



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

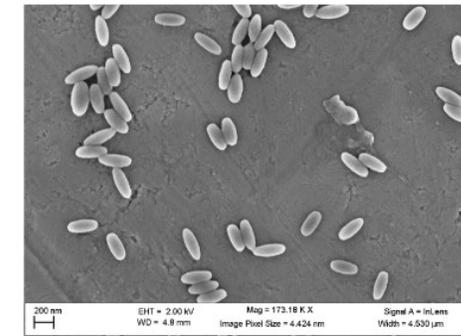
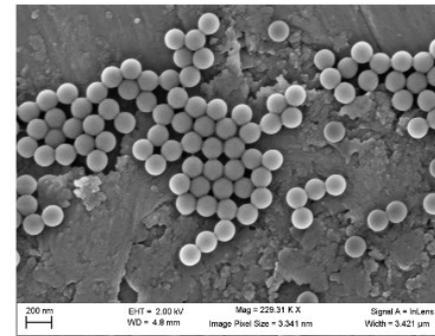
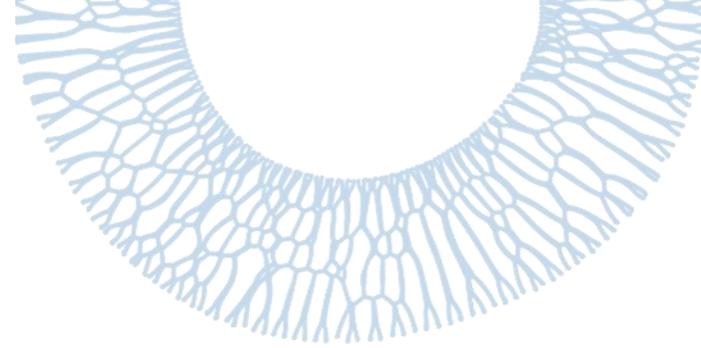
L'IMPORTANZA DELLA FORMA DELLE NANOPARTICELLE NEI SISTEMI DI
SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI

THE IMPORTANCE OF NANOPARTICLES SHAPE IN DRUG DELIVERY SYSTEMS

Tesi di Laurea di:
Doria Noemi

Relatore:
Chiar.ma Galeazzi Roberta

Sessione di Laurea: Dicembre 2024
Anno Accademico 2023/2024



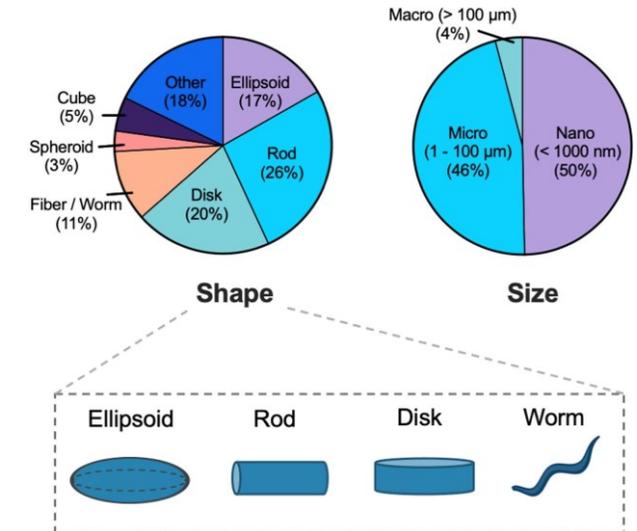
LE NANOPARTICELLE

Con il termine nanoparticella si identifica una particella che possiede dimensioni nanometriche (10^{-9} m), di solito rientrante nel range di 1-100 nm.

