triplicato. Né il PLGA-ALE né il DMSO

hanno alterato significativamente la vitalità delle cellule endoteliali ($p=0,61$). In seguito ad incubazione con il PLGA-ALE è stata osservata una percentuale di vitalità rispetto al controllo variabile da $121,3\pm 10,3\%$ a $108,3\pm 5,6\%$ (concentrazione del coniugato rispettivamente $314 \mu\text{g/ml}$ e 314 ng/ml), ed il DMSO non ha causato alterazioni della vitalità cellulare alle concentrazioni saggate. Al contrario, la vitalità delle HUVEC incubate con il controllo positivo (fenolo) è stata pari a $14,5\pm 1,3\%$. Il controllo positivo si è rivelato perciò altamente citotossico (Fig. 9).

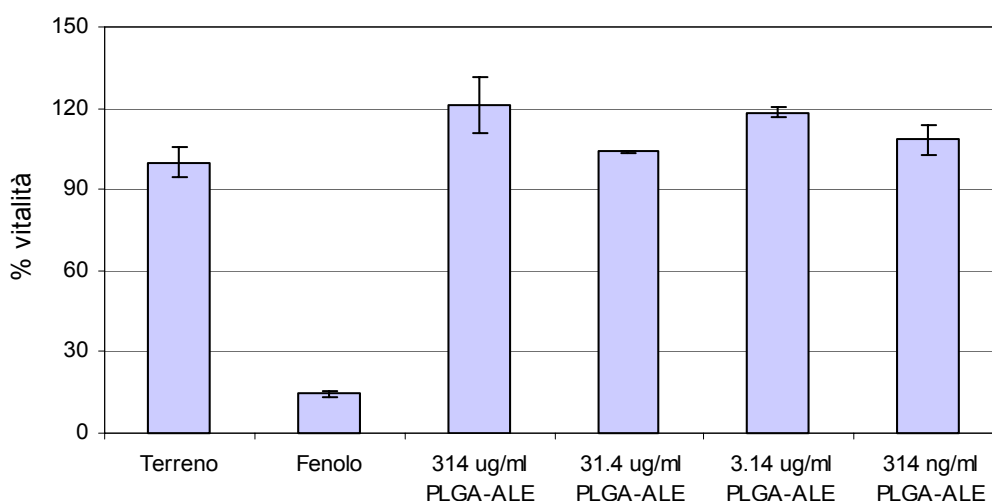


Figura 9. Test del rosso neutro sulle colture di HUVEC.

Test del rosso neutro sugli osteoblasti trabecolari

Il test del rosso neutro sulle colture di HOB è stato eseguito per tre volte in triplicato. Né l'incubazione con il PLGA-ALE né con il DMSO ha alterato significativamente la vitalità cellulare ($p=0,98$). In seguito ad incubazione con il PLGA-ALE è stata osservata una percentuale di vitalità rispetto al controllo variabile da $151,0 \pm 22,1\%$ a $134,5 \pm 13,94\%$ (concentrazione del coniugato rispettivamente $314 \mu\text{g/ml}$ e 314 ng/ml). Al contrario, la vitalità degli HOB è stata pari a $19,0 \pm$

2,4% in seguito ad incubazione con il controllo il controllo positivo (fenolo), che si è rivelato perciò altamente citotossico (Fig. 10).

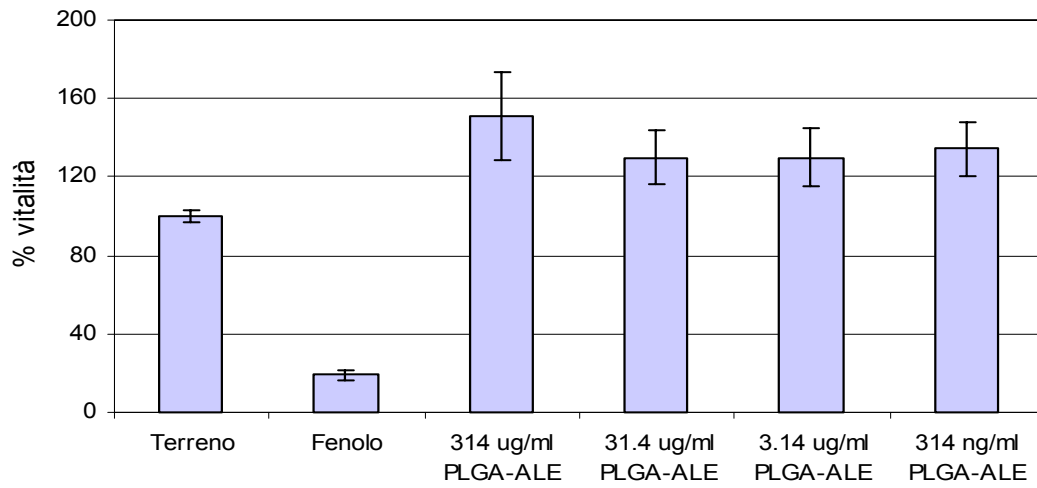


Figura 10. Test del rosso neutro sulle colture di HOB.

Sintesi, caratterizzazione e biocompatibilità di nanoparticelle per il bone targeting

Preparazione e caratterizzazione

Il migliore risultato è stato ottenuto utilizzando la miscela acetone/DMSO. Il DMSO, infatti, migliora la scarsa solubilità del coniugato in acetone, permettendo un buon compromesso con le dimensioni ottenute. Le NP PLGA-ALE hanno mostrato una distribuzione omogenea, con una dimensione media di $198,7 \pm 0,2$ nm (Fig. 11) ed un PI di $0,348 \pm 0,020$ nm. Le NP hanno mostrato una carica netta di superficie negativa (potenziale ζ di $-37,2 \pm 5,01$ mV), non molto diverso da quello delle NP a base di PLGA pura ($-41,8 \pm 3,92$ mV). All'analisi al SEM le NP a base di PLGA-ALE sono apparse sferiche, con una superficie liscia ed uniforme (Fig. 12).

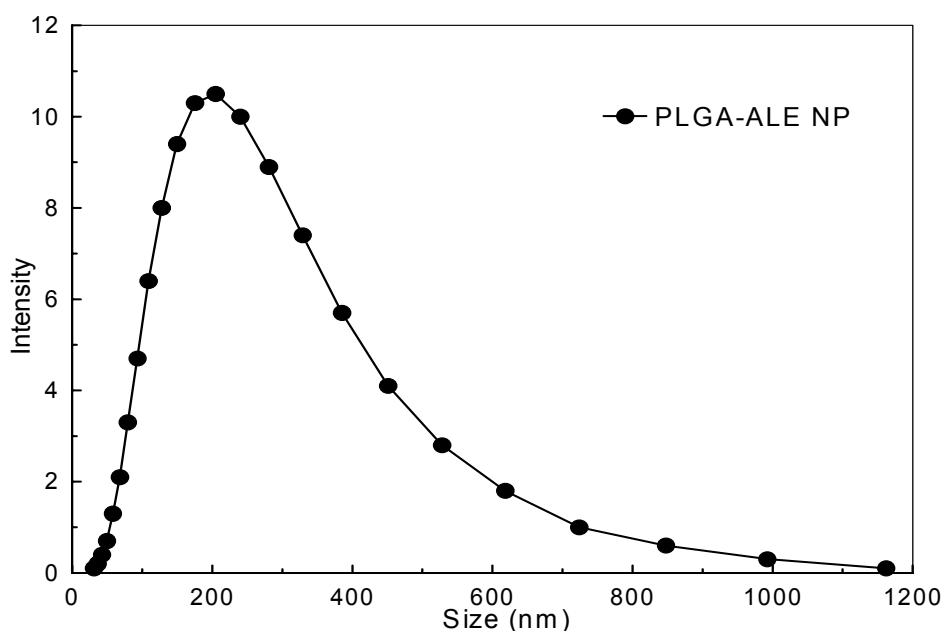


Figura 11. Distribuzione gaussiana della dimensione media delle NP PLGA-ALE. Dimensione media= $198,7 \pm 0,2$ nm.

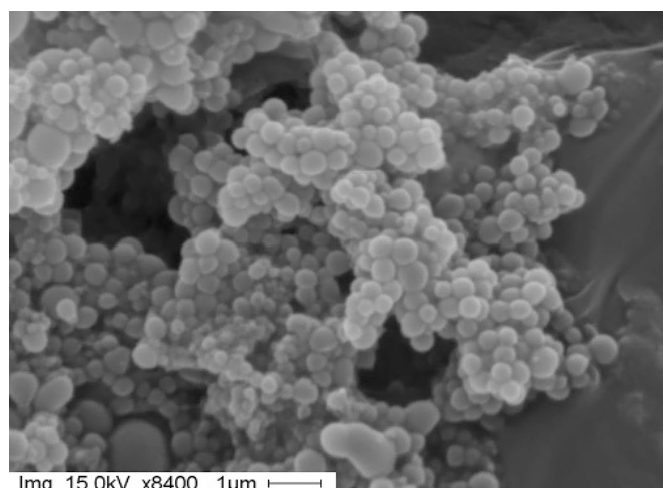


Figura. 12. Analisi al microscopio elettronico a scansione della morfologia delle NP PLGA-ALE (ingrandimento 8400x).

Saggi di emocompatibilità

Test di emolisi

L'emolisi indotta dalle NP PLGA-ALE è stata testata attraverso sei esperimenti. Il controllo positivo (saponina) ha indotto una percentuale di emolisi del $132,70 \pm 2,74$ %, mentre quella indotta dalle NP PLGA-ALE è stata trascurabile (Tab. 5).

Campione	Concentrazione NP	% emolisi
NP PLGA-ALE	56 $\mu\text{g/ml}$	$0,001 \pm 0,165$
NP PLGA-ALE	5,6 $\mu\text{g/ml}$	$0,289 \pm 0,320$
NP PLGA-ALE	0,56 $\mu\text{g/ml}$	$0 \pm 0,272$
NP PLGA-ALE	56 ng/ml	$0,356 \pm 0,309$
NP PLGA-ALE	5,6 ng/ml	$0,167 \pm 0,191$
NP PLGA-ALE	0,56 ng/ml	$0 \pm 0,155$
PBS	-	0
Saponina	-	100
H ₂ O distillata	-	100

Tabella.5. Media aritmetica \pm errore standard della percentuale di emolisi indotta in seguito ad incubazione con le NP PLGA-ALE

Effetti delle NP sul numero dei leucociti

Le NP PLGA-ALE a qualunque concentrazione testata non hanno indotto nessuna alterazione significativa del numero di WBC totali né delle sottopopolazioni (Tab. 6).

Campione	Concentrazion e NP	WBC totali $\times 10^3/\mu\text{l}$	Neutrofilii %	Linfociti %	Monociti %	Eosinofil i %
NP PLGA-ALE	56 $\mu\text{g/ml}$	$4,18 \pm 0,76$	$40,7 \pm 11,3$	$49,7 \pm 13,0$	$5,3 \pm 2,6$	$4,3 \pm 0,3$
NP PLGA-ALE	5,6 $\mu\text{g/ml}$	$4,0 \pm 0,78$	$42,0 \pm 15,0$	$48,3 \pm 16,8$	$7,0 \pm 3,5$	$2,7 \pm 0,9$
NP PLGA-ALE	0,56 $\mu\text{g/ml}$	$4,12 \pm 1,19$	$47,3 \pm 6,1$	$41,3 \pm 8,9$	$8,0 \pm 1,7$	$3,3 \pm 1,3$
NP PLGA-ALE	56 ng/ml	$4,63 \pm 1,43$	$55,3 \pm 8,2$	$36,7 \pm 10,4$	$3,3 \pm 1,7$	$4,7 \pm 1,2$
NP PLGA-ALE	5,6 ng/ml	$4,57 \pm 1,03$	$47,3 \pm 4,7$	$40,3 \pm 6,4$	$8,7 \pm 1,9$	$3,7 \pm 0,3$
NP PLGA-ALE	0,56 ng/ml	$4,05 \pm 1,05$	$41,0 \pm 5,5$	$48,0 \pm 6,7$	$6,0 \pm 1,2$	$5,0 \pm 1,5$
PBS	-	$4,6 \pm 1,7$	$46,0 \pm 3,1$	$41,3 \pm 2,7$	$7,3 \pm 1,4$	$5,3 \pm 2,4$
Conditioni basali	-	$4,65 \pm 1,72$	$49,0 \pm 11,5$	$42,7 \pm 12,0$	$5,0 \pm 1,2$	$3,3 \pm 0,9$

Tabella. 6. Media aritmetica \pm errore standard del numero totale dei leucociti e percentuale di sottopopolazioni in seguito ad incubazione con le NP.

Effetti delle NP sulle piastrine

Sono stati condotti tre esperimenti in triplicato. Non è stata osservata nessuna alterazione significativa nel numero di piastrine dopo incubazione con le NP (Tab. 7). Inoltre, le NP non hanno indotto una significativa attivazione delle piastrine, come dimostrato dal test per il rilascio del PF4 (Fig. 13).

Campione	Concentrazione NP	Numero piastrine $\times 10^3/\mu\text{l}$
NP PLGA-ALE	56 $\mu\text{g/ml}$	$463,07 \pm 49,83$
NP PLGA-ALE	5,6 $\mu\text{g/ml}$	$508,33 \pm 23,12$
NP PLGA-ALE	0,56 $\mu\text{g/ml}$	$480,42 \pm 9,53$
NP PLGA-ALE	56 ng/ml	$473,33 \pm 26,71$
NP PLGA-ALE	5,6 ng/ml	$521,67 \pm 35,28$
NP PLGA-ALE	0,56 ng/ml	$478,33 \pm 20,63$
PBS	-	$482,08 \pm 44,97$
condizioni basali	-	$509,17 \pm 29,20$

Tabella. 7. Media aritmetica \pm errore standard del numero di piastrine in seguito ad incubazione con le NP.

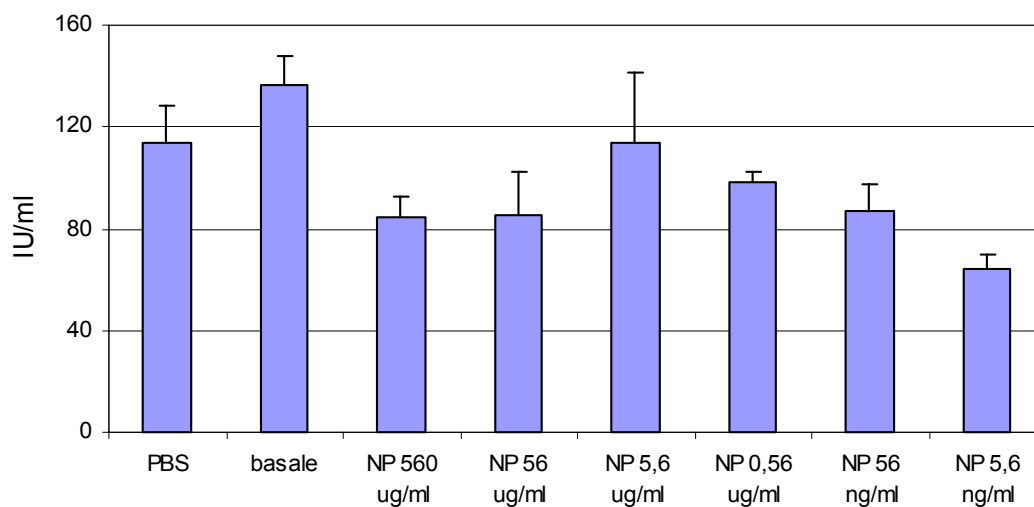


Figura. 13. Rilascio del PF4 dopo incubazione con NP PLGA-ALE.

Effetti delle NP sulla fase plasmatica di coagulazione

Per valutare gli effetti delle NP a base di PLGA-ALE sulla fase plasmatica di coagulazione sono stati condotti sette esperimenti. Dopo incubazione con 560 $\mu\text{g/ml}$ è stata dimostrata una significativa riduzione del PT rispetto al controllo negativo (PBS) (NP PLGA-ALE: $130,3 \pm 2,5$ %, range 124-140 %; PBS: $137,3 \pm 2,7$ %, range 129-149 %; $p=0,017$). Un aumento significativo è stato inoltre osservato alle diluizioni più alte (Fig. 14A). Non sono state invece osservate variazioni significative dell'APTT (Fig. 14B).

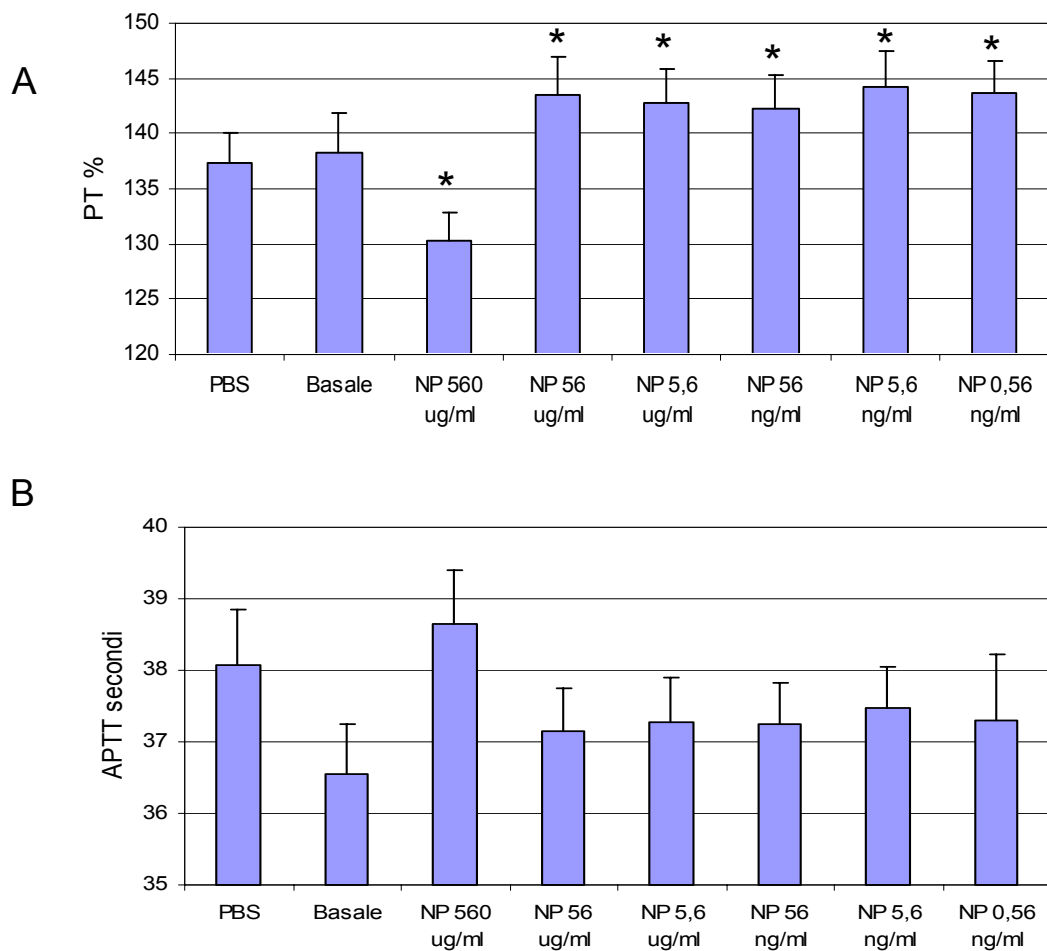


Figura 14. Attività protrombinica (A) e tempo di protrombina parziale attivata (B) dopo incubazione con le NP PLGA-ALE.

Valutazione del consumo del complemento (via classica ed alternativa)

Gli effetti delle NP PLGA-ALE sulla via classica del consumo di complemento sono stati valutati attraverso quattro esperimenti. Lo Zymosan, un estratto della parete cellulare di lievito ben caratterizzato come potente attivatore del complemento, è stato utilizzato come controllo positivo. Il siero umano incubato a 37°C rappresentava il controllo dell'attivazione del complemento in condizioni basali. Il PBS è stato utilizzato come controllo negativo. Le NP non hanno indotto l'attivazione del complemento per la via

classica (Fig. 15A), Gli effetti delle NP PLGA-ALE sulla via alternativa di attivazione del complemento sono stati valutati mediante tre esperimenti. Le NP non hanno attivato la via alternativa del complemento, come dimostrato dai valori simili a quelli del controllo negativo (PBS). Al contrario, lo Zymosan ha indotto un 70% di consumo di complemento, pari al doppio di quello indotto dal PBS (Fig. 15B). La non attivazione del complemento da parte delle NP è stata confermata dall'analisi del frammento Bb, prodotto durante la via alternativa, la cui produzione non è stata indotta in seguito ad incubazione con le NP (Fig. 15C).

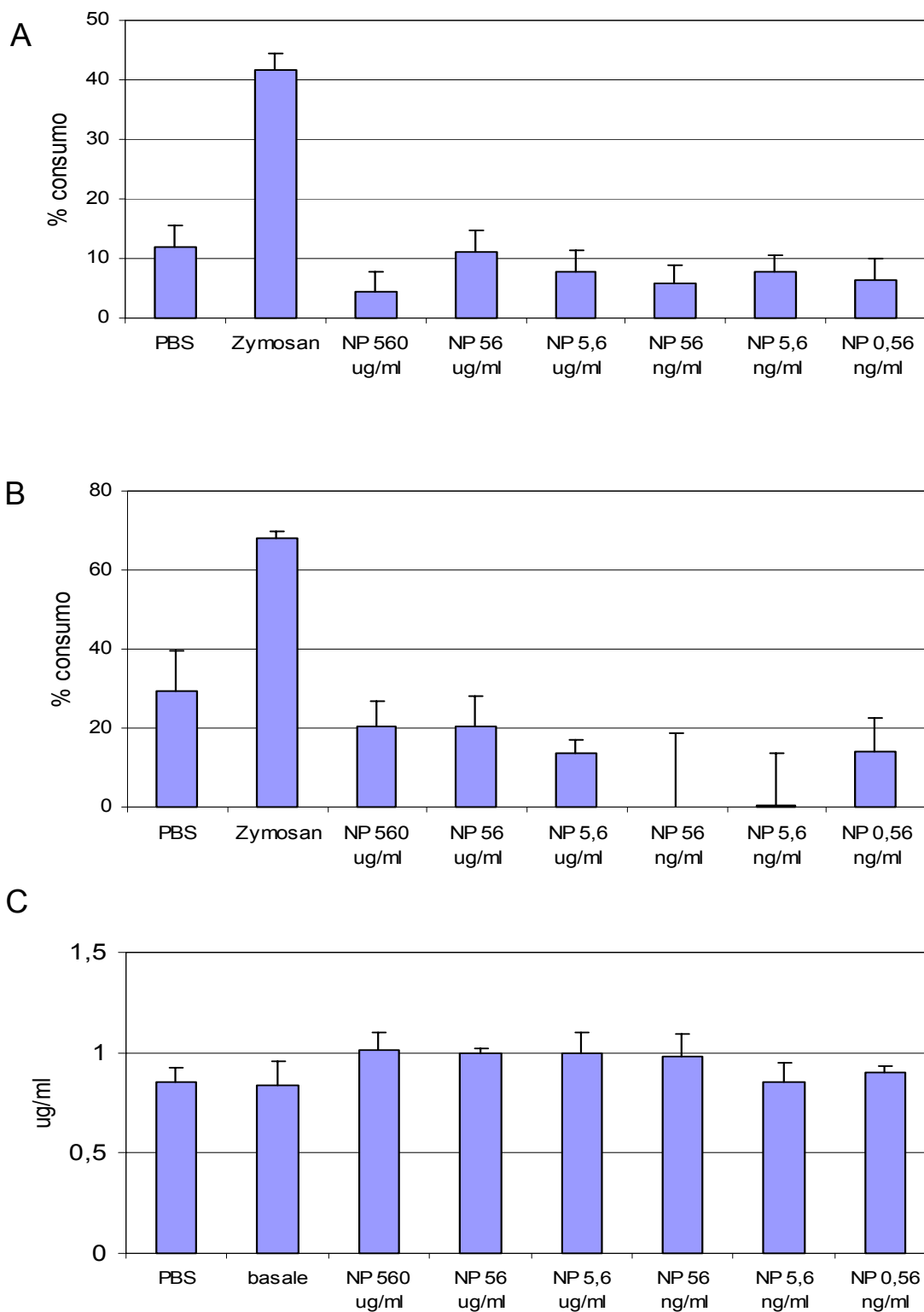


Figura 15. Percentuale di consumo del complemento per via classica (A) ed alternativa (B). L'analisi della concentrazione del frammento Bb ha confermato che le NP non hanno determinato il consumo di complemento (C)

Saggi di citocompatibilità

Test del rosso neutro sulle HUVEC e sulle MSC

Il test del rosso neutro per la valutazione degli effetti delle NP sulla vitalità delle cellule endoteliali e delle MSC è stato ripetuto tre volte in triplicato. La vitalità cellulare dopo incubazione per 24 ore con le varie concentrazioni di NP o PBS è sempre stata maggiore dell'80%. Il fenolo, al contrario, ha ridotto la vitalità cellulare fino al $19,0 \pm 1,2$ % (HUVEC) e 27.5 ± 0.8 % (MSC) (Fig. 16).

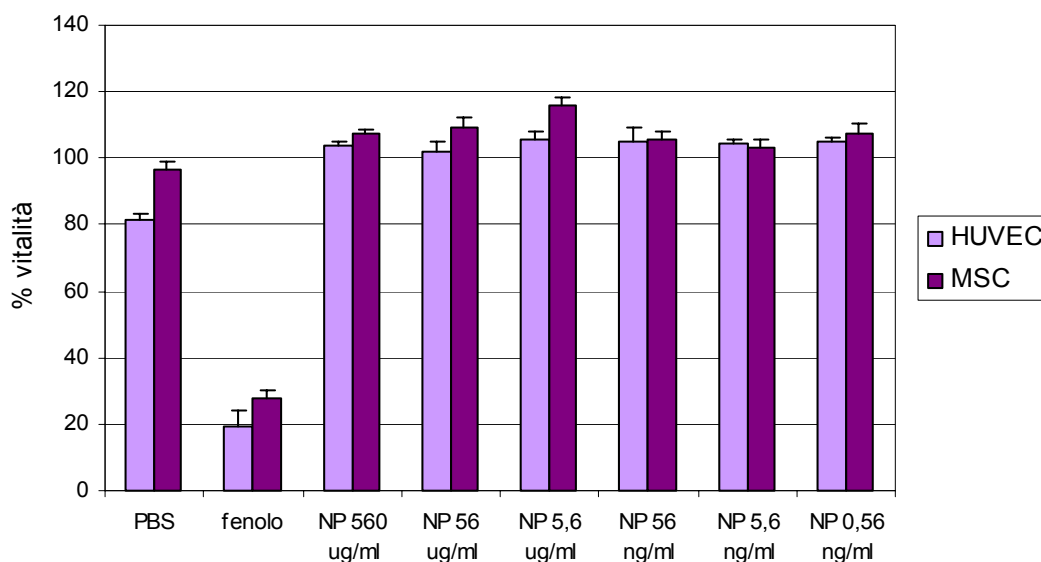


Figura 16. Vitalità delle HUVEC e delle MSC. La percentuale è riferita al controllo incubato con solo terreno (100%).

Attività della fosfatasi alcalina

Gli esperimenti per valutare alterazioni dell'attività dell'ALP delle MSC indotte dalle NP sono stati condotti cinque volte in triplicato. Non sono state riscontrate differenze significative tra i campioni incubati con il terreno o con le NP (Fig. 17).

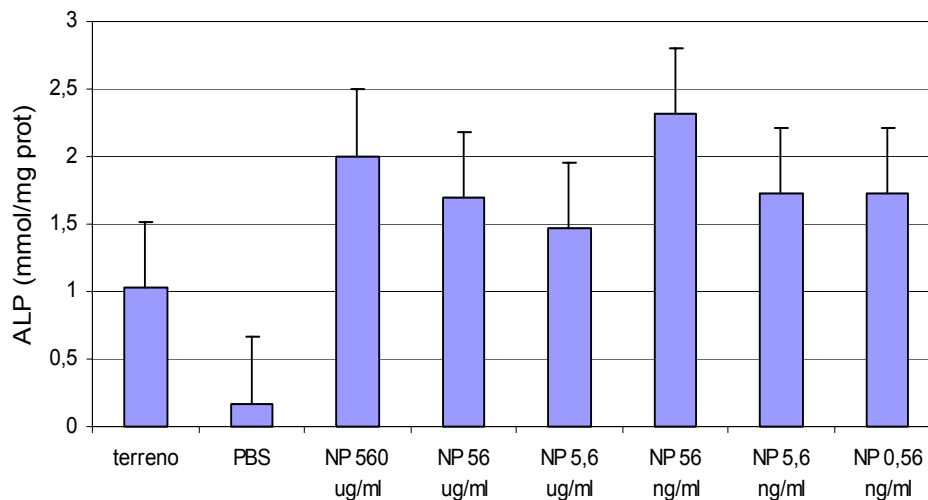


Figura 17. Attività dell'ALP associata alle MSC dopo 6 giorni di coltura. I valori sono stati normalizzati al contenuto proteico totale per ogni campione, e sono espressi come mM ALP/mg proteina.

Test del rosso neutro su cellule di osteosarcoma

L'esperimento è stato condotto in triplicato. La vitalità delle U-2 OS dopo 24 ore di esposizione alle NP ed al controllo è stata del $106,3 \pm 0,8\%$. Le cellule incubate con il PBS hanno mostrato una vitalità dell' $80,1\%$, mentre il controllo positivo (fenolo) ha ridotto la vitalità cellulare fino al $43,2 \pm 4,9\%$ (Fig. 18).

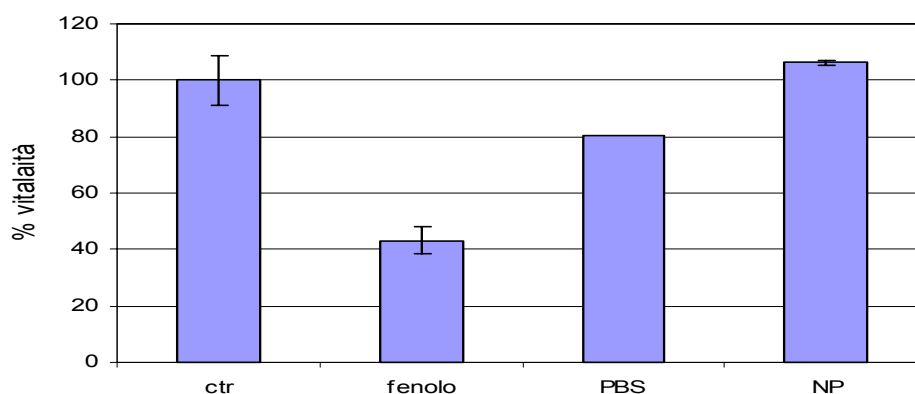


Figura 17. Vitalità delle U-2 OS dopo incubazione con le NP. La percentuale è riferita al controllo incubato con solo terreno (100%).

Valutazione dell'efficacia antiosteolitica

Formazione di cellule giganti multinucleate

Il numero di OC, identificati come le MNC positive per l'anello di actina, è stato significativamente ridotto dopo 3 giorni di incubazione con l'ALE puro a tutte le diluizioni valutate, rispetto alle colture incubate con terreno differenziante ($p = 0,049$). Non sono state osservate differenze significative tra le concentrazioni $0,64 \mu\text{M}$ e $6,4 \mu\text{M}$ di ALE.

Dopo 3 giorni, le NP, sia a base di PLGA-ALE che di PLGA puro, alla concentrazione equivalente a $6,4 \mu\text{M}$ di ALE hanno ridotto in modo significativo il numero di OC rispetto alle colture incubate con terreno differenziante ($p = 0,049$). Non sono state evidenziate differenze significative tra le NP PLGA-ALE a $6,4 \mu\text{M}$ e l'ALE alla medesima concentrazione. Al contrario, il numero di OC in presenza di NP PLGA-ALE a $0,64 \mu\text{M}$ è stato significativamente più alto che in presenza di ALE alla stessa concentrazione ($p=0,049$). Anche le NP PLGA alla concentrazione di $0,64 \mu\text{M}$ non hanno ridotto il numero di OC rispetto alla condizione di controllo (terreno differenziante).

Dopo 7 giorni, l'ALE ha significativamente ridotto il numero di OC a tutte le concentrazioni saggate rispetto alla condizione di controllo ($p=0,049$). Le NP PLGA-ALE hanno ridotto il numero di OC rispetto al controllo ad entrambe le diluizioni ($p=0,049$). È stata comunque osservata una riduzione significativa del numero di OC anche dopo incubazione con le NP PLGA ad entrambe le concentrazioni rispetto al controllo ($p=0,049$) (Fig. 19 e 20).

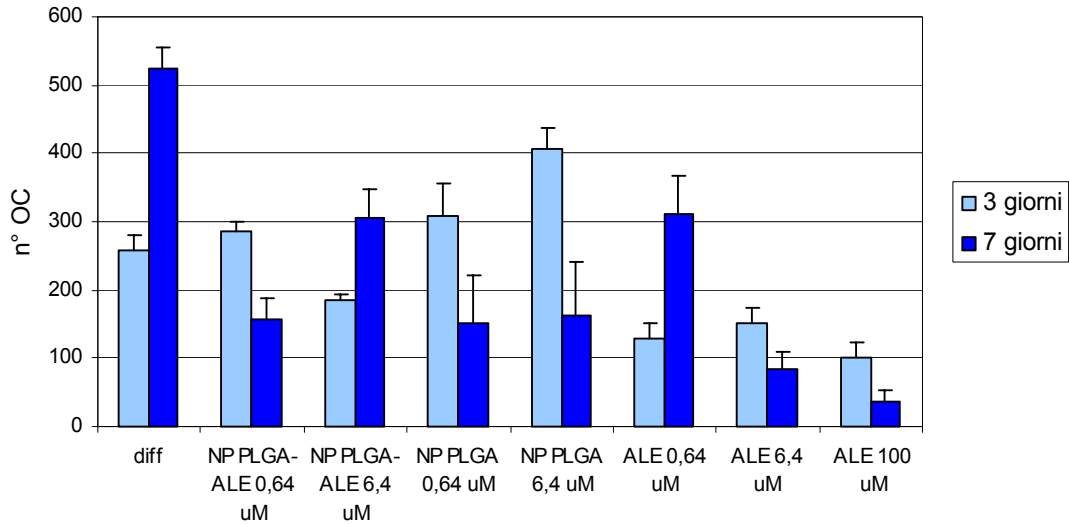


Figura 19. Numero di OC dopo incubazione con NP PLGA-ALE, NP PLGA ed ALE. Le concentrazioni si riferiscono alle quantità di ALE. Le cellule indotte (diff) sono state incubate con terreno differenziante (+ RANKL e M-CSF).

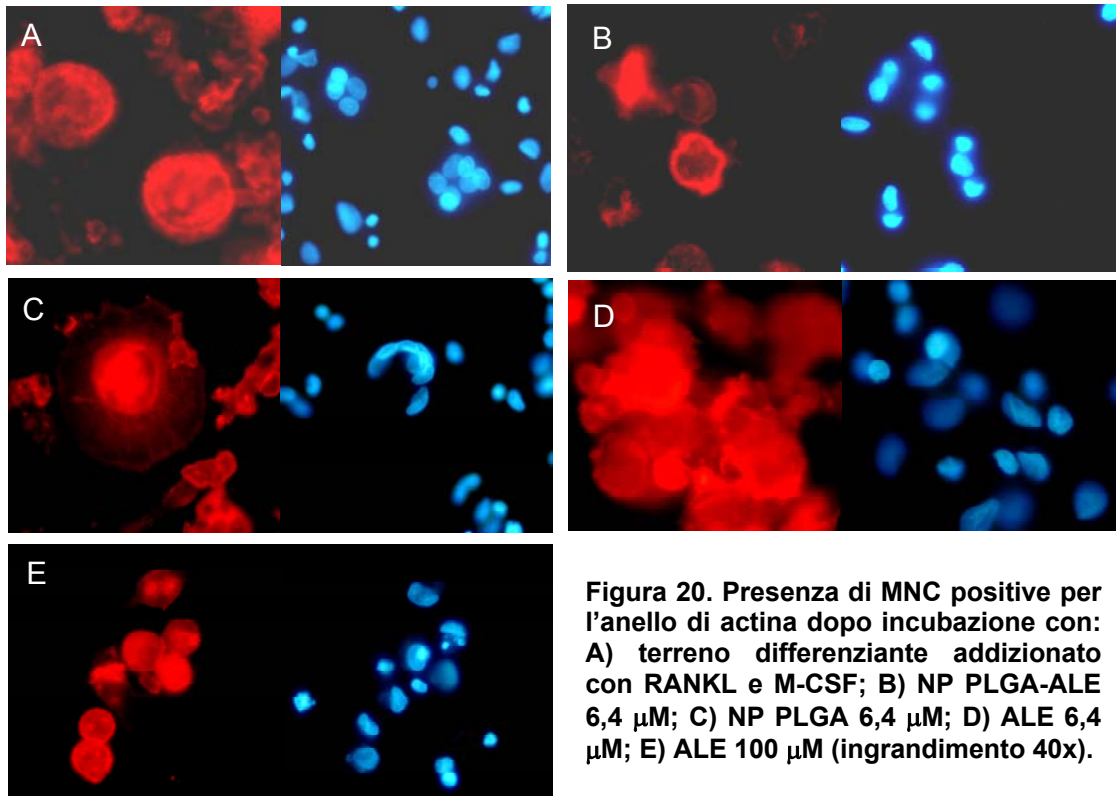


Figura 20. Presenza di MNC positive per l'anello di actina dopo incubazione con: A) terreno differenziante addizionato con RANKL e M-CSF; B) NP PLGA-ALE 6,4 μ M; C) NP PLGA 6,4 μ M; D) ALE 6,4 μ M; E) ALE 100 μ M (ingrandimento 40x).