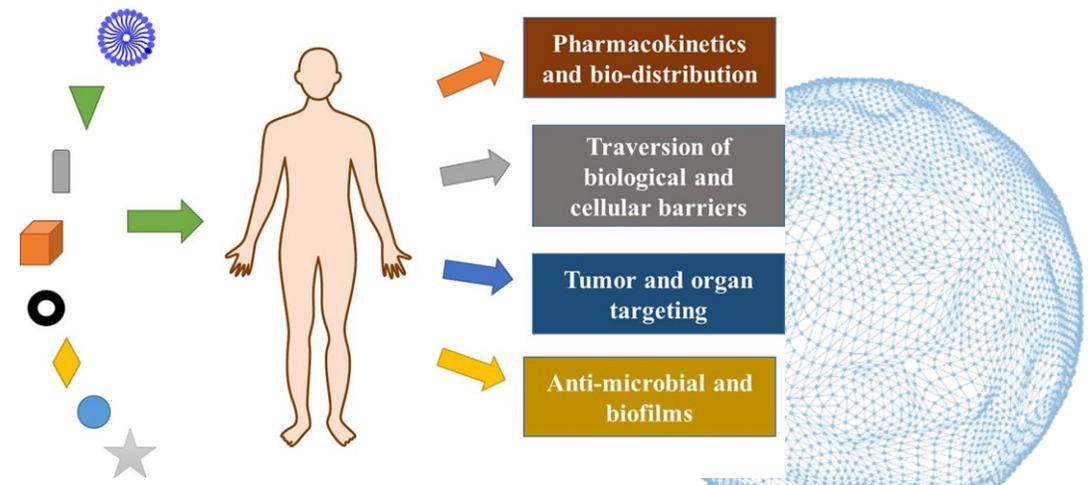
Le nanoparticelle vengono impiegate in diversi settori industriali, tra i quali, quello farmaceutico.

Nel caso specifico dell'applicazione delle nanoparticelle nella somministrazione di farmaci, queste vengono ingegnerizzate per permettere il drug-delivery.

Costanti sono la ricerca e il progresso nel campo della nanoteranostica e della nanomedicina, cercando di migliorare costantemente i profili di sicurezza ed efficacia dei prodotti al fine di sfruttarne l'intero potenziale, arginando quanto più possibile le insidie della traslazione clinica di questi nanomateriali.



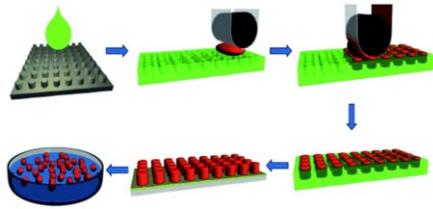
Tuning Nanoparticle Shape for Desired Applications



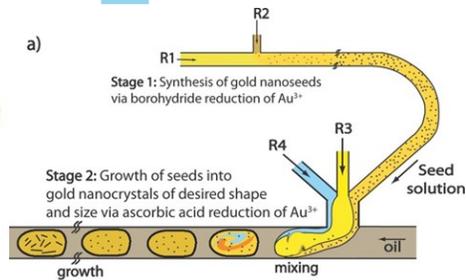
METODI DI FABBRICAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

Le nanoparticelle possono essere fabbricate mediante approcci top-down, anche detti metodi fisici, che prevedono la riduzione delle dimensioni del materiale di partenza fino a raggiungere i nanometri. Altrimenti possono essere utilizzati approcci bottom-up, anche detti metodi chimici, che consentono l'assemblaggio delle particelle a partire da atomi o molecole mediante nucleazione. I limiti maggiori di tutte le tecniche risiedono nella scarsa riproducibilità e nella bassa scalabilità dei processi produttivi, soprattutto perché è ancora molto difficile ottenere le stesse dimensioni e forme delle particelle pur ripetendo le stesse procedure più volte.