Induzione dell'apoptosi degli osteoclasti

La presenza di corpi apoptotici è stata utilizzata per valutare l'induzione di apoptosi negli osteoclasti dopo incubazione con le NP. Dopo 3 giorni, l'ALE a tutte le concentrazioni testate ha indotto apoptosi rispetto alla condizione differenziante ($p=0,049$). Le NP PLGA-ALE ad entrambe le diluizioni testate hanno indotto livelli di apoptosi ($p=0,049$), non significativamente diversi rispetto a quelli indotti dall'ALE, e l'effetto pro-apoptotico si è rivelato dose-dipendente. Comunque, è stato osservato un effetto significativo anche a seguito dell'incubazione con NP PLGA ($p=0,0495$).

Dopo 7 giorni, l'incubazione con ALE e NP PLGA-ALE ha indotto una significativa presenza di corpi apoptotici rispetto alla condizione differenziante ($p=0,049$), senza differenze significative tra l'azione dell'ALE e quella delle NP PLGA-ALE. L'effetto pro-apoptotico si è rivelato dose-dipendente per l'ALE ma non per le NP PLGA-ALE. È stata osservata una significativa induzione di apoptosi anche in seguito ad incubazione con le NP PLGA alla concentrazione più alta ($p=0,049$) (Fig. 21 e 22).

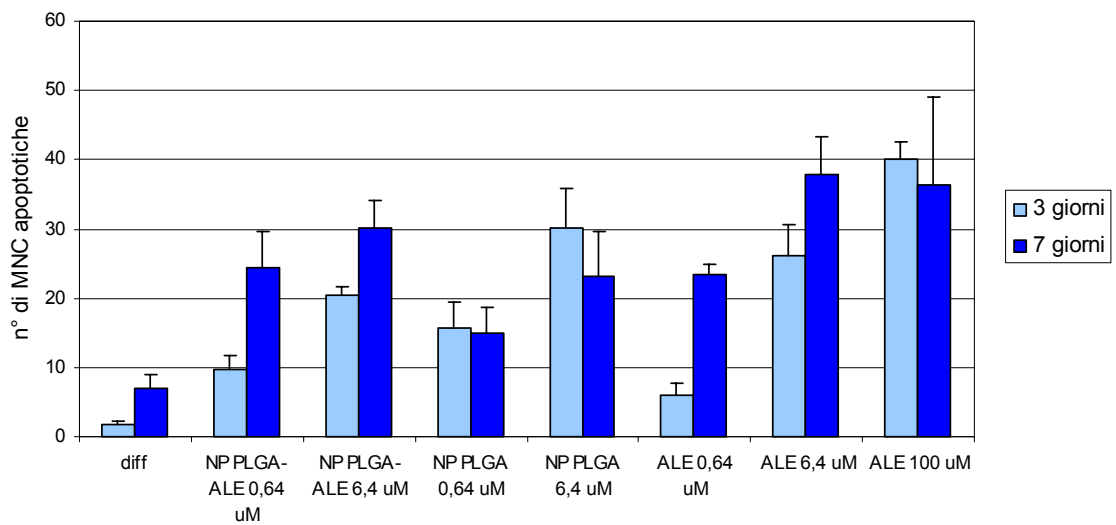


Figura 21. Numero di OC con corpi apoptotici dopo incubazione con NP PLGA-ALE, NP PLGA ed ALE. Le concentrazioni si riferiscono alle quantità di ALE. Le cellule indotte (diff) sono state incubate con terreno differenziante (+ RANKL e M-CSF).

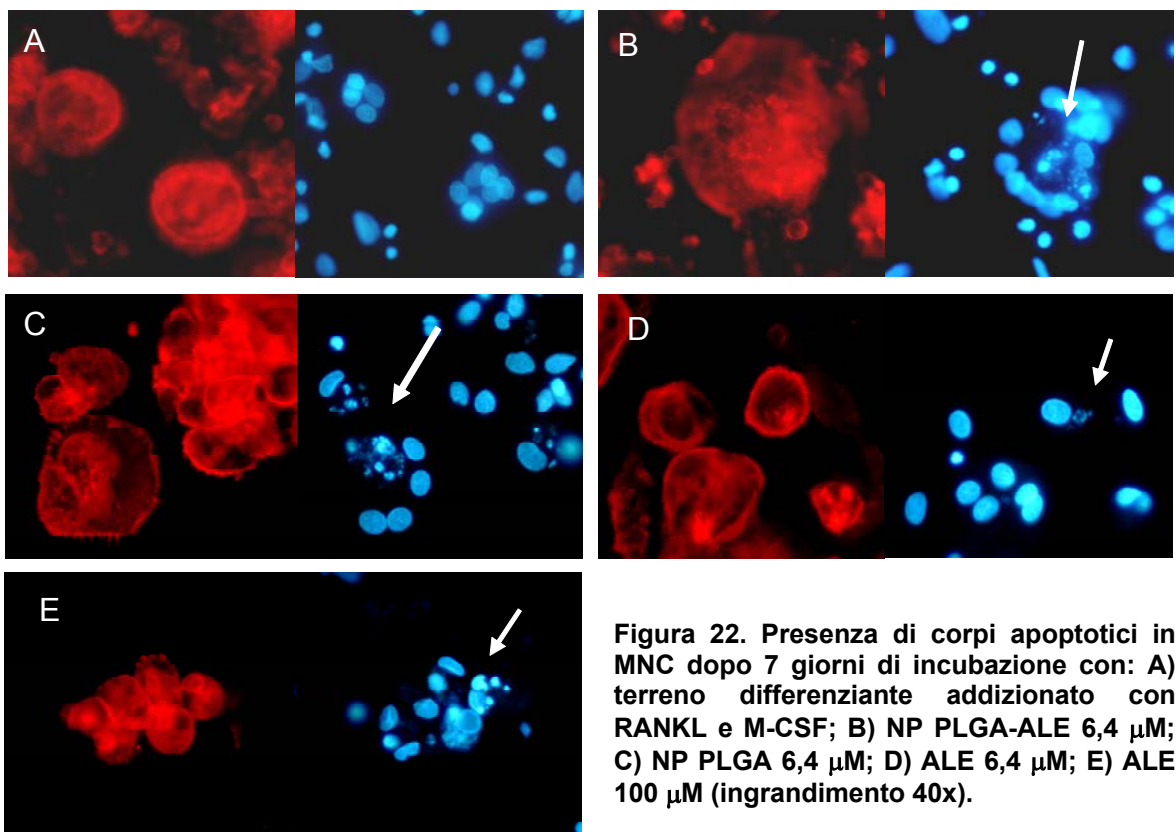


Figura 22. Presenza di corpi apoptotici in MNC dopo 7 giorni di incubazione con: A) terreno differenziante addizionato con RANKL e M-CSF; B) NP PLGA-ALE 6,4 μ M; C) NP PLGA 6,4 μ M; D) ALE 6,4 μ M; E) ALE 100 μ M (ingrandimento 40x).

Inibizione della degradazione del collagene di tipo I

L'incubazione con terreno differenziante (addizionato con RANKL e M-CSF) ha determinato una degradazione del substrato rivestito di collagene di tipo I significativamente più elevata rispetto alla condizione basale (terreno senza additivi) ($p=0,021$).

L'ALE ha inibito la degradazione del collagene alle concentrazioni più elevate ($100 \mu\text{M}$ e $6,4 \mu\text{M}$, $p=0,021$), ma non a quella più bassa. Inoltre, l'ALE $100 \mu\text{M}$ ha significativamente inibito il riassorbimento anche rispetto alle cellule coltivate in terreno non differenziante ($p=0,0209$), indicando che tale concentrazione inibisce anche la formazione spontanea degli OC. L'azione dell'ALE libero era dose-dipendente.

Le NP PLGA-ALE a $6,4 \mu\text{M}$ hanno ridotto significativamente la degradazione del collagene rispetto al terreno differenziante ($p=0,021$), indicando che le NP PLGA-ALE hanno inibito il differenziamento degli OC. Alla concentrazione inferiore ($0,64 \mu\text{M}$), le NP PLGA-ALE non hanno esercitato effetti significativi, ma non vi sono state differenze rispetto agli effetti esercitati dall'ALE a questa concentrazione. La degradazione del collagene dopo incubazione con NP PLGA-ALE $6,4 \mu\text{M}$ è stata significativamente più elevata rispetto ai campioni incubati con ALE alla stessa concentrazione ($p=0,021$), indicando che le NP esercitano una minore inibizione sull'attività di riassorbimento degli OC rispetto all'ALE libero.

Le NP PLGA hanno inibito il riassorbimento in modo significativo a $6,4 \mu\text{M}$ ($p=0,043$), ma non a $0,64 \mu\text{M}$. Come osservato per l'induzione dell'apoptosi, non sono state ad ogni modo riscontrate differenze significative tra gli effetti delle NP a base del coniugato e quelle a base di PLGA puro (Fig. 23).

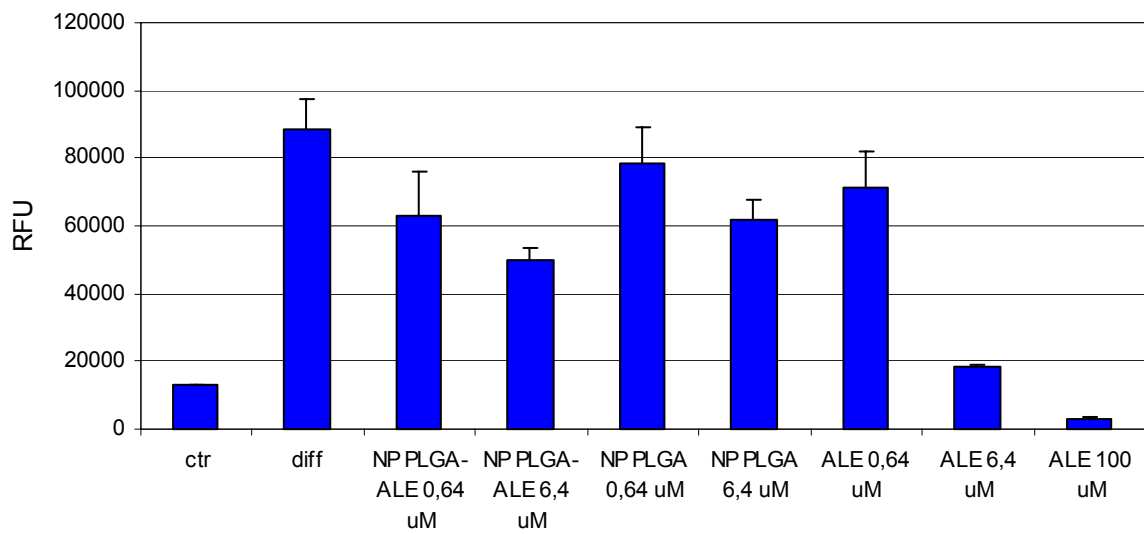


Figura 23. Degradazione collagene umano di tipo I mediata dagli OC dopo incubazione con le NP. Le cellule di controllo (ctr) sono state incubate con terreno, mentre le cellule indotte (diff) sono state incubate con terreno differenziante (addizionato con RANKL e M-CSF).

Valutazione in vitro dell'efficacia nel bone targeting

Affinità delle nanoparticelle per l'idrossiapatite

L'incubazione delle NP PLGA-ALE con l'HA ha indicato un relativo aumento dell'affinità di legame rispetto alle NP a base di PLGA puro. Tale affinità si è dimostrata maggiore all'aumentare del tempo di incubazione e proporzionale alla concentrazione di HA nella sospensione. In particolare, mentre ad una concentrazione di HA di 1 mg/ml non è stato evidenziato aumento in termini di riduzione dell'assorbanza del Oil Red O, e quindi di assorbimento di HA da parte di entrambi i tipi di NP, ad una concentrazione più elevata (5 mg/ml) le NP PLGA-ALE si sono legate all'HA in quantità maggiore rispetto alle NP PLGA, mostrando dopo un'incubazione di 15 e 30 minuti un aumento di affinità rispettivamente del 43% e 50% (Fig. 24).

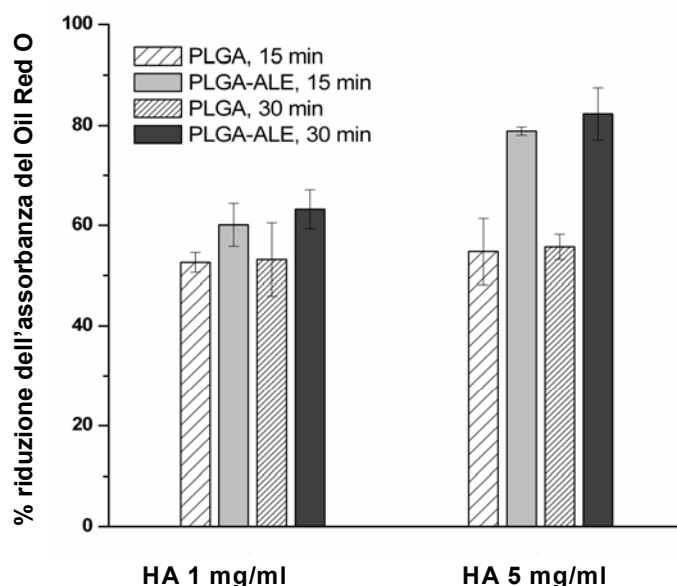


Figura 24. Valutazione dell'affinità di legame per l'HA. I risultati sono espressi come percentuale di riduzione dell'assorbanza del Oil Red O incluso nella preparazione delle NP dopo incubazione con HA rispetto alla soluzione di NP senza HA. I valori di ciascun campione rappresentano la media tra quattro valori sperimentali.

Preparazione di nanoparticelle caricate con il farmaco antineoplastico

Preparazione e caratterizzazione

Le NP-DXR hanno mostrato una distribuzione omogenea ed un basso PI. La preparazione 5 ha esibito i più bassi valori di PI e dimensione (Tab. 8; Fig. 25).

Campione NP	Dimesione media (nm)	PI
1	2312,4	n.d.
2	285,4	0,251
3	323,9	0,194
4	274,6	0,361
5	178,2	0,140

Tabella 8. Dimensione media e PI delle NP PLGA-ALE dopo loading con la DXR.

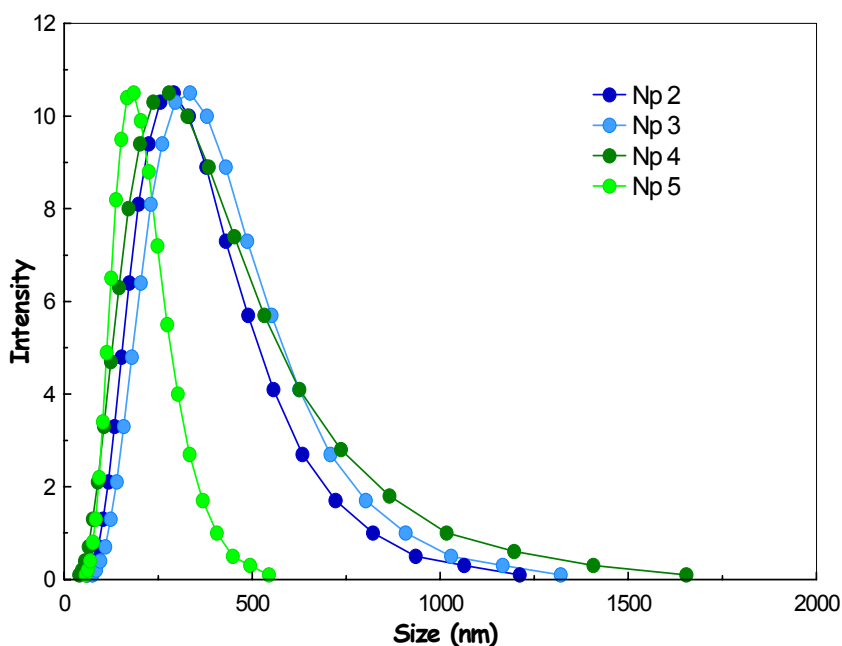


Figura. 25. Distribuzione della dimensione delle NP-DXR preparate come in Tab. 8. La preparazione 1 è stata omessa dal grafico a causa dei valori di dimensione troppo elevati.

Valutazione del legame alla doxorubicina

L'efficienza di incapsulazione delle DXR nelle NP è stata misurata sulle NP-DXR raccolte dopo tre diversi tempi di dialisi e calcolata in base al rapporto percentuale tra la quantità di DXR incorporata e la quantità di DXR iniziale. Lo spettro UV è mostrato in Fig. 26. I tempi di dialisi non hanno influito sull'efficienza di incapsulazione, pari al 61% in tutti i campioni

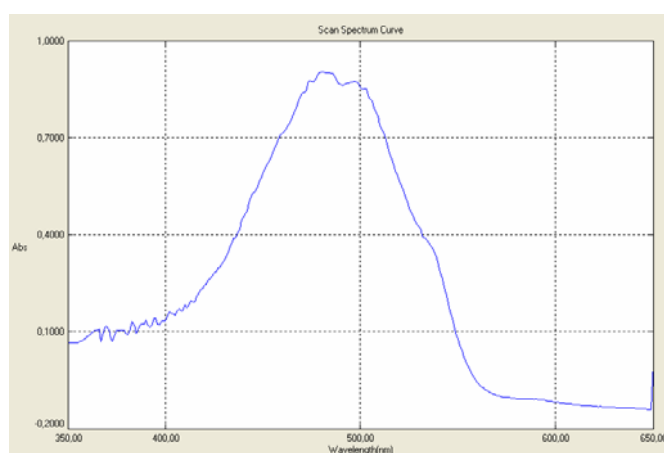


Figura. 26. Spettro UV della DXR. In ascissa è riportata la lunghezza d'onda, in ordinata l'assorbanza.

Sterilizzazione delle nanoparticelle

La sterilizzazione delle NP attraverso filtri a membrana con pori del diametro di 0,45 μm ha determinato una piccola riduzione della dimensione media ed una perdita di campione del 35%. La sterilizzazione delle NP PLGA-ALE mediante irraggiamento con raggi γ (5, 10 o 25 Kgy) ha alterato la dimensione media delle NP in maniera irrilevante (Tab. 9; Fig. 27).