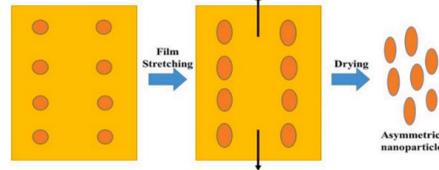
PRINT



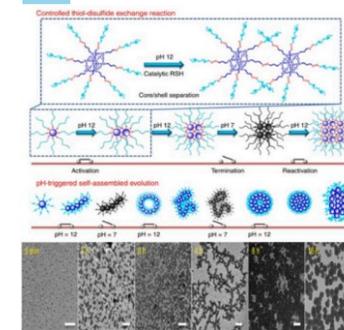
MICROFLUIDICA



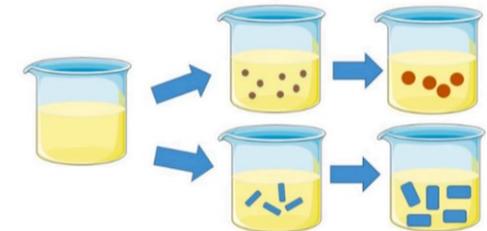
STRETCHING DI MEMBRANA



AUTO ASSEMBLAGGIO



COPRECIPITAZIONE



IMPLICAZIONI DELLA GEOMETRIA DELLE NANOPARTICELLE IN VARI PERCORSI BIOFARMACEUTICI

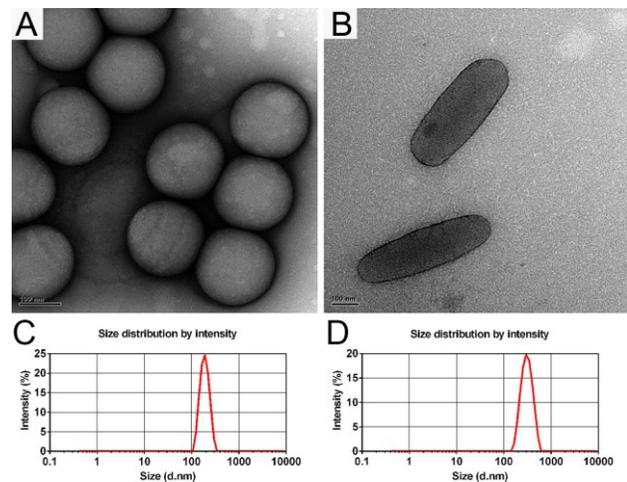


Fig. 1

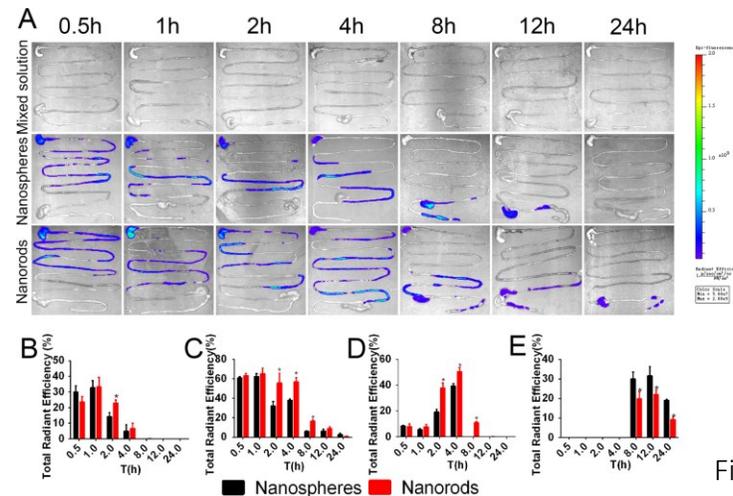


Fig. 2

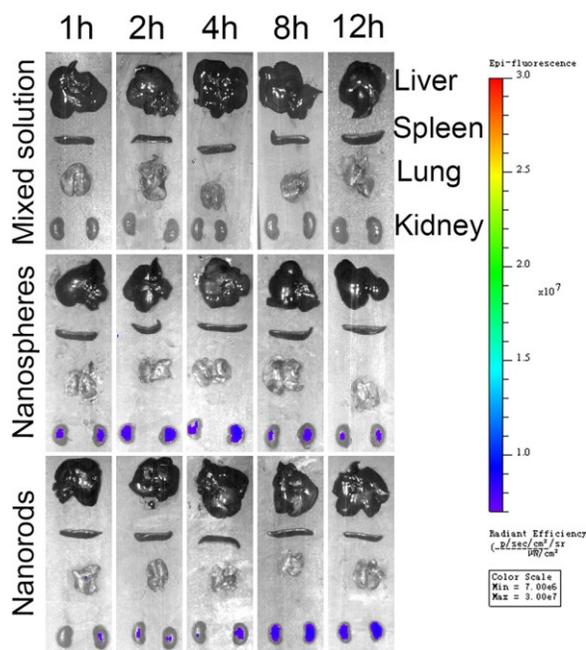


Fig. 3

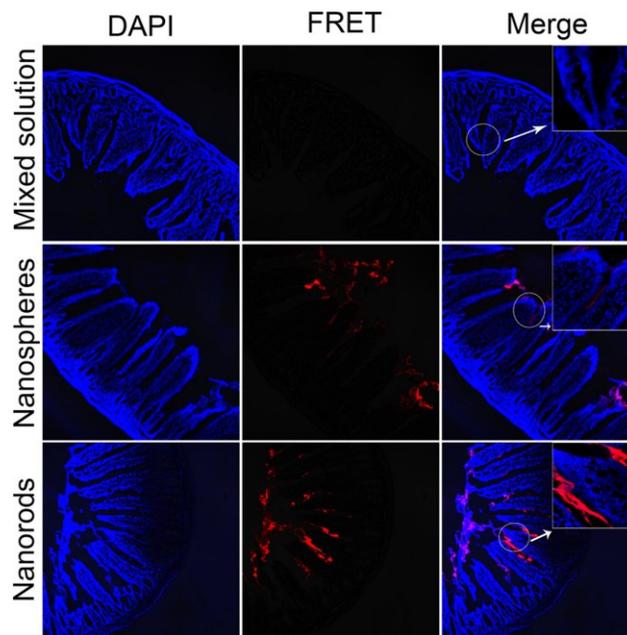


Fig. 4

TRANSITO GASTROINTESTINALE E ASSORBIMENTO

In questo studio è stato indagato il trasporto in vivo di nanobastoncini e nanosfere determinato mediante imaging ex vivo in segmenti gastrointestinali di ratti SD (Fig. 2, A).

Le dimensioni delle nanosfere risultavano nell'intervallo 150-200 nm (Fig. 1, C), mentre i nanobastoncini avevano una lunghezza dell'asse maggiore di 450-500 nm e dell'asse minore di 100-150 nm (Fig. 1, D).

La quantificazione dell'assorbimento è stata misurata rispettivamente in stomaco (Fig. 2, B), duodeno e digiuno (Fig. 2, C), ileo (Fig. 2, D), cieco e colon (Fig. 2, E).

I nanobastoncini hanno mostrato un tempo di ritenzione molto più lungo nel digiuno e nell'ileo rispetto alle nanosfere, il che ha offerto maggiori opportunità di assorbimento intestinale.