Campione NP PLGA-ALE	Dimensione media (nm)	PI.
Non irradiate	287,8	0,180
Irraggiamento 5 KGy	269,3	0,185
Irraggiamento 10 KGy	268,4	0,161
Irraggiamento 25 KGy	267,3	0,132

Tabella 9. Variazione della dimensione media e PI delle NP PLGA-ALE dopo sterilizzazione con raggi γ .

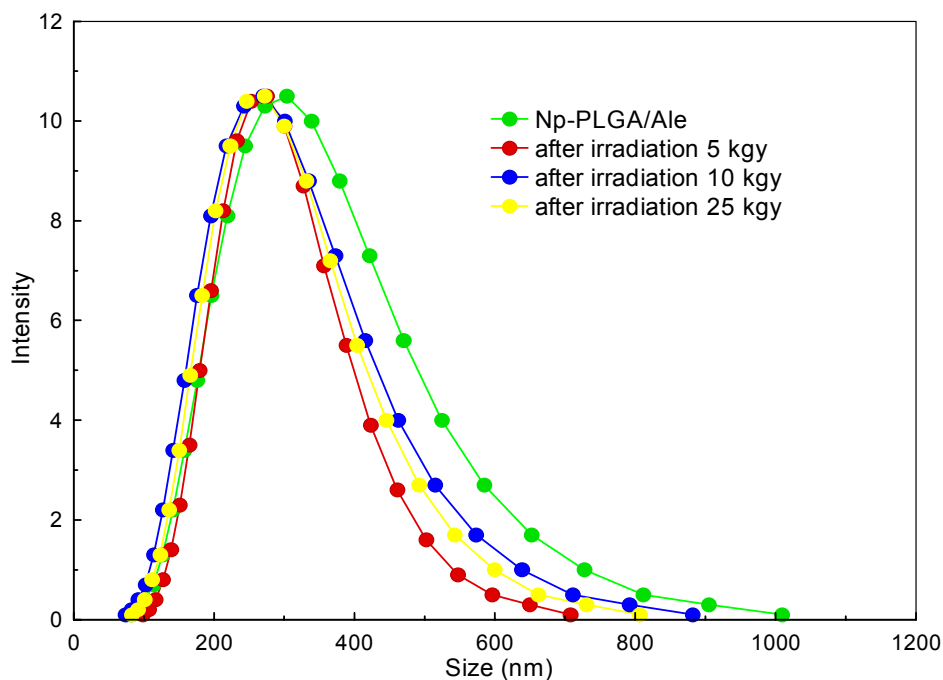
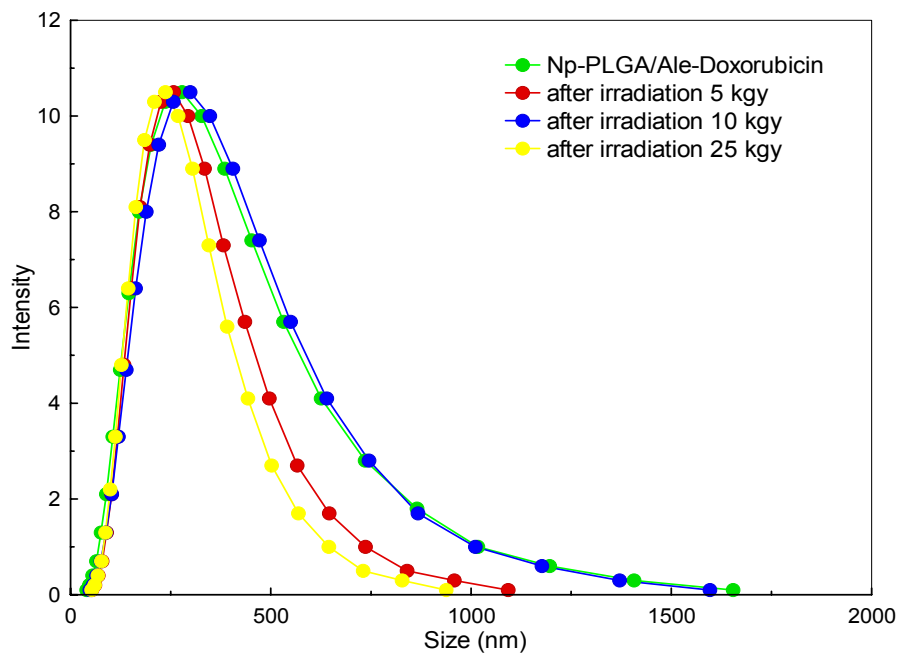


Figura. 27. Curva gaussiana della distribuzione della dimensione delle NP PLGA-ALE dopo sterilizzazione con raggi γ .

La sterilizzazione delle NP-DXR mediante irraggiamento non ha alterato significativamente la dimensione media ed il PI delle NP-DXR (Tab. 10; Fig. 28), come già osservato per le NP PLGA-ALE.

Campione NP-DXR	Dimensione media (nm)	PI
Non irradiate	274,6	0,361
Irraggiamento 5 KGy	247,6	0,264
Irraggiamento 10 KGy	350,1	0,335

Tabella 10. Variazione della dimensione media e PI delle NP-DXR dopo sterilizzazione con raggi γ .



Allo

Figura. 28. Curva gaussiana della distribuzione della dimensione delle NP-DXR dopo sterilizzazione con raggi γ .

stesso modo, la sterilizzazione delle NP PLGA con entrambi i metodi ne ha alterato la dimensione media in modo non significativo, senza influire sul PI (dati non mostrati).

Valutazione *in vitro* dell'efficacia delle nanoparticelle caricate con doxorubicina

Uptake della doxorubicina incapsulata alle nanoparticelle

La sospensione cellulare delle U-2 OS, incubata a 37°C con 10 µg/ml e 50 µg/ml di DXR, è stata osservata a tutti gli end-points per valutare il pattern di distribuzione intracellulare del farmaco. L'uptake nucleare selettivo, tipico delle cellule DXR-sensibili, è stato osservato in più del 90% delle cellule già dopo 30 minuti di incubazione a entrambe le concentrazioni. La vitalità cellulare dopo esposizione alla DXR è sempre stata maggiore del 90%. Un'incubazione a 37°C per 30 minuti con 10 µg/ml è stata quindi fissata come condizione ottimale per dimostrare l'incorporazione del farmaco. L'uptake della DXR incapsulata alle NP è stato perciò valutato incubando le U-2 OS a 37°C per 30 minuti con le NP-DXR ad una concentrazione equivalente a 10 µg/ml di DXR libera (Fig. 29A). In queste condizioni, l'uptake delle NP-DXR ha mostrato un pattern di localizzazione nucleare analogo a quello del farmaco libero. La DXR è infatti localizzata nel nucleo, come dopo incubazione con le NP-DXR, ma in quest'ultimo caso sono visibili clusters di NP all'interno del citoplasma, presumibilmente dovuti al loro accumulo all'interno di vacuoli (Fig. 29B). L'analisi delle sezioni cellulari ottenute dalla microscopia confocale conferma la localizzazione intracellulare di tali clusters.

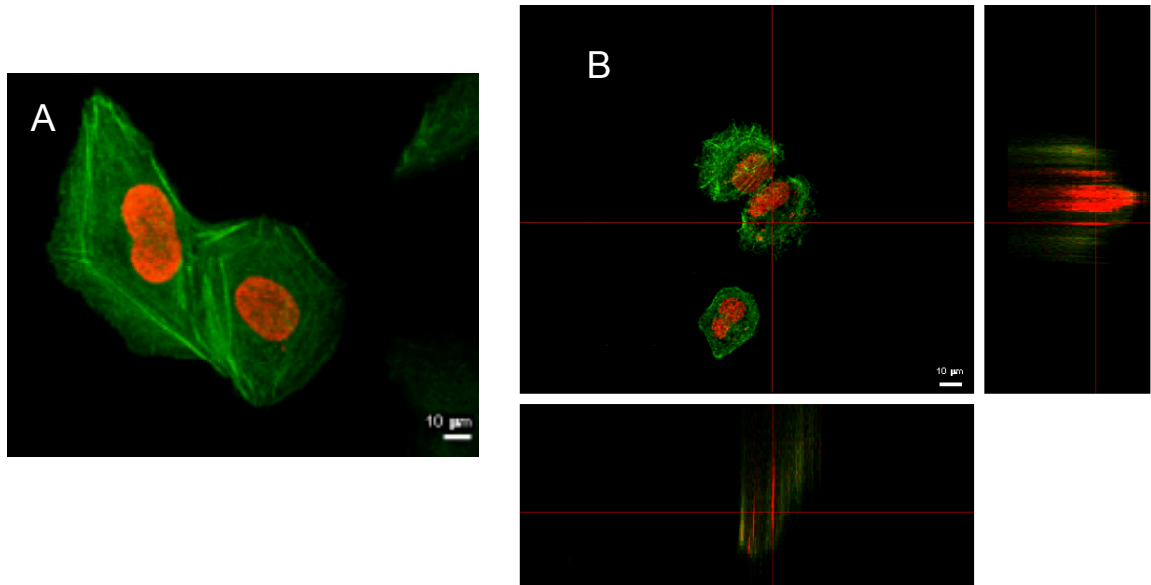


Figura 29. Distribuzione intracellulare della DXR libera (A) e delle NP-DXR (B) in cellule U-2 OS dopo esposizione per 30 minuti a 37°C ad una concentrazione di 10 µg/ml (ingrandimento 60x).

Dopo un'incubazione di 24 ore delle cellule U-2 OS con una concentrazione di NP-DXR equivalente a 580 ng/ml di DXR libera è stato osservato un simile pattern di uptake simile per il farmaco libero (immagine non riportata) e per quello incapsulato nelle NP (Fig. 30).

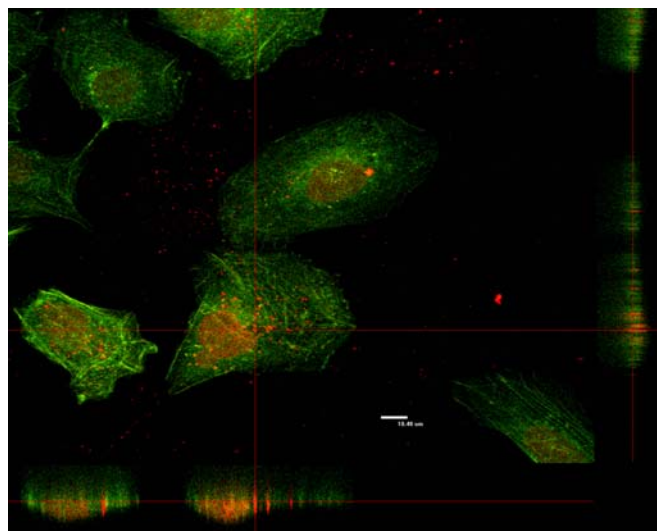


Figura 30. Distribuzione intracellulare delle NP-DXR in cellule U-2 OS dopo esposizione per 24 ore a 37°C ad una concentrazione equivalente a 580 ng/ml di DXR libera (ingrandimento 60X).

Le altre linee cellulari, incubate con la DXR libera (immagini non riportate) e con le NP-DXR alle condizioni descritte sopra, hanno riportato un pattern di uptake confrontabile con quello delle U-2 OS (Fig. 31 A-E). L'unica eccezione è costituita dalle ACHN in cui, nonostante fosse visibile la localizzazione nucleare della DXR libera, è stato possibile osservare solamente clusters citoplasmatici di NP-DXR .

Inibizione della proliferazione delle cellule neoplastiche

Negli esperimenti preliminari, la proliferazione di tutte le linee cellulari utilizzate nello studio è stata inibita già alla concentrazione di 58 ng/ml di DXR (dati non mostrati). Le NP-DXR sono state successivamente testate a concentrazioni equivalenti a 5,8, 58 e 580 ng/ml dopo sterilizzazione per filtrazione, e la vitalità cellulare confrontata con quella delle cellule di controllo, incubate con il solo terreno completo, la cui proliferazione è stata assunta pari al 100%. I controlli incubati con PBS o NP PLGA-ALE hanno mostrato una vitalità del 100% (dati non mostrati). L'efficacia delle NP-DXR sterilizzate ai raggi gamma è stata inoltre confrontata con i risultati ottenuti.

La proliferazione delle U-2 OS è stata significativamente inibita per il 72% alla concentrazione di 58 ng/ml ($p=0,0002$). Questo valore è confrontabile con quello ottenuto per effetto della stessa concentrazione di farmaco libero (74%) ($p=0,0002$). Alla concentrazione più alta, è stata osservata una percentuale di inibizione del 78,6% per la DXR, e 79,4% per le NP-DXR ($p=0,0002$).

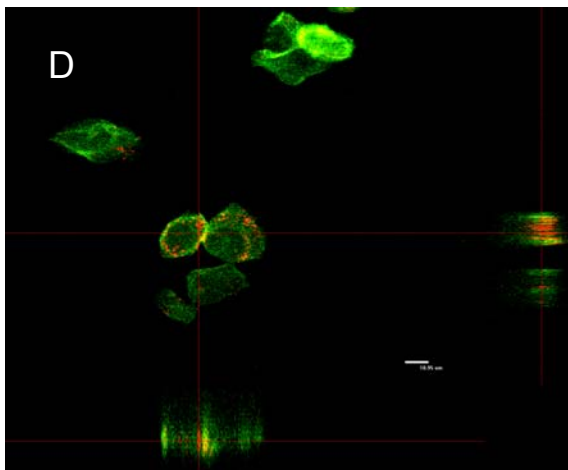
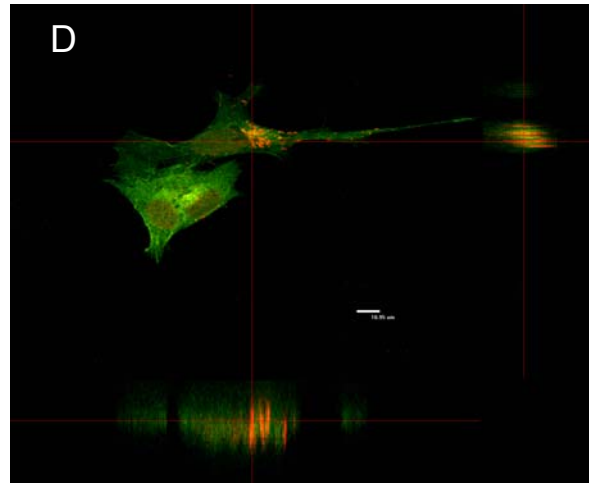
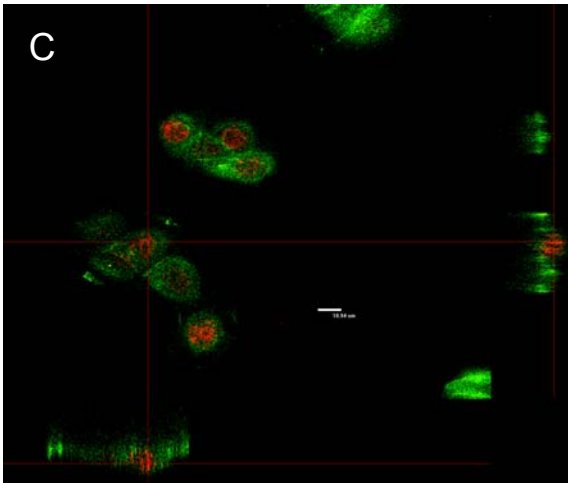
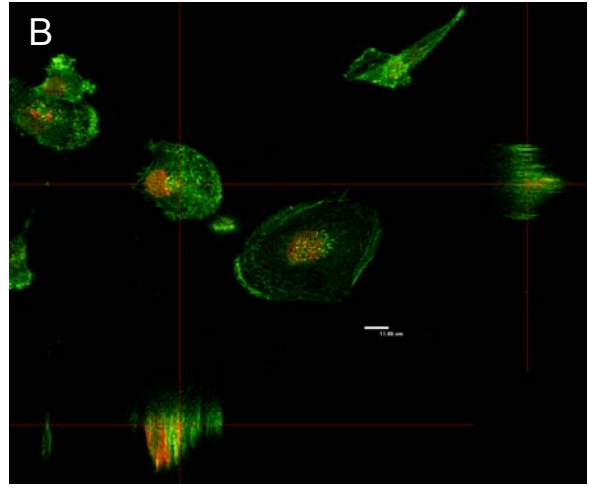
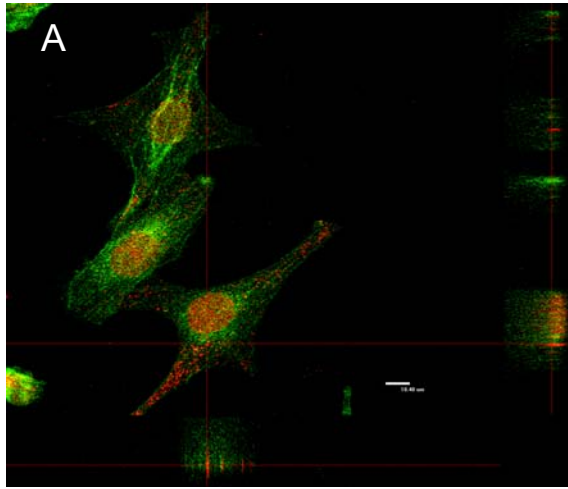


Figura 31. Distribuzione intracellulare delle NP-DXR in cellule: A) Saos-2; B) MDA-MB-321; C) MCF7; D) SH-SY5Y; E) ACHN. L'incubazione è stata eseguita a 37°C per 24 ore ad una concentrazione equivalente a 580 ng/ml di DXR libera (ingrandimento 60x).

Non sono state osservate differenze significative tra l'efficacia della DXR e quella delle NP-DXR a tutte le concentrazioni testate. Simili risultati sono stati ottenuti con le NP-DXR sterilizzate ai raggi gamma (Fig. 32).

Dopo incubazione con 58 e 580 ng/ml di DXR è stato osservato rispettivamente il 34,1% ($p = 0,0104$) e il 55,3% ($p = 0,0065$) di

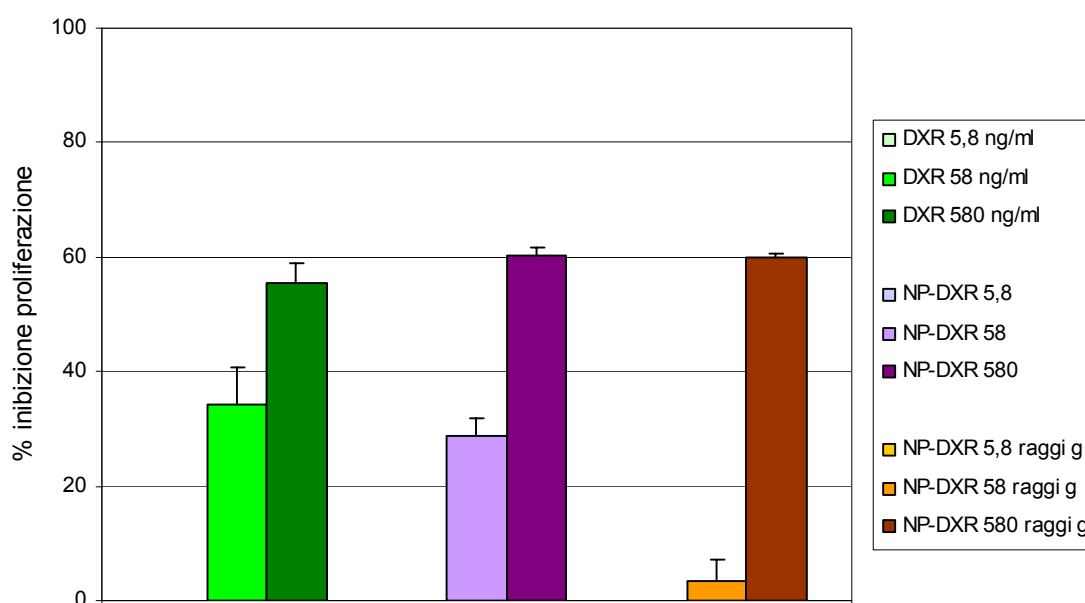


Figura 32. Percentuale di inibizione della proliferazione rispetto al controllo di cellule U-2 OS dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DXR o NP-DXR per 48 ore.

inibizione della proliferazione delle cellule Saos-2. E' stata osservata un'inibizione significativa della proliferazione dopo incubazione con la concentrazione più alta di NP-DXR (60,2%; $p=0,0039$), ma solo del 28,9% alla concentrazione di 58 ng/ml. Non sono comunque state osservate differenze significative tra l'efficacia della DXR e quella delle NP-DXR. Sia la DXR che le NP-DXR non hanno avuto effetti sulla proliferazione delle Saos-2 alla concentrazione più bassa (5,8 ng/ml). Dopo sterilizzazione ai raggi gamma è stato osservato un effetto inferiore delle NP-DXR a 58 ng/ml, mentre simili risultati sono stati ottenuti a 580 ng/ml (Fig. 33).

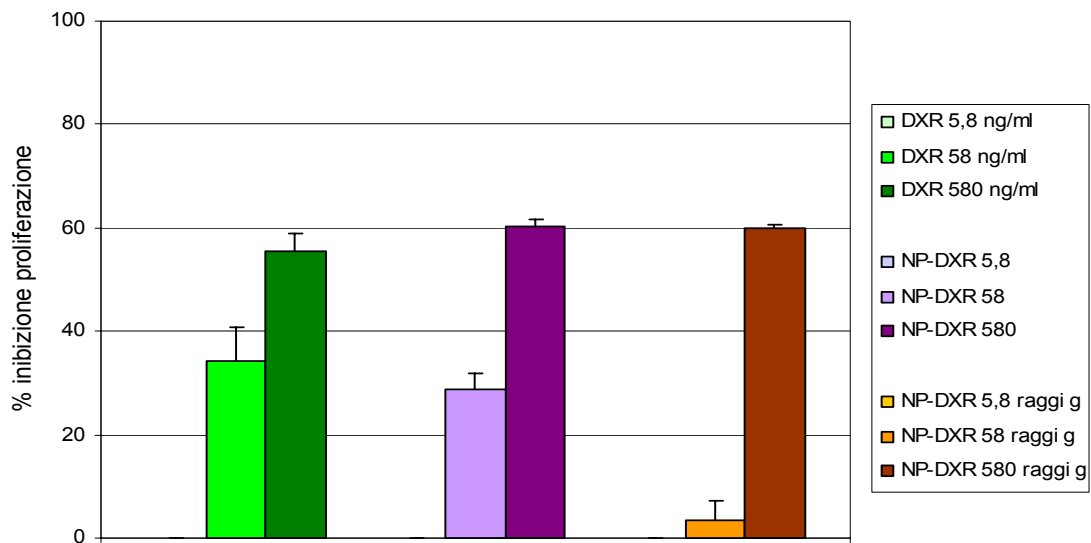


Figura 33. Percentuale di inibizione della proliferazione rispetto al controllo di cellule Saos-2 dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DXR o NP-DXR per 48 ore.

La proliferazione delle cellule MDA-MB-231 è stata inibita del 65,3% rispetto al controllo dopo incubazione con DXR 58 ng/ml ($p=0,0039$), e in modo simile dopo incubazione con NP-DXR alla stessa concentrazione (51,7%; $p=0,0039$). Alla concentrazione più elevata, la percentuale di inibizione è stata inibita rispettivamente del 78,2% e 67,8% ($p=0,0039$). Non sono state osservate differenze

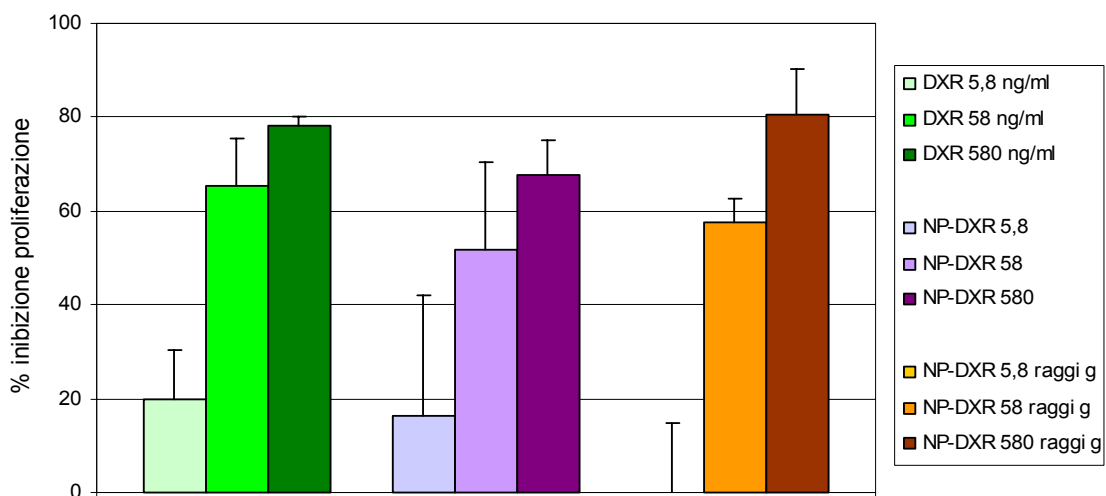


Figura 34. Percentuale di inibizione della proliferazione rispetto al controllo di cellule MDA-MB-231 dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DXR o NP-DXR per 48 ore.

significative tra l'efficacia della DXR e quella delle NP-DXR a tutte le concentrazioni testate. Simili risultati sono stati ottenuti con le NP-DXR sterilizzate ai raggi gamma (Fig. 34).

La proliferazione delle cellule MCF7 è stata inibita del 60% rispetto al controllo dopo incubazione con DXR 58 ng/ml ($p = 0,0103$). Al contrario, le NP-DXR alla stessa concentrazione non hanno inibito significativamente la proliferazione cellulare (percentuale di inibizione: 46,9%). La percentuale di inibizione era significativamente inferiore rispetto a quella indotta dalla DXR ($p=0,0161$). Alla concentrazione più elevata, sia la DXR che le NP-DXR hanno inibito significativamente la proliferazione (79,3% e 83,1% rispettivamente; $p=0,0039$). Dopo sterilizzazione ai raggi gamma è stato osservato un effetto inferiore delle NP-DXR, eccetto che alla concentrazione più elevata (Fig. 35).

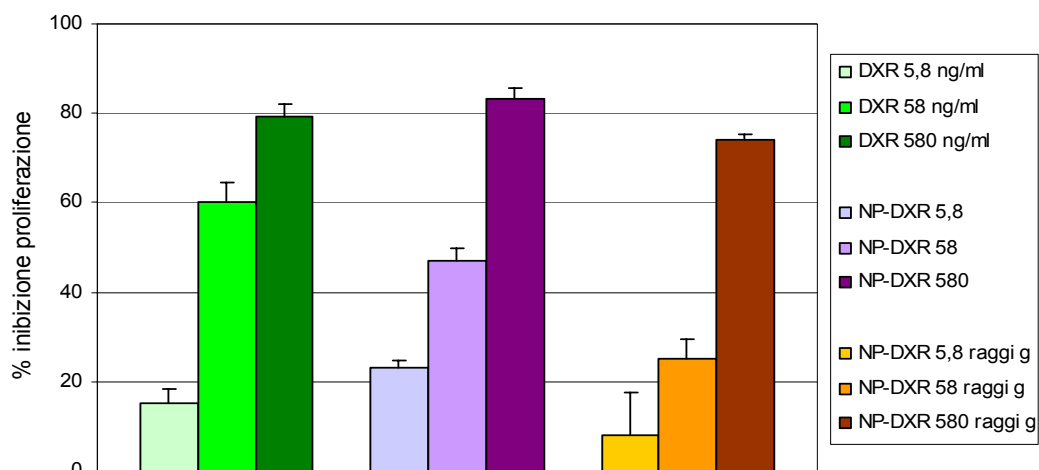


Figura 35. Percentuale di inibizione della proliferazione rispetto al controllo di cellule MCF7 dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DXR o NP-DXR per 72 ore.

La proliferazione delle cellule SH-SY5Y non è stata influenzata dall'incubazione con la DXR o con le NP-DXR alla concentrazione più bassa, mentre la concentrazione di 58 ng/ml ha esercitato un'inibizione inferiore al 20%, sia per il farmaco libero che per quello legato alle NP. Solo a 580 ng/ml è stato osservato un effetto significativo: è stata calcolata una percentuale di inibizione del 76,3% (DXR) e 64,5% (NP-DXR) ($p=0,0039$). Non sono state però osservate differenze significative tra l'efficacia della DXR e quella delle NP-DXR a tutte le concentrazioni testate. Simili risultati sono stati ottenuti con le NP-DXR sterilizzate ai raggi gamma (Fig. 36).

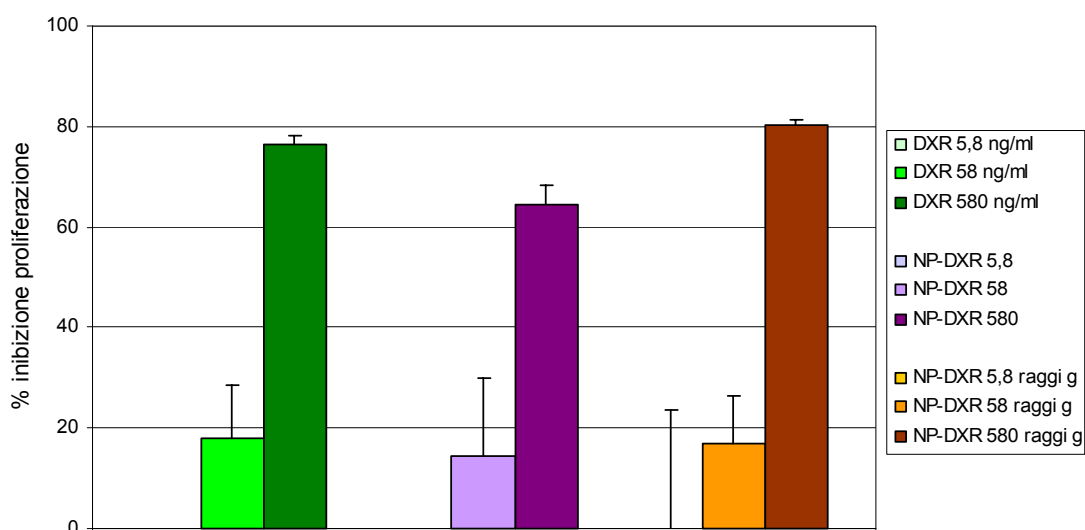


Figura 36. Percentuale di inibizione della proliferazione rispetto al controllo di cellule SH-SY5Y dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DXR o NP-DXR per 48 ore.

La proliferazione delle cellule ACHN dopo incubazione con 58 e 580 ng/ml di DXR è stata inibita rispettivamente del 55,9% e del 78,2% ($p=0,0039$). Al contrario, le NP-DXR a 58 ng/ml hanno ridotto la proliferazione solo del 7,5%. Inibizione significativa è stata osservata alla concentrazione più elevata di NP-DXR, che ha ridotto

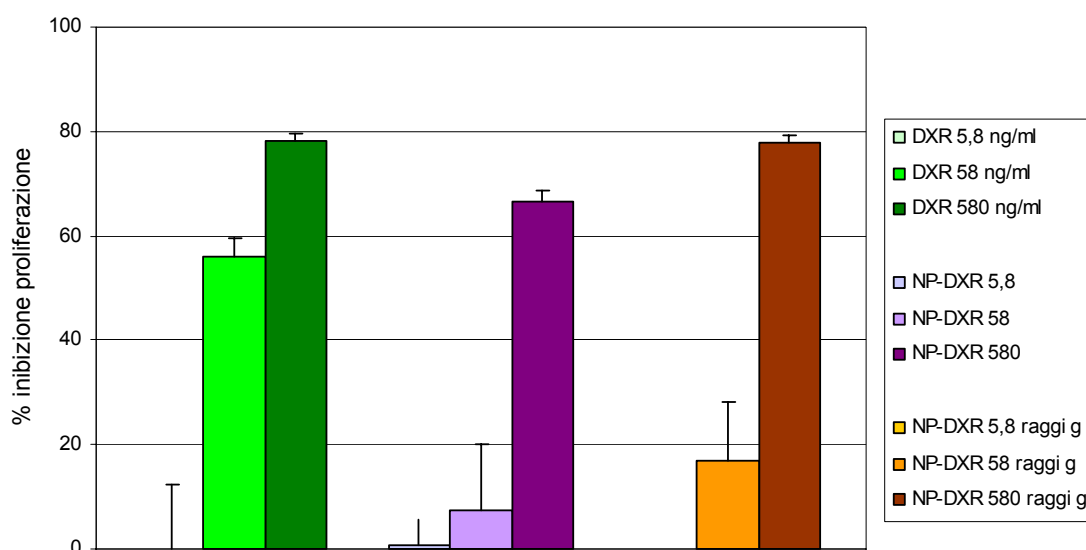


Figura 37. Percentuale di inibizione della proliferazione rispetto al controllo di cellule ACNH dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DXR o NP-DXR per 48 ore.

la proliferazione del 66,6% ($p=0,0039$). L'efficacia delle NP-DXR è stata perciò significativamente minore rispetto a quella della DXR a 58 ng/ml ($p=0,0039$), ma non a 580 ng/ml. Simili risultati sono stati ottenuti con le NP-DXR sterilizzate ai raggi gamma (Fig. 37).

Valutazione dell'efficacia in vivo

Inibizione dell'incidenza di metastasi osteolitiche

Il trattamento con la DXR, sia libera che incapsulata nelle NP, è in grado di ritardare lo sviluppo e ridurre l'incidenza delle metastasi osteolitiche rispetto al trattamento con il PBS (veicolo). Il trattamento con la DXR libera alle concentrazioni 0,2 mg/Kg e 1 mg/Kg ha mostrato una maggiore capacità di inibizione dell'induzione delle metastasi rispetto alle NP PLGA-ALE (prive di farmaco). Il massimo livello di riduzione dell'incidenza delle lesioni si è verificato però nel gruppo trattato con le NP-DXR. È possibile inoltre osservare che le NP-DXR si sono dimostrate efficaci già alla concentrazione inferiore (0,2 mg/Kg; Fig. 38A), e l'aumento della dose non ha comportato alcun miglioramento (Fig. 38B).

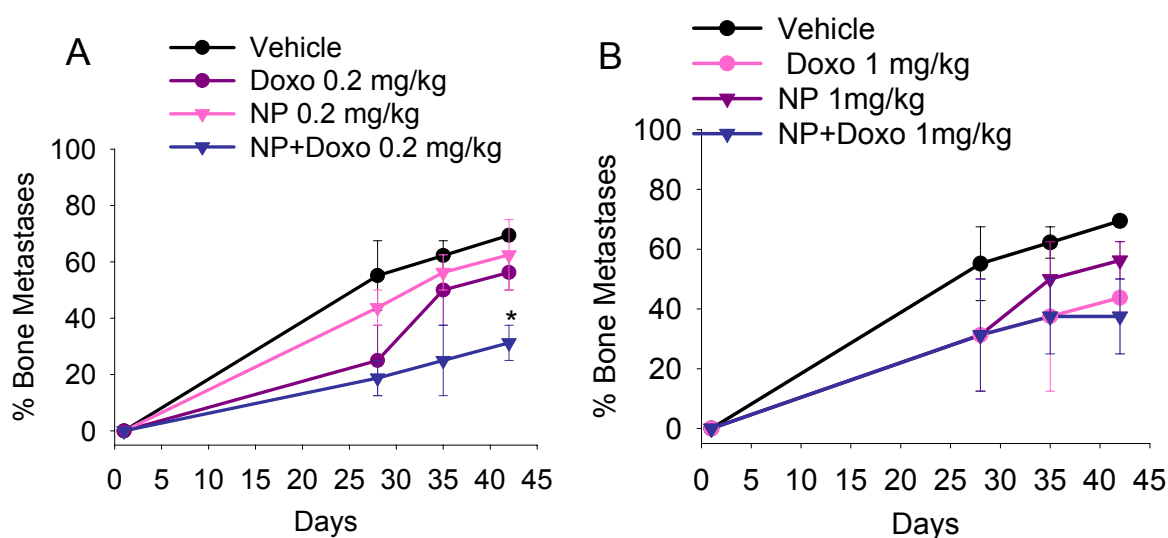


Figura 38. Percentuale d'incidenza di metastasi osteolitiche in topi BALB/c-nu/nu dopo trattamento con 0,2 mg/Kg (A) o 1 mg/Kg (B) di DXR e l'equivalente di NP-DXR e NP PLGA-ALE. Il gruppo di controllo è stato trattato con PBS (veicolo). *0,05<p<0,01

Valutazione dell'area osteolitica

L'effetto dei trattamenti è stato valutato mediante analisi istologica anche sull'estensione dell'area delle lesioni tumorali che si sono sviluppate. In particolare, la somministrazione della DXR, sia singola che incapsulata, ha ridotto l'area tumorale in maniera dose-dipendente. Non è stato osservato invece nessun effetto dopo trattamento NP PLGA-ALE alla dose inferiore, mentre alla dose più alta è stata osservata una lieve riduzione dell'area osteolitica, comunque non significativa (Fig 39).