È stata analizzata la distribuzione di nanoparticelle anche negli organi reticoloendoteliali, evidenziando soltanto una bassa fluorescenza nel rene. Interessante è il fatto che la fluorescenza nel rene delle nanosfere è stata evidenziata molto tempo prima di quella dei nanobastoncini (Fig. 3). È stata inoltre osservata una sezione di digiuno congelata mediante CLSM (Fig. 4).

Dalle colorazioni è emerso che poche erano le nanosfere presenti sul lato lumenale, mentre molti nanobastoncini erano presenti sulla superficie del villo digiunale ed erano penetrati anche nei villi per aumentare l'assorbimento.

INTERNALIZZAZIONE CELLULARE

In questo studio sono state prodotte nanoparticelle d'oro rivestite di mPEG con 3 geometrie differenti: stella (P-GNS), bastoncino (P-GNR) e triangolo (P-GNT) (Fig. 1). Sono state utilizzate cellule RAW264.7 (monociti macrofagi leucemici di topo) per valutare l'assorbimento e i possibili meccanismi di endocitosi.

Dopo 24 ore di incubazione è stato osservato un assorbimento cellulare dipendente dalla forma: 0,38% per le P-GNS, 2,04% per le P-GNR e 3,33% per le P-GNT (Fig. 2).

Mediante l'uso di inibitori endocitici sono stati studiati i meccanismi coinvolti nell'internalizzazione per le tre diverse forme di nanoparticelle (Fig. 3). I dati mostrano come le P-GNS vengono assorbite tramite endocitosi mediata da clatrina, mentre per le P-GNR sia l'endocitosi mediata da clatrina che dalle caveole/raft lipidico risultano i percorsi più utilizzati. Le P-GNT risultano le nanoparticelle con maggiore assorbimento cellulare grazie ai molteplici percorsi di endocitosi mediante i quali vengono internalizzate, come l'endocitosi mediata da clatrina e quella mediata da dinamina. È risultato fortemente correlato all'assorbimento delle P-GNT anche il riarrangiamento citoscheletrico che avviene durante la micropinocitosi per permettere l'invaginazione della membrana.

IMPLICAZIONI DELLA GEOMETRIA DELLE NANOPARTICELLE IN VARI PERCORSI BIOFARMACEUTICI

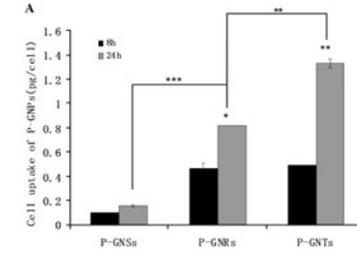
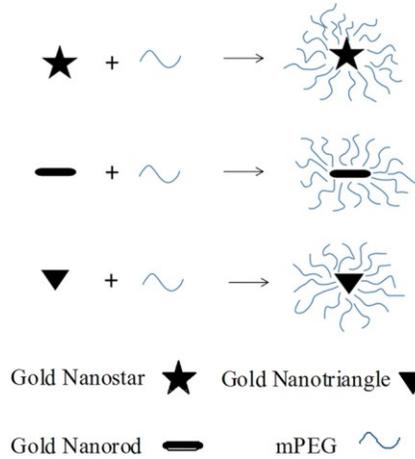


Fig. 1

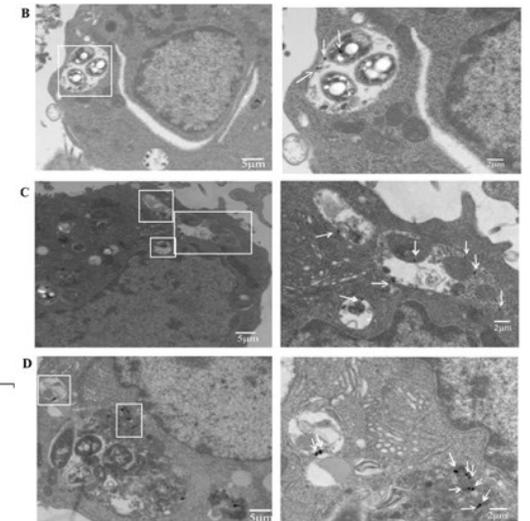
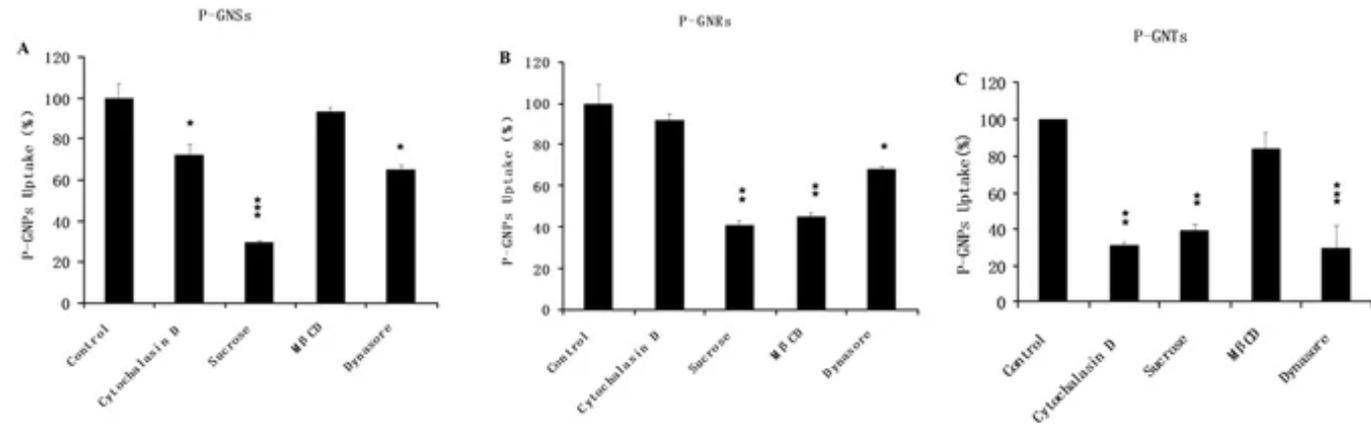