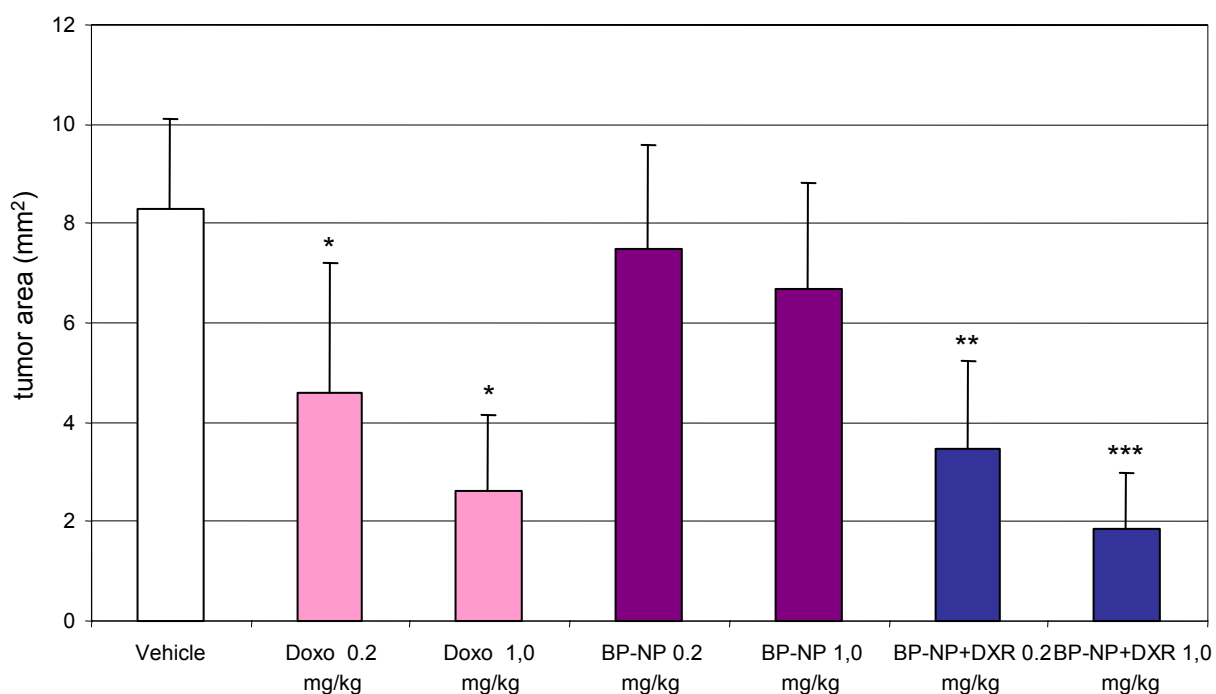


Figura 39. Estensione dell'area tumorale valutata mediante analisi d'immagine su sezioni di tibia.* 0,05<p<0,01; ** 0,01<p<0,005; * 0,005<p<0,001**

Valutazione del numero di osteoclasti

Per quanto riguarda l'analisi della popolazione osteoclastica, valutata mediante conta del numero di OC TRAP+ presenti nelle sezioni istologiche in corrispondenza delle lesioni osteolitiche, è

possibile osservare una riduzione del numero degli OC in seguito a tutti e tre i trattamenti rispetto al controllo (Fig. 40). Tale riduzione è risultata significativa alla concentrazione più elevata in presenza di NP PLGA-ALE e NP-DXR, suggerendo che la presenza dell'ALE eserciti degli effetti antiosteolitici più potenti.

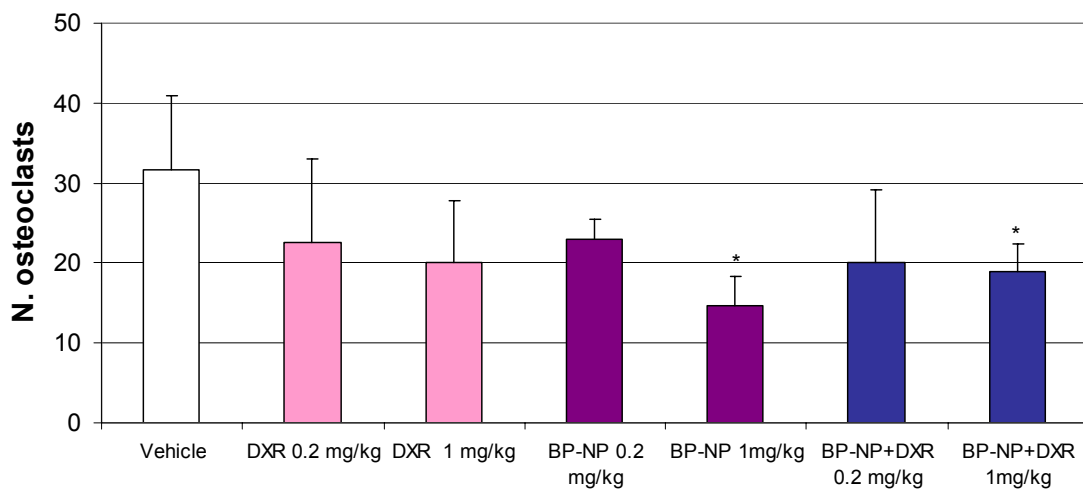


Figura 37. Numero di OC TRAp-positivi presenti in corrispondenza delle lesioni osteolitiche valutati istologicamente su sezioni di tibia. * 0,05<p<0,01

DISCUSSIONE

Il copolimero acido polilattico e poliglicolico in rapporto 50:50 (PLGA, Resomer 502 H) è stato utilizzato in questo studio per la sintesi di nanoparticelle osteotropiche per il trasporto della doxorubicina, per via della sua biodegradabilità e capacità di formare strutture nanoparticellari applicando tecniche semplici e biocompatibili (Astete CE et al, 2006). La composizione monomerica del Resomer 502 H permette di assicurare un tempo di circolazione nel corpo umano relativamente lungo, fino a 60 giorni (Cutright DE et al, 1974), sufficiente affinché la molecola osteotropica (BP) possa raggiungere il tessuto osseo. Le sue proprietà chimico-fisiche, come lo 'swelling' (aumento di volume dovuto all'adsorbimento del solvente) e la cinetica di degradazione o il potenziale d'interazione con il farmaco trasportato, offrono molte possibilità nel design di sistemi di rilascio controllato. Queste caratteristiche sono strettamente definite dalle proprietà strutturali come la composizione del copolimero, il peso molecolare e la natura delle catene terminali. Per conferire specificità di targeting al preparato è stato selezionato l'alendronato. La molecola di questo BP, infatti, presenta un gruppo amminico libero che permette un legame ammidico forte con il gruppo carbossilico libero del Resomer 502 H. La nota resistenza dei legami ammidici all'idrolisi enzimatica nel plasma ha fornito un'ulteriore motivazione per la scelta di questi due composti, il Resomer 502 H e l'alendronato: la formazione di questo legame permette al coniugato di giungere perfettamente intatto al tessuto bersaglio.

Il PLGA è stato coniugato con l'alendronato per raggiungere in modo unico e specifico le aree del tessuto osseo soggette ad

intensa osteolisi. La coniugazione di polimeri idrosolubili con molecole che possiedono affinità per l'idrossiapatite ossea, come i bisfosfonati o gli acidi glutammico/aspartico, è uno degli approcci chimici più utilizzati. Questi sistemi di rilascio migliorano la farmacocinetica delle molecole coniugate. L'alendronato è stato recentemente coniugato con PLGA modificato mediante l'aggiunta di PEG per il trasporto di estrogeni nel trattamento dell'osteoporosi (Choi SW et al, 2007). Nanosfere a base di PLGA e BP sono state proposte per altri trattamenti, ad esempio l'inibizione dei monociti/macrofagi nella restenosi arteriosa (Cohen-Sela E et al, 2006).

La coniugazione del BP non dovrebbe alterare la nota biocompatibilità del PLGA. Infatti, l'alendronato è correntemente utilizzato nella terapia delle malattie osteolitiche senza effetti collaterali rilevanti sia sui componenti ematici che sull'endotelio (Lyles KW et al, 2001). Gli unici effetti talvolta osservati in seguito al suo impiego sono stati una leucopenia transitoria ed un aumento dell'espressione di alcune citochine da parte delle cellule plasmatiche mononucleari (Pietschmann P et al, 1998). Sul coniugato sono stati in ogni caso eseguiti saggi preliminari di biocompatibilità, in particolare di emocompatibilità e di citotossicità, per escludere eventuali effetti dannosi che ne avrebbero precluso l'ulteriore utilizzo per l'allestimento delle NP. In queste prove, il coniugato è stato saggiato come soluzione in DMSO. Ovviamente, le NP, una volta preparate, sono state sospese in soluzione acquosa (PBS) e sotto questa forma sono state valutate in tutte le prove successive.

I risultati non hanno evidenziato effetti emolitici indotti dal coniugato PLGA-ALE. Infatti, l'incubazione di eritrociti freschi con il coniugato

ha causato livelli di emolisi simili a quelli riscontrati nel controllo negativo, costituito dagli eritrociti incubati in PBS.

La fase plasmatica della coagulazione è stata valutata misurando l'attività protrombinica (PT) ed il tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT). Quest'ultimo valuta la fase intrinseca della coagulazione, mentre il PT valuta la fase estrinseca. Entrambi i metodi hanno una sensibilità molto elevata nel rilevare difetti della coagulazione, ma piuttosto bassa per quanto riguarda un eventuale stato trombofilico. Quest'ultimo viene di solito indagato attraverso analisi più complesse. In questa fase preliminare dello studio, però, è stato interesse principale valutare un'eventuale inibizione della coagulazione, piuttosto che il fenomeno inverso, che è stato indagato in seguito in relazione alle NP. È stato dimostrato quindi in via preliminare che il coniugato non determina alcuna alterazione della fase plasmatica della coagulazione alle diluizioni saggiate.

Le analisi per valutare la citotossicità del coniugato sono state effettuate sulle cellule endoteliali, poiché le NP giungono nei tessuti bersaglio attraverso l'endotelio, e sugli osteoblasti, poiché ovviamente non devono essere danneggiati dall'azione delle NP. È stato perciò ritenuto opportuno valutare gli effetti del materiale di partenza prima della preparazione delle NP. Il test del rosso neutro ha escluso effetti citotossici sia sulle HUVEC che sugli HOB trabecolari.

Visti i buoni risultati ottenuti con il coniugato PLGA-ALE, è stata eseguita la sintesi delle NP. La caratterizzazione chimico-fisica è stata effettuata in termini di dimensione media, omogeneità di dimensione (PI) e carica di superficie (potenziale ζ). L'analisi al microscopio elettronico a scansione, utile per osservare la morfologia delle NP, ha evidenziato un aspetto rotondeggiante, con

superficie liscia e priva di pori, al pari di altre NP a base di PLGA già descritte in letteratura (Feng S et al, 2004). La misura del diametro medio ha rivelato dimensioni maggiori rispetto ad altre NP di PLGA (Kim D et al, 2005), ed un simile potenziale ζ . Quest'ultimo valore, inoltre, non si è discostato molto da quello delle NP a base di PLGA puro. Ciò suggerisce che le molecole di alendronato presenti nello scheletro del polimero siano omogeneamente distribuite nella matrice delle NP e non orientate principalmente verso la superficie. La procedura per la preparazione delle NP potrebbe alterare la biocompatibilità del materiale di partenza, a causa della dimensione nanometrica del costrutto finale. In particolare, l'enorme aumento del rapporto superficie/volume può causare effetti collaterali inaspettati, anche quando si utilizza un materiale di partenza altamente biocompatibile (Medina C et al, 2007). L'attività biologica delle NP dipende da alcuni parametri chimico-fisici (dimensione, stato di agglomerazione, forma, composizione chimica, carica di superficie e porosità) che normalmente non sono considerati negli screening di tossicità convenzionali (Borm PJ et al 2006). L'adsorbimento di proteine può essere causa di interazione con le piastrine, i fattori di coagulazione ed il complemento, e può causare il riconoscimento delle NP da parte del sistema immunitario. Tutti questi fenomeni contribuiscono alla riduzione dell'emivita delle NP nel circolo sistemico. Inoltre, le NP possono attivare eventi molecolari che controllano l'infiammazione (Brown DM et al, 2004). Per tali motivi è stata effettuata un'analisi approfondita della biocompatibilità delle NP, attraverso saggi per l'esclusione di qualunque effetto indesiderato sui sistemi biologici con cui si prevede che esse entreranno in contatto dopo la somministrazione, primo di tutti il sangue. Un corpo estraneo può danneggiare gli

eritrociti, i leucociti o le piastrine, oppure alterare le proteine plasmatiche. I saggi di emocompatibilità hanno dimostrato l'assenza di reazioni di emolisi, dopo contatto di sospensioni di eritrociti freschi con le NP. Le alterazioni dei leucociti, causate da materiali estranei, possono determinare una riduzione delle difese contro le infezioni o alterare la risposta immunitaria. Gli esperimenti hanno però escluso modificazioni sia del numero totale dei leucociti che di ogni singola sottopopolazione (neutrofili, eosinofili, linfociti, monociti). L'attivazione delle piastrine, e quindi l'insorgenza di fenomeni trombotici, può essere un'altra conseguenza della presenza nel sangue di un materiale artificiale. E' stata valutata perciò la reazione di rilascio del PF4, un fattore contenuto negli α -granuli delle piastrine e rilasciato esclusivamente durante la loro attivazione. Il saggio ha dimostrato che le NP PLGA-ALE non inducono questo fenomeno, contrariamente a quanto accade con NP a base di carbonio (Radomski A et al, 2005).

Sono stati valutati gli effetti sulla fase plasmatica di coagulazione, poiché dopo somministrazione endovenosa le NP potrebbero interagire con i fattori coagulanti. La concentrazione più elevata delle NP ha determinato in questo caso una riduzione significativa del PT, mentre concentrazioni più basse ne hanno indotto un aumento significativo. Quest'alterazione potrebbe essere causata da una modificazione del Fattore VII della fase estrinseca della coagulazione, poiché l'APTT, che misura la fase intrinseca, non è stato significativamente alterato dall'incubazione con le NP. Probabilmente, il Fattore VII è stato parzialmente adsorbito sulla superficie delle NP alla più alta concentrazione, e reso così meno disponibile per la coagulazione. Al contrario, basse concentrazioni di NP possono attivarlo in maniera simile all'effetto di fattori tissutali. In

ogni caso, dato che un'attività protrombinica superiore al 75% è considerata normale negli esseri umani, le alterazioni causate dalle NP PLGA-ALE non dovrebbero comportare conseguenze cliniche.

Anche se è stato riportato in letteratura che il copolimero costituito dagli ossidi di polietilene e polipropilene (PEO/PPO) (Pluronic F68), utilizzato a bassa concentrazione nella preparazione delle NP PLGA-ALE come agente surfattante, può inibire l'adesione piastrinica ed allungare l'APTT (Bots JG et al, 1986; Amiji M et al, 1992), non si è riscontrata alcuna variazione significativa né del numero delle piastrine né dell'APTT dopo incubazione con le NP. L'assenza di effetti dannosi è verosimilmente legata alla pressoché completa eliminazione del Pluronic F68 mediante dialisi.

Il consumo di complemento è stato valutato dopo incubazione di campioni di siero con le NP poichè esso può essere attivato in modo aspecifico da molte superfici estranee. L'attivazione del complemento determina la produzione di piccoli peptidi biologicamente attivi, che causano effetti locali e sistemici, come aggregazione piastrinica e reazioni infiammatorie. Solitamente, le NP possono attivare la via alternativa, ma il coinvolgimento della via classica non può essere escluso a priori (Salvador-Morales C et al, 2006). È stato inoltre riportato che il Pluronic F68, oltre che influire sulla fase plasmatica della coagulazione, può determinare consumo di complemento principalmente attraverso la via alternativa, sebbene è possibile che abbia un ruolo anche attraverso la via classica (Andersson J et al, 2006). È quindi possibile che residui di surfattante possano causare consumo di complemento. Per questi motivi sono stati eseguiti i saggi per analizzare tutte le fasi della cascata del complemento. Lo zymosan, un estratto della parte cellulare di lievito, è stato utilizzato come controllo positivo. Esso è

un noto attivatore della via alternativa, ma è capace di attivare anche la via classica attraverso il legame con anticorpi anti-lievito presenti nel siero umano. Le NP PLGA-ALE non hanno indotto una significativa attivazione della via classica né di quella alternativa, come confermato anche dal dosaggio immunoenzimatico del frammento Bb, prodotto durante la conversione del Fattore B zimogeno ad un enzima proteolitico attivo durante la via alternativa. Gli esperimenti hanno escluso l'attivazione di entrambe le vie dopo incubazione con le NP, e questo fornisce un'ulteriore conferma dell'efficacia del processo di dialisi nella rimozione di ogni quantità residua di Pluronic F68.

Alcuni autori descrivono che le proprietà delle NP possono essere migliorate mediante 'PEGilazione', vale a dire l'aggiunta di PEG alla superficie. E' stato riportato che questo processo riduce anche l'effetto emolitico del PLGA (Kim D et al, 2005), l'attivazione piastrinica (Kainthan RK et al, 2006) ed il consumo di complemento (Layre A et al, 2006), proteggendo inoltre le NP dal riconoscimento da parte del sistema immunitario (Vonarbourg A et al, 2006). Anche se il processo di 'PEGilazione' non è stato impiegato per la preparazione delle NP PLGA-ALE, in quanto si temeva che tale processo alterasse la capacità di legare l'alendronato, non sono stati ugualmente riscontrati fenomeni emolitici, attivazione piastrinica o consumo del complemento. L'assenza di tali effetti tossici può essere legata alla dimensione relativamente alta rispetto all'unità di massa, che assicura biocompatibilità senza alterare la capacità di legare molecole per la terapia mirata al tessuto osseo.

Le NP iniettate per via endovenosa raggiungono il tessuto bersaglio tramite l'apparato circolatorio. Tuttavia, l'attraversamento dell'endotelio vascolare rappresenta una fase obbligatoria per poter

esplicare la loro azione nel sito target. È perciò importante che le NP non risultino tossiche per le cellule endoteliali. Una lesione dell'endotelio *in vivo*, può infatti determinare l'esposizione delle fibre di collagene del subendotelio con conseguente attivazione delle piastrine, dei fattori XII e XI, e della via intrinseca di coagulazione. Il test del rosso neutro, condotto sulle HUVEC, ha escluso eventuali effetti citotossici. È perciò possibile supporre indirettamente che, non causando effetti citotossici per le cellule endoteliali, le NP PLGA-ALE non attiverrebbero la coagulazione *in vivo* attraverso l'endotelio.

Le NP dirette al tessuto osseo non dovrebbero danneggiare gli osteoblasti, poiché ciò potrebbe compromettere l'effetto che si intende ottenere con l'impiego delle NP PLGA-ALE. Attraverso il test del rosso neutro è stato quindi valutato l'effetto citotossico delle NP su osteoblasti derivati da precursori mesenchimali del midollo osseo. Il risultato del test ha permesso di escludere danni sugli osteoblasti dopo 24 ore di incubazione con le NP. Alcuni autori hanno dimostrato che l'alendronato può favorire alcune funzioni osteoblastiche, come l'attività della fosfatasi alcalina ed il differenziamento dei precursori osteogenici mesenchimali, esercitando un effetto dose-dipendente sulla deposizione di calcio (Duque G et al, 2007; von Knoch F et al, 2005). Non abbiamo però dimostrato alcun aumento significativo dell'ALP intracellulare dopo incubazione con NP PLGA-ALE.