Fig. 2



Inhibitors	Function	P-GNSs	P-GNRs	P-GNTs
Cytochalasin D	Inhibits F-actin polymerization	+	--	++
Sucrose	Inhibits Clathrin-mediated endocytosis	+++	++	++
MBCD	Cholesterol depletion/caveolae	--	++	--
Dynasore	Inhibits Dynamain-GTPase	+	+	+++

Fig. 3

IMPLICAZIONI DELLA GEOMETRIA DELLE NANOPARTICELLE IN VARI PERCORSI BIOFARMACEUTICI

ANALISI DEI DATI

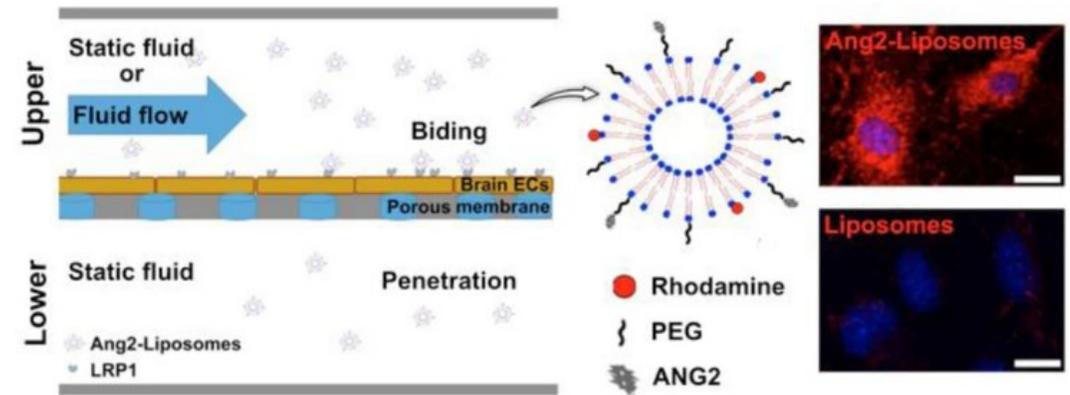
APPLICAZIONE	FORMA 1	FORMA 2	RISULTATI
BBB, polistirene+anti-VCAM, 200 nm	Nanosfera	Nanobastoncino	I bastoncini hanno dimostrato una localizzazione migliorata rispetto le sfere di 2,5 volte per circostanze statiche e 1,5 volte per circostanze dinamiche (microfluidica).
Barriera cutanea, nanoparticelle d'oro legate a PEG-oleilamina, 5-10-40 nm	Nanosfera	Nanobastoncino	L'accumulo dei bastoncini rispetto le sfere è stato 1,9 volte maggiore nell'epidermide e 1,7 volte maggiore nel tessuto adiposo sottocutaneo.
Targeting del tumore, PAMAM-b-OEG (co-dendrimer) caricato con docetaxel, ~ 250 nm	Nanosfera	Nanofoglio	I nanofogli hanno dimostrato una inibizione maggiore del tumore di 2 volte in vitro e 1,3 volte in vivo rispetto le nanosfere. Inoltre hanno avuto un incremento di biodisponibilità e di targeting del tumore 2 volte maggiore rispetto le nanosfere.
Targeting del tumore, nanoparticelle lipidiche, ~ 100 nm	Nanosfera	Nanostella	Le cellule HepG2 hanno confermato un migliore assorbimento delle nanostelle lipidiche rispetto le nanosfere. L'extravasazione tumorale è stata maggiore in vivo per le nanostelle rispetto le nanosfere.

ORGAN-ON-A-CHIP NELLA SPERIMENTAZIONE PRECLINICA DELLE NANOPARTICELLE

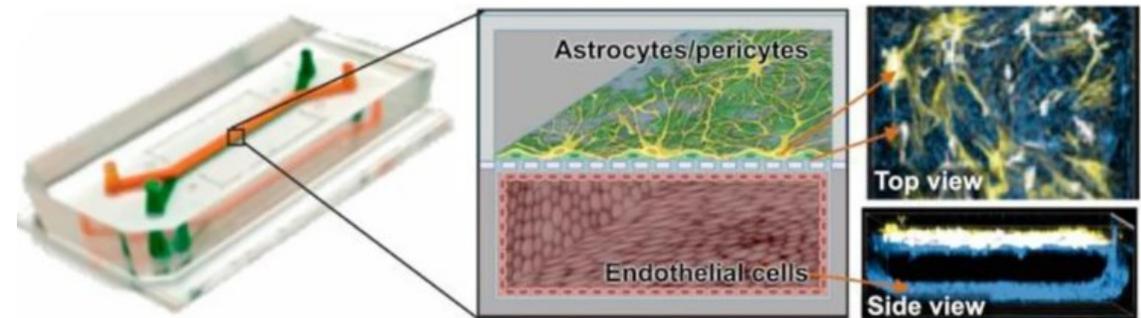
Il modello organ-on-a-chip può complementare la sperimentazione su modelli animali, ad oggi ancora insostituibile, permettendo di utilizzare colture cellulari che simulano interi organi mediante approccio riduzionistico.

Questo modello offre netti vantaggi dal punto di vista dell'accuratezza dei risultati prodotti, ma presenta al tempo stesso enormi limiti essendo in vitro e non in vivo.

Risulta essere un ottimo strumento per studi di efficacia terapeutica e tossicità delle nanoparticelle. Inoltre è stato impiegato in diversi studi, nei quali sono state messe a confronto dimensioni e forme diverse di nanoparticelle, misurando trasporto, accumulo e assorbimento cellulare.



Un modello di barriera ematoencefalica (BBB) con due canali sovrapposti separati da una membrana porosa ha mostrato un legame maggiore dei liposomi modificati con Angiopep-2 (Ang-2) alle cellule endoteliali rispetto a quelli non funzionalizzati.



Un modello di BBB umana su chip con astrociti e periciti del cervello umano nel compartimento superiore del sistema nervoso centrale (SNC) e cellule endoteliali microvascolari del cervello nel compartimento inferiore ha indicato una maggiore capacità dei punti quantici (QD) rivestiti di Ang-2 di muoversi attraverso il canale del SNC senza compromettere l'integrità della barriera rispetto ai QD non modificati.

LE CARENZE DELLE LINEE GUIDA E NORMATIVE COMPROMETTONO LE APPLICAZIONI SPECIFICHE DELLE NANOPARTICELLE DI VARIE FORME

LE ATTUALI NORMATIVE

Le normative che regolamentano la produzione e l'immissione nel mercato dei prodotti classificati come nanomateriali sono state emesse da agenzie quali FDA, OMS, EMEA, ECHA.

L'unico parametro preso in considerazione per la classificazione in ambito di nanomateriali è la dimensione delle particelle (1-100 nm), senza alcuna considerazione della forma o del rapporto tra dimensioni e forme non-sferiche o asimmetriche.