Gli effetti delle NP PLGA-ALE sugli osteoclasti sono stati analizzati per valutare la residua attività anti-osteolitica dell'alendronato dopo il legame con il PLGA. Sono stati utilizzati come modello *in vitro* i precursori circolanti del sangue periferico. Il fenotipo osteoclastico è stato dimostrato mediante la verifica della formazione di MNC

TRACP-positive e il tipico anello di actina. La più bassa concentrazione di NP PLGA-ALE utilizzata (0,64 μ M) ha indotto apoptosi a 3 e 7 giorni, senza però alterare la capacità di degradazione del collagene di tipo I. Alla concentrazione di 6,4 μ M è stato inibito il differenziamento degli OC, in maniera non significativamente diversa rispetto all'ALE puro, ed è stata indotta l'apoptosi. Anche le NP a base di PLGA puro, utilizzate come controllo, hanno determinato apoptosi dopo 3 giorni alla concentrazione più bassa, ed alla concentrazione più alta è stata osservata un'inibizione della degradazione del collagene. Gli effetti delle NP preparate a partire dal coniugato e di quelle preparate dal PLGA puro sono perciò paragonabili. Entrambe le preparazioni hanno indotto apoptosi degli osteoclasti, sebbene le NP coniugate ad ALE in misura maggiore. A 6,4 μ M è stato inibito in entrambi i casi il differenziamento degli OC, mentre alla concentrazione inferiore è stato unicamente osservato un effetto sull'apoptosi. Sembra quindi che le NP possano inibire la funzionalità osteoclastica indipendentemente dalla presenza dell'ALE, probabilmente perché esse vengono fagocitate dai monociti ed inibiscono in parte il loro differenziamento in OC.

In conclusione, gli esperimenti di biocompatibilità hanno dimostrato che le NP PLGA-ALE hanno indotto esclusivamente un'alterazione dei valori dell'attività protrombinica, peraltro nell'ambito del range di normalità. Nessun effetto è stato osservato sulle piastrine, sui leucociti, sul consumo di complemento e sulla vitalità delle cellule umane. È possibile quindi ipotizzare una somministrazione per via endovenosa di questo tipo di NP, dopo averle 'caricate' con un farmaco chemioterapico, ed un loro utilizzo nel trattamento metastasi osteolitiche.

L'incubazione delle NP PLGA-ALE con idrossiapatite (HA) sintetica ha permesso poi di dimostrare indirettamente l'affinità per la componente minerale ossea. Il metodo applicato valuta l'aumento di affinità delle NP per l'HA in presenza dell'ALE nella loro composizione (Choi SW et al, 2007). Sono state utilizzate due differenti concentrazioni di idrossiapatite e tempi di incubazione per confermare un legame chimico specifico con l'HA e non un suo adsorbimento aspecifico sulla superficie delle NP. Le NP con ALE hanno mostrato un'affinità per l'HA dipendente della concentrazione del sale e del tempo di incubazione, suggerendo che l'associazione tra le NP e l'HA sia dovuta allo sviluppo di un legame chimico con il BP, oltre al semplice adsorbimento fisico del sale sulla superficie, che spiega la minore affinità mostrata dalle NP-PLGA.

La fase successiva è stata il 'loading' delle NP, dimostratesi biocompatibili e con proprietà antiosteolitiche, con il chemioterapico DXR. La tecnica utilizzata ha determinato una percentuale di loading accettabile, con un trascurabile aumento delle dimensioni delle NP. Le dimensioni delle NP non sono state alterate in seguito a sterilizzazione con raggi gamma, metodo applicato per i successivi esperimenti *in vivo*. L'efficacia antineoplastica delle NP-DXR è stata valutata *in vitro* su modelli cellulari isolati da osteosarcoma primitivo (U-2 OS e Saos-2) o da tumori che sviluppano frequentemente metastasi ossee (MDA-MB-231 e MCF7 derivate da adenocarcinoma mammario; ACHN derivate da adenocarcinoma renale, SH-SY5Y derivate da metastasi midollare di neuroblastoma). La sensibilità o la resistenza alla DXR delle linee cellulari è stata valutata in esperimenti preliminari osservando il pattern di distribuzione intracellulare del farmaco libero, riconoscibile tramite la naturale fluorescenza rossa della molecola della DXR. In particolare,

la responsività al farmaco è associata al legame selettivo al DNA cellulare, quindi alla localizzazione nucleare della fluorescenza. Questo pattern è stato chiaramente osservato in tutte le linee cellulari utilizzate nello studio, sia dopo incubazione con la DXR libera che con le NP-DXR. In entrambi i casi, era visibile una brillante fluorescenza rossa nucleare. In seguito ad incubazione con le NP-DXR, ma non con il farmaco libero, è stata inoltre notata la presenza di fluorescenza citoplasmatica localizzata, dovuta probabilmente all'accumulo delle NP all'interno di vacuoli citoplasmatici. Dopo il rilascio dalle NP, la DXR si localizza comunque nel nucleo esercitando la sua azione citotossica (Calabresi P et al, 1991). Gli effetti antineoplastici delle NP-DXR sono stati valutati mediante l'analisi dell'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali dopo incubazione con diluzioni scalari, a confronto con analoghe concentrazioni di farmaco libero. Tutte le linee cellulari si sono dimostrate sensibili all'azione citotossica della DXR libera, sebbene a diversi livelli, come prevedibile dall'analisi del pattern di uptake. L'azione inibitoria più forte è stata esercitata sulle U-2 OS e la più debole sulle SH-SY5Y. In ogni caso, tutte le linee cellulari sono state inibite alla concentrazione più alta di DXR libera (580 ng/ml) e dall'equivalente di NP-DXR. Recentemente, alcuni autori hanno dimostrato che la resistenza di cellule umane di adenocarcinoma del colon al paclitaxel può essere evitata mediante il legame a NP (Koziara JM et al, 2006). Altri autori hanno dimostrato una simile suscettibilità per la DXR incapsulata in NP in cellule MCF7 (Chavanpatil MD. et al, 2006). In questo sistema sperimentale, l'efficacia *in vitro* della DXR dopo legame alle NP è rimasta sostanzialmente sovrapponibile a quella del farmaco libero, ma va comunque sottolineato da un lato

che il legame con le NP non ha ridotto l'effetto antineoplastico del farmaco, e dall'altro che la formulazione delle NP permette comunque di concentrare il farmaco nel sito bersaglio evitando gli effetti collaterali dovuti ad una distribuzione sistemica incontrollata. Le NP utilizzate per le prove di biocompatibilità *in vitro* sono state sterilizzate per filtrazione attraverso pori del diametro di 0,45 μm . Questo passaggio causa un 35% di perdita di materiale dovuta all'eliminazione delle NP di maggiore dimensione. Inoltre, data la dimensione dei pori, il livello di sterilizzazione raggiunto non risulta adeguato per degli esperimenti *in vivo*. Dato che l'utilizzo di filtri con pori di 0,22 μm avrebbe tratterrenuto troppo materiale, è stata condotta la sterilizzazione mediante raggi γ . Questo tipo di radiazioni possono modificare le proprietà strutturali del polimero, ma l'analisi dimensionale ha dimostrato che non né la dimensione né la distribuzione delle NP-DXR non sono state alterate significativamente. La capacità di inibizione della proliferazione è stata valutata dopo entrambi i metodi di sterilizzazione. La proliferazione delle U-2 OS, delle ACHN e delle MDA-MB-231 è stata inibita allo stesso livello alle concentrazioni di 58 e 580 ng/ml. La linea SH-SY5Y si è rivelata invece più resistente all'azione delle NP trattate con i raggi gamma. Quanto alle Saos-2 e alle MCF7, esse sono state inibite a 58 ng/ml soltanto dalle DXR-NP sterilizzate per filtrazione, ma non da quelle sterilizzate con i raggi gamma, mentre a 580 ng/ml sono stati ottenuti risultati sovrapponibili. Queste differenze potrebbero essere legate al fatto che la filtrazione può avere portato ad un lieve aumento della concentrazione del farmaco, non facilmente quantificabile. Si può comunque considerare che, nel complesso, l'effetto delle NP-DXR, sia stato

soddisfacente indipendentemente dal metodo di sterilizzazione, e solo in alcuni casi leggermente inferiore a quello del farmaco libero. Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti nella fase finale dello studio su un modello murino di metastasi osteolitiche da carcinoma mammario, per verificare che i risultati incoraggianti ottenuti sulle colture cellulari fossero riproducibili all'organismo *in toto*. Esperimenti preliminari hanno permesso di escludere la potenziale tossicità sistemica delle NP PLGA-ALE dopo iniezione intraperitoneale in topi immunodepressi BALB/c-nu/nu (dati non riportati). Le lesioni osteolitiche sono state indotte mediante l'inoculo intratibiale della linea cellulare di carcinoma MDA-MB-231, già utilizzata per l'induzione di metastasi osteolitiche in modelli *in vivo* (Hiraga T et al, 2001). La scelta di indurre la formazione di metastasi ossee attraverso l'inoculo delle cellule neoplastiche direttamente nella tibia degli animali è stata guidata dall'obiettivo dello studio, vale a dire valutare l'efficacia delle NP-DXR sul fenomeno metastatico locale. Questo modello viene correntemente utilizzato per lo studio delle lesioni osteolitiche *in vivo* (Le Gall C et al, 2007), e permette, in definitiva, di indurre la formazione delle lesioni osteolitiche nel microambiente osseo, che rappresenta esattamente il sito bersaglio di un sistema nanoparticellare come quello qui utilizzato.

L'efficacia delle NP-DXR è stata confrontata con quella delle NP PLGA-ALE, non 'caricate' con il farmaco, e della DXR libera. Sono stati testati due dosaggi di DXR: 1 mg/Kg, come suggerito dalla letteratura (Mewani RR et al, 2004; Jones LW et al, 2005), ed uno inferiore (0,2 mg/Kg), per dimostrare che il trasporto selettivo attraverso le NP permette la riduzione del dosaggio senza ridurre l'efficacia.

Al dosaggio più basso, 0,2 mg/Kg, le NP PLGA-ALE hanno inibito modestamente l'insorgenza di metastasi ossee nelle prime 4 settimane, probabilmente per via del loro effetto antiosteolitico, ma nelle settimane successive il trattamento ha avuto effetti quasi sovrapponibili a quelli del veicolo. La DXR ha mostrato un'attività antineoplastica elevata per tutta la durata dell'esperimento, permettendo alla fine dell'esperimento di ridurre l'incidenza delle lesioni di circa il 20%. È interessante notare che il migliore risultato, statisticamente significativo al termine dell'esperimento, è stato ottenuto in misura maggiore in seguito a trattamento con le NP-DXR.

Nelle prime settimane di trattamento a dosaggio più elevato (1 mg/Kg), tutti e tre i trattamenti hanno esercitato un effetto sovrapponibile. In seguito, la percentuale di metastasi ossee sviluppatesi negli animali trattati le NP-DXR è risultata solo di poco inferiore a quella osservata in seguito al trattamento con la DXR. Entrambi i trattamenti hanno comunque avuto un'efficacia maggiore rispetto al trattamento con le NP PLGA-ALE. L'aumento del dosaggio non ha comportato comunque miglioramenti all'efficacia delle NP-DXR.

L'area di osteolisi è stata valutata mediante analisi istomorfometrica sulle sezioni di tibia al termine dell'esperimento. L'efficacia del trattamento con le NP-DXR nel ridurre l'area tumorale è stata paragonabile a quella della DXR libera, con differenze statisticamente significative rispetto al veicolo. Gli effetti inibitori sull'area tumorale delle NP PLGA-ALE sono stati trascurabili, suggerendo che i BP possano inibire l'attività osteolitica senza però ridurre la massa tumorale. Ciò è stato confermato dalla valutazione dei parametri osteoclastici, effettuata valutando il numero degli

osteoclasti presenti in corrispondenza delle lesioni. È stato osservato un andamento di riduzione dose-dipendente del numero di cellule rispetto al veicolo, con un andamento conservato per tutti e tre i trattamenti. In questo caso, l'uso delle NP-DXR non ha introdotto nessun vantaggio rispetto al farmaco libero o alle NP PLGA-ALE. La riduzione del numero di osteoclasti è probabilmente dovuta, da un lato, alla presenza dell'ALE, e dall'altro da una parziale azione citotossica delle DXR.

Recentemente, è stato riportato che l'ultima generazione di ammino-BP, come l'acido zoledronico, possiede un'attività antineoplastica oltre a quella antiosteolitica (Santini D et al, 2006). Quest'attività è dovuta all'inibizione della farnesil-difosfato sintasi ed al blocco del pathway del mevalonato (Kavanagh KL et al, 2006). Anche se coniugato al PLGA, l'ALE ha mantenuto la sua efficacia nell'inibizione della formazione degli osteoclasti ed ha ridotto lo sviluppo di metastasi scheletriche in topi immunodepressi, almeno nelle prime fasi del trattamento. Nel sistema utilizzato in questo studio, l'ALE è stato utilizzato come molecola per il bone targeting. È già stato dimostrato, infatti, che i BP rappresentano un ottimo sistema per il targeting di farmaci solubili al tessuto osseo (Uludag H et al, 2002). L'uso di NP coniugate ad ALE assicura il trasporto controllato della DXR nelle aree osteolitiche, riducendo gli effetti collaterali sistemici e concentrando il farmaco nel sito della metastasi ed in più, come osservato, esercita una leggera azione antineoplastica. In altri sistemi per il trasporto di farmaci, la DXR è stata coniugata ad immunoliposomi per il trattamento del neuroblastoma, con buoni risultati *in vitro* e su modelli murini (Pastorino F et al, 2003). Tali risultati possono essere migliorati dall'utilizzo di polimeri sintetici biodegradabili per la preparazione

delle NP per il bone targeting i quali, a differenza dei materiali di cui sono costituiti i liposomi, garantiscono la protezione del farmaco per un periodo di tempo maggiore, assicurando che esso venga rilasciato esclusivamente nel sito target, e i non trascurabili effetti collaterali causati da un rilascio prematuro del farmaco.

CONCLUSIONE

In conclusione, questo studio ha dimostrato l'efficacia terapeutica del farmaco antineoplastico doxorubicina quando legato a nanoparticelle osteotropiche coniugate ad alendronato. È stata infatti osservata, dopo 44 giorni di trattamento *in vivo*, una riduzione dell'incidenza di metastasi osteolitiche pari al 60% rispetto al controllo. Questo tipo di dispositivo, approfonditamente analizzato, possiede requisiti idonei per una successiva valutazione dell'applicazione clinica nella terapia delle metastasi osteolitiche.

BIBLIOGRAFIA

- Adams JD, Flora KP, Goldspiel BR, Wilson JW, Arbuck SG, Finley R. Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1993. 15:141-7.
- Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, Chiu GN, Shu Y, Li WM, Johnstone SA, Janoff AS, Mayer LD, Webb MS, Bally MB. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). *Biosci Rep* 2002. 22:225–50.
- Amiji M, Park K. Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers. *Biomaterials* 1992. 13:682–92.
- Andersson J, Bexborn F, Klinth J, Nilsson B, Ekdahl KN. Surface-attached PEO in the form of activated Pluronic with immobilized factor H reduces both coagulation and complement activation in a whole-blood model. *J Biomed Mater Res A* 2006. 76:25-34.
- Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006. 17:247-89.
- Baban D, Seymour LW. Control of tumor vascular permeability. *Adv Drug Deliv Rev* 1998. 34:109–19.
- Baldini N, Scotlandi K, Serra M, Shikita T, Zini N, Ognibene A, Santi S, Ferracini R, Maraldi NM. Nuclear immunolocalization of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines showing similar mechanisms of doxorubicin distribution. *Eur J Cell Biol* 1995. 68:226-39.
- Baldini N, Scotlandi K, Serra M, Kusuzaki K, Shikita T, Manara MC, Maurici D, Campanacci M. Adriamycin binding assay: a

- valuable chemosensitivity test in human osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992. 119:121-6.
- Balthasar S, Michaelis K, Dinauer N, von Briesen H, Kreuter J, Langer K. Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* 2005. 26:2723–32.
 - Barrett J, Worth E, Bauss F, Epstein S. Ibandronate: a clinical pharmacological and pharmacokinetic update. *J Clin Pharmacol* 2004. 44:951-65.
 - Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci* 1995. 84:493-8.
 - Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharrya S, Skinner RA, Swain F, Ramani V, Mohammad KS, Wessner LL, Martinez A, Guise TA, Chirgwin JM, Gaddy D, Suva LJ.. Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand pathway. *Cancer Res* 2005. 65:11001–9.
 - Bhadra D, Bhadra S, Jain S, Jain NK. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *Int J Pharm* 2003. 257:111-24.
 - Blat C, Bohlen P, Villaudy J, Chatelain G, Golde A, Harel L. Isolation and amino-terminal sequence of a novel cellular growth inhibitor (inhibitory diffusible factor 45) secreted by 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1989. 264:6021-4.
 - Borm PJ, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 2004. 4:521-31.

- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 2006. 3:11.
- Bots JG, van der Does L, Bantjes A. Small diameter blood vessel prostheses from blends of polyethylene oxide and polypropylene oxide. *Biomaterials* 1986. 7:393-9.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001.175: 191-9.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF κ B cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004. 286:L34453.
- Brounais B, Ruiz C, Rousseau J, Lamoureux F, Blanchard F, Heymann D, Redini F. Novel anti-cancer strategy in bone tumors by targeting molecular and cellular modulators of bone resorption. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2008. 3:178-86.
- Calabresi P, Chabner A: Chemotherapy of neoplastic diseases. In: A Goodman Gilman, TW Rall, AS Nies, P Taylor (eds): Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. p 1202-1263. McGraw-Hill, New York 1991.
- Chavanpatil MD, Patil Y, Panyam J. Susceptibility of nanoparticle-encapsulated paclitaxel to P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Int J Pharm* 2006. 320:150-6.

- Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* 1990. 265:506-14.
- Choi SW, Kim JH. Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone. *J Control Release* 2007. 122:24-30.
- Chorny M, Cohen-Sacks H, Fishbein I, Danenberg HD, Golomb G. Biodegradable nanoparticles as drug delivery systems for parenteral administration. *Tissue Engineering and Novel Delivery Systems*, 2004, 393-422.
- Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A. Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials* 2006. 27:6150-60.
- Clark JC, Dass CR, Choong PF. Current and future treatments of bone metastases. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008. 13:609-27.
- Clezardin P, Ebetino FH, Fournier PG.. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res* 2005. 65:4971-4.
- Cohen-Sela E, Rosenzweig O, Gao J, Epstein H, Gati I, Reich R, Danenberg HD, Golomb G. Alendronate-loaded nanoparticles deplete monocytes and attenuate restenosis. *J Control Release* 2006. 113:23-30.
- Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997. 80:1588-94.
- Coleman RE, Smith P, Rubens RD. Clinical course and prognostic factors following bone recurrence from breast cancer. *Br J Cancer* 1998. 77:336-40.

- Conte P, Coleman R. Bisphosphonate in the treatment of skeletal metastases. *Semin Oncol* 2004. 31:59–63.
- Costantino L, Gandolfi F, Tosi G, Rivasi F, Vandelli MA, Forni F. Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *J Control Release* 2005. 108:84-96.
- Couvreur P, Kante B, Lenaerts V, Scailteur V, Roland M, Speiser P. Tissue distribution of antitumor drugs associated with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *J Pharm Sci* 1980. 69:199-202.
- Couvreur P, Couarraze G, Devissaguet J, Puisieux F. Nanoparticles: preparation and characterization, in: S. Benita (Ed.), *Microencapsulation: Methods and Industrial Application*, Marcel Dekker, New York, 1996. 183–211.
- Cutright DE, Perez B, Beasley JD 3rd, Larson WJ, Posey WR. Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974. 37:142-52.
- Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor- β (TGF- β)-binding protein-1 by osteoclasts: a cellular mechanism for release of TGF- β from bone matrix. *J Biol Chem* 2002. 277:21352–60.
- Danen EH, Van Muijen GN, Ruitter DJ Role of integrins as signal transducing cell adhesion molecules in human cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1995. 24:43-65.
- Dass CR, Walker TL, Burton MA, Decruz EE. Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes. *J Pharm Pharmacol* 1997. 49: 972-5.

- Denijn M, Ruiter DJ. The possible role of angiogenesis in the metastatic potential of human melanoma. Clinicopathological aspects. *Melanoma Res* 1993. 31:5-14.
- De Jong WH, Borm PJ Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 2008. 3:133-49.
- De Wit PE, Moretti S, Koenders PG, Weterman MA, van Muijen GN, Gianotti B, Ruiter DJ. Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. *J Invest Dermatol* 1992. 99:168-73
- Dingemans AM, Pinedo HM, Giaccone G. Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998. 1400:275–88.
- Di Silvio L, Gurav N. Osteoblasts. In: Koller MR, Palsson BO, Masters JRW, editors. Human Cell Culture, Vol. V. Great Britain: Kluwer, 2001. 221-41.
- Dorr RT. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann Pharmacother* 1994. 28: S11–4.
- Dubey PK, Mishra V, Jain S, Mahor S, Vyas SP. Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. *J Drug Target* 2004. 12:257–64.
- Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Disc* 2003. 2:347–60.
- Duque G, Rivas D. Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2007. 22:1603-11.
- Ebrahimpour A, Francis MD. Bisphosphonate therapy in acute and chronic bone loss: physical chemical considerations in bisphosphonate-related therapies. In *Bisphosphonates on bones*. O. Bijvoet, et al. Eds.: Elsevier Science B.V Amsterdam.

- Egorin MJ, Hildebrand RC, Cimino EF, Bachur NR. Cytofluorescence localization of Adriamycin and daunorubicin. *Cancer Res* 1974. 34:2243-5.
- Elamanchili P, Diwan M, Cao M, Samuel J. Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine* 2004. 22:2406-12.
- El-Mabhouh A, Angelov C, McEwan A, Jia G, Mercer J. Preclinical investigations of drug and radionuclide conjugates of bisphosphonates for the treatment of metastatic bone cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2004. 19:627-40.
- Estlin EJ, Veal GJ. Clinical and cellular pharmacology in relation to solid tumours of childhood. *Cancer Treat Rev* 2003. 29:253-73.
- Fang J, Sawa T, Maeda H. Factors and mechanism of “EPR” effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv Exp Med Biol* 2003. 519:29-49.
- Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TN, Lavan DA, Langer R. Nanoparticle–aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004. 64:7668–72.
- Feng S, Mu L, Win KY, Huang G. Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of Paclitaxel. *Curr Med Chem* 2004. 11:413-24.
- Fenske DB, Cullis PR. Liposomal nanomedicines. *Expert Opin Drug Deliv* 2008. 5:25-44.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. IARC CancerBase No. 5, Version 2.0., IARC Press, Lyon, 2004.

- ^aFerrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 2005. 5:161–71.
- ^bFerrari M. Nanovector therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2005. 9:343–6.
- Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966. 212:901-3.
- Fleisch HA. Bisphosphonates in Bone Disease. In *From the Laboratory to the Patient*, edn 3. New York: Parthenon Publishing (ed.; 1997).
- Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current Molecular Medicine* 2003. 3:643–51.
- Forssen E, Tökés ZA. Improved therapeutic benefits of doxorubicin by entrapment in anionic liposomes. *Cancer Res* 1983. 43:546–50.
- Galasko C. The anatomy and pathways of skeletal metastases. In: Weiss L, Gilbert A, editors. *Bone metastases*. Boston: GKHall; 1981. 49-63.
- Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT, Zalipsky S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2004. 56:1177–92.
- Giraudo E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 2004. 114:623-33.
- Gittens SA, Bansal G, Zernicke RF, Uludağ H. Designing proteins for bone targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 57:1011-36.
- Granchi D, Amato I, Battistelli L, Avnet S, Capaccioli S, Papucci L, Donnini M, Pellacani A, Brandi ML, Giunti A, Baldini N. In vitro

- blockade of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand prevents osteoclastogenesis induced by neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2004. 111:829-38.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994. 263:1600-3.
 - Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, Vessella R, Corey E, Padalecki S, Suva L, Chirgwin JM. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006. 12:6213s-6s.
 - Guzman LA, Labhassetwar V, Song C, Jang Y, Lincoff AM, Levy R, Topol EJ. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation* 1996. 94:1441.
 - Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MN. Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharm Res* 2006. 23:184-95.
 - Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Kawagishi R, Ikebuchi Y, Sakata M, Tasaka K, Murata Y. Alendronate inhibits intraperitoneal dissemination in in vivo ovarian cancer model. *Cancer Res* 2005. 65:540-5.
 - He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJ. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000. 7: 899–903.
 - Hengst V, Oussoren C, Kissel T, Storm G. Bone targeting potential of bisphosphonate-targeted liposomes. Preparation, characterization and hydroxyapatite binding in vitro. *Int J Pharm* 2007. 331:224-7.

- Hirabayashi H, et al. Relationship between physicochemical and osteotropic properties of bisphosphonic derivatives: rational design for osteotropic drug delivery system (ODDS). *Pharm Res* 2001. 18:646-51.
- Hiraga T, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T. The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases. *Cancer Res* 2001. 61:4418-24.
- Houston SJ, Sawamoto T, Fujisaki J, Tokunaga Y, Kimura S, Hata T. The systemic treatment of bone metastases. *Clin Orthop Relat Res* 1995. 312:95-104.
- Humphries MJ, Olden K, Yamada KM. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 1986. 25:233:467-70.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunological criteria. *J Clin Invest* 1973. 52: 2745-56.
- Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000. 21:2475-90.
- Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhassetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anti-cancer agents. *Mol Pharmacol* 2005. 2:194–205.
- Jones LW, Eves ND, Courneya KS, Chiu BK, Baracos VE, Hanson J, Johnson L, Mackey JR. Effects of exercise training on antitumor efficacy of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2005. 11:6695-8.

- Kainthan RK, Gnanamani M, Ganguli M, Ghosh T, Brooks DE, Maiti S, Kizhakkedathu JN. Blood compatibility of novel water soluble hyperbranched polyglycerol-based multivalent cationic polymers and their interaction with DNA. *Biomaterials* 2006. 27:5377-90.
- Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, Rogers MJ, Russell RG, Oppermann U. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. 103:7829-34..
- Kim D, El-Shall H, Dennis D, Morey T. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005. 40:83-91.
- Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Muñoz Javier A, Gaub HE, Stölzle S, Fertig N, Parak WJ. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett* 2005. 5:331–8.
- Koziara JM, Whisman TR, Tseng MT, Mumper RJ. In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. *J Control Release* 2006. 112:312-9.
- Layre A, Couvreur P, Chacun H, Richard J, Passirani C, Requier D, Benoit JP, Gref R. Novel composite core-shell nanoparticles as busulfan carriers. *J Control Release* 2006. 11:271-80.
- Langer R. Tissue engineering: a new field and its challenges. *Pharm Res* 1997. 14:840-1.
- Lee JH, Lim YB, Choi JS, Lee Y, Kim TI, Kim HJ, Yoon JK, Kim K, Park JS. Polyplexes assembled with internally quaternized PAMAM-OH dendrimer and plasmid DNA have a neutral surface and gene delivery potency. *Bioconjug Chem* 2003. 14:1214–21.

- Le Gall C, Bellahcène A, Bonnelye E, Gasser JA, Castronovo V, Green J, Zimmermann J, Clézardin P. A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res* 2007. 67:9894-902.
- Lehn JM. Toward self-organization and complex matter. *Science* 2002. 295:2400–3.
- Lenaerts V, Nagelkerke JF, Van Berkel TJ, Couvreur P, Grislain L, Roland M, Speiser P. In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. *J Pharm Sci* 1984. 73:980-2.
- Leroux JC, De Jaeghere F, Anner B, Doelker E, Gurny R. An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes. *Life Sci* 1995. 57:695-703.
- Li H, Qian ZM. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. *Med Res Rev* 2002. 22:225–50.
- Lipton A. Future treatment of bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006. 12:6305s-8s.
- Lu W, Sun Q, Wan J, She Z, Jiang XG. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles allow gene delivery into brain tumours via intravenous administration. *Cancer Res* 2006. 66:11878-87.
- Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RG, Rogers MJ. Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res* 1998. 13:1668-78.
- Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the

- mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998. 13:581-9.
- Luo Y, Bernshaw NJ, Lu ZR, Kopecek J, Prestwich GD. Targeted delivery of doxorubicin by HPMA copolymer-hyaluronan bioconjugates. *Pharm Res* 2002. 19:396–402.
 - Lyles KW, Siris ES, Singer FR, Meunier PJ. A clinical approach to the diagnosis and management of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2001. 16:1379–87.
 - Markovsky E, Koroukhov N, Golomb G. Additive-free albumin nanoparticles of alendronate for attenuating inflammation through monocyte inhibition. *Nanomed* 2007. 2:545-53.
 - Mao SJ, Hou SX, He R, Zhang LK, Wei DP, Bi YQ, Jin H. Uptake of albumin nanoparticle surface modified with glycyrrhizin by primary cultured rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005. 11:3075–9.
 - Marjan J, Xie Z, Devine DV. Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1994. 1192:35-44
 - Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of ³H-alendronate and ³H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 1996.19:281-90.
 - Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix degradation. *Trends Genet* 1990. 6:121-5.
 - Matsusue Y, Matsusue Y, Hanafusa S, Yamamuro T, Shikinami Y, Ikada Y. Tissue reaction of bioabsorbable ultra high strength poly (L-lactide) rod. A longterm study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1995. 246-53:

- McDonald DM, Baluk P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 2002. 62:5381–85.
- Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* 2007. 150:552-8.
- Mewani RR, Tang W, Rahman A, Dritschilo A, Ahmad I, Kasid UN, Gokhale PC. Enhanced therapeutic effects of doxorubicin and paclitaxel in combination with liposome-entrapped end-modified raf antisense oligonucleotide against human prostate, lung and breast tumor models. *Int J Oncol* 2004. 24:1181-8.
- Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW Jr. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol* 2001. 19:1195-206.
- Mitra A, Nan A, Line BR, Ghandehari H. Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Curr Pharm Des* 2006. 12:4729-49.
- ^aMoghimi SM, Hunter AC. Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001. 18:527–50.
- ^bMoghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001. 53:283–318.
- Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002. 2:584–93.
- Nadin SB, Vargas-Roig LM, Cuello-Carrión FD, Ciocca DR. Deoxyribonucleic acid damage induced by doxorubicin in peripheral blood mononuclear cells: possible roles for the stress response and the deoxyribonucleic acid repair process. *Cell Stress Chaperones* 2003. 8: 361-72.

- Nagayama S, Ogawara K, Fukuoka Y, Higaki K, Kimura T. Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int J Pharm* 2007. 342:215-21.
- Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2005. 38:617-27.
- Owens DE 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006. 307:93-102.
- Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003. 55:329-47.
- Panyam J, Labhasetwar V. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles. *Mol Pharm* 2004. 1:77-84.
- Park EK, Lee SB, Lee YM. Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumour-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005. 26:1053-61.
- Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Saprà P, Moase EH, Allen TM, Ponzoni M. Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 2003. 63:86-92.
- Peracchia MT, Fattal E, Desmaële D, Besnard M, Noël JP, Gomis JM, Appel M, d'Angelo J, Couvreur P. Stealth PEGylated

- polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release* 1999. 60:121-8.
- Pietschmann P, Stohlawetz P, Brosch S, Steiner G, Smolen JS, Peterlik M. The effect of alendronate on cytokine production, adhesion molecule expression, and transendothelial migration of human peripheral blood mononuclear cells. *Calcif Tissue Int* 1998. 63:325-30.
 - Pignatello R, Cenni E, Micieli D, Fotia C, Salerno M, Granchi D, Avnet S, Sarpietro MG, Castelli F, Baldini N. A novel biomaterial for osteotropic drug nanocarriers: synthesis and biocompatibility evaluation of a PLGA-ALE conjugate. *Nanomed* 2009. 4:161-75.
 - Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MW. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* 2005. 146:882–93.
 - Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biol Pharm Bull* 2006. 29:1790-8.
 - Riccio AI, Wodajo FM, Malawer M. Metastatic carcinoma of the long bones. *Am Fam Physician* 2007. 76:1489-94.
 - Richardson DS, Johnson SA. Anthracyclines in hematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. *Blood Rev* 1997. 11:201-23.
 - Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992. 70:389–99.
 - Rogers MJ, Chilton KM, Coxon FP, Lawry J, Smith MO, Suri S, Russell RG. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res* 1996. 11:1482-91.

- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000. 88:2961-78.
- Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004. 350:1655–64.
- Roser M, Fischer D, Kissel T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 1998. 46:255-63.
- Roudier MP, Vesselle H, True LD, Higano CS, Ott SM, King SH, Vessella RL. Bone histology at autopsy and matched bone scintigraphy findings in patients with hormone refractory prostate cancer: the effect of bisphosphonate therapy on bone scintigraphy results. *Clin Exp Metastasis* 2003. 20:171–80.
- Russel RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006. 1068:367-401.
- Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green MLH, Sim RB. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol* 2006. 43:193-201.
- Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv* 2007.4:297-305.
- Santini D, Schiavon G, Angeletti S, Vincenzi B, Gasparro S, Grilli C, La Cesa A, Virzì V, Leoni V, Budillon A, Addeo SR, Caraglia M, Dicuonzo G, Tonini G. Last generation of amino-bisphosphonates (N-BPs) and cancer angio-genesis: a new role for these drugs? *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006. 1:383-96.
- Schadendorf D, Möller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma

- cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 1993. 151:2667-75.
- Seymour LW. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1992. 9:135–87.
 - Sethi V, Stark B, Hensler S, Prassl R, Mosgoeller W. Liposomal vasoactive intestinal peptide. *Methods Enzymol* 2005. 391:377–95.
 - Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharm* 2005. 293:261–70.
 - Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997. 28:5-24.
 - Silvestrini R, et al. In vitro biological activity of Adriamycin. *Tumori* 1970. 56:137-48.
 - Stepensky D, Kleinberg L, Hoffman A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet* 2003. 42:863-81.
 - Stinchcombe TE. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel Cremphor-EL-free formulation of paclitaxel. *Nanomed* 2007. 2:415-23.
 - Stone, V; Johnson, GD; Wilton, JC; Coleman, R; Chipman, JK. Effect of oxidative stress and disruption of Ca^{2+} homeostasis on hepatocyte canalicular function in vitro. *Biochem Pharmacol* 1994. 47:625-32.
 - Torchilin VP. Lipid-core micelles for targeted drug delivery. *Curr Drug Deliv* 2005. 2:319-27.

- Tosi G, Rivasi F, Gandolfi F, Costantino L, Vandelli MA, Forni F. Conjugated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for the preparation of in vivo detectable nanoparticles. *Biomaterials* 2005. 26:4189-95.
- Treat J, Greenspan A, Forst D, Sanchez JA, Ferrans VJ, Potkul LA, Woolley PV, Rahman A. Antitumor activity of liposome-encapsulated doxorubicin in advanced breast cancer: Phase II study. *J Nat. Cancer Inst* 1990. 82:1706–10.
- Uludag H, Yang J. Targeting systemically administered proteins to bone by bisphosphonate conjugation. *Biotechnol Prog* 2002. 18:604-11.
- Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* 2006. 78:620-8.
- Von Baeyer H, Hofmann KA. Acetodiphosphorige saure. *Berichte Dtsch Chem Ges* 1897. 20:1973-8.
- von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, Rubasi HE, Shanbhag AS. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005. 26:6941-9.
- Wang D, Miller SC, Kopecková P, Kopecek J. Bone-targeting macromolecular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005. 57:1049-76.
- Wang K, Allen L, Fung E, Chan CC, Chan JC, Griffith JF. Bone scintigraphy in common tumors with osteolytic components. *Clin Nucl Med* 2005. 30:655-71.
- Wang Y, Lebowitz D, Sun C, Thang H, Grynpas MD, Glogauer M. Identifying the relative contributions of Rac1 and Rac2 to osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2008. 23:260-70.

- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997. 80:1529-37.
- Xu S, Yu JJ. Beneath the minerals, a layer of round lipid particles was identified to mediate collagen calcification in compact bone formation. *Biophys J* 2006. 91:4221-9.
- Yokoyama M, Okano T. Targetable drug carriers: Present status and a future perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 1996. 21:77–80.
- Yoo HS, Lee KH, Oh JE, Park TG. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J Control Release* 2000. 3:419-31.
- Yoo HS, Oh JE, Lee KH, Park TG. Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharmaceutical Research* 1999. 16:1114-18.
- Yu MK, et al. Medical management of skeletal metastasis. *Neurosurg Clin N Am* 2004. 15:529-36.
- Zeng F, Liu J, Allen C. Synthesis and characterization of biodegradable poly(ethylene glycol)-block-poly(5-benzyloxy-trimethylene carbonate) copolymers for drug delivery. *Biomacromolecules* 2004. 5:1810–17.
- Zhang S, Gangal G, Uludağ H. ‘Magic bullets’ for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents. *Chem Soc Rev* 2007. 36:507–31.
- Zhang Y, Kaji N, Tokeshi M, Baba Y. Nanobiotechnology: quantum dots in bioimaging. *Expert Rev Proteomics* 2007. 4:565-72.
- Zunino F, Capranico G. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 1990. 5:307-17.