OPPORTUNITÀ NELL'AMPLIAMENTO DELLE LINEE GUIDA

Implementare nelle linee guida indicazioni differenziate sulla base delle varie forme di nanoparticelle permetterebbe una loro migliore applicazione in termini di efficacia terapeutica, consentendo di migliorare farmacocinetica e farmacodinamica, potendo ridurre dosi e frequenza di dosaggio.

I vantaggi si otterrebbero soprattutto a livello di beneficio terapeutico e rapporto costo-beneficio del paziente.

Tutto questo diminuirebbe gli ostacoli, dal laboratorio al letto del paziente, che portano al fallimento terapeutico.



CONCLUSIONI E PROSPETTIVE PER IL FUTURO



IMPLEMENTARE METODI PRODUTTIVI INDUSTRIALI

Migliorare le procedure di fabbricazione delle nanoparticelle asimmetriche, in modo tale da renderle riproducibili e facilitarne la fattibilità industriale, diminuirebbe i costi di produzione e aumenterebbero le possibili applicazioni negli ambiti della nanoteranostica e della nanomedicina.



RICERCA MIRATA SU FORME ANCORA DA ESPLORE

L'attenzione dei ricercatori deve essere volta allo studio del mantenimento del controllo sulla forma e alla selezione appropriata del tipo di nanoparticella per specifiche applicazioni, ma anche allo studio di nuove forme di cui si conosce ancora molto poco.



NUOVE LINEE GUIDA FUTURE

L'ampliamento delle normative, portando a una ridefinizione di nanoparticella tenendo conto anche della forma, potrebbe facilitare molti aspetti di ricerca e sviluppo.

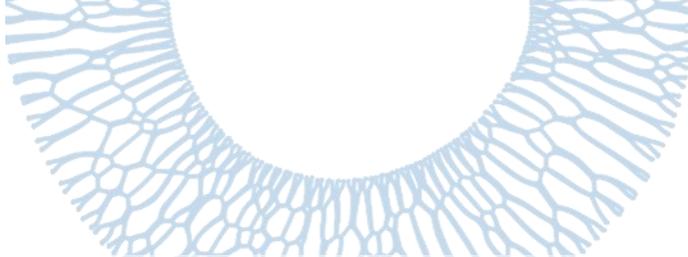
RIEPILOGO ESTESO

Gli studi analizzati suggeriscono che la forma delle nanoparticelle svolga un ruolo importante nella farmacocinetica e nella farmacodinamica in diversi percorsi biofarmaceutici, producendo risultati nettamente differenziati quando forme differenti sono poste in analisi. Tuttavia non è ancora stato possibile mettere a punto dei sistemi di produzione che possano permettere una produzione su larga scala, mantenendo ancora alti i costi, ostacolando quindi la fattibilità industriale e la commercializzazione dei prodotti.

Inoltre il modello organ-on-a-chip è stato utilizzato in studi per valutare l'efficacia, la farmacocinetica e la tossicità di nanoparticelle con diverse forme. È risultato vantaggioso dal punto di vista della sperimentazione pre-clinica offrendo un'ampia accuratezza nonostante sia un modello in vitro con i suoi limiti, motivo per il quale il modello organ-on-a-chip continua ad essere affiancato alla sperimentazione in vivo.

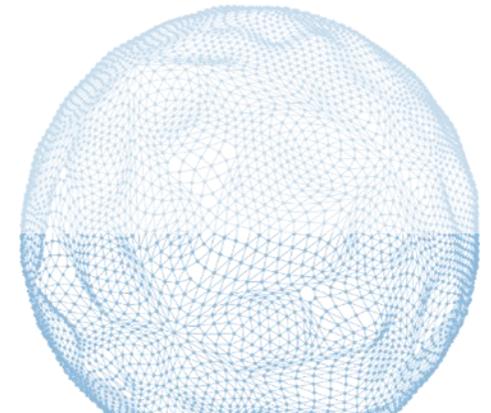
Gli autori hanno evidenziato che sarebbe opportuno ampliare le normative e le linee guida vigenti, per includere differenze morfologiche delle nanoparticelle, al fine di consentire migliori applicazioni per ogni caso specifico e una migliore traducibilità clinica.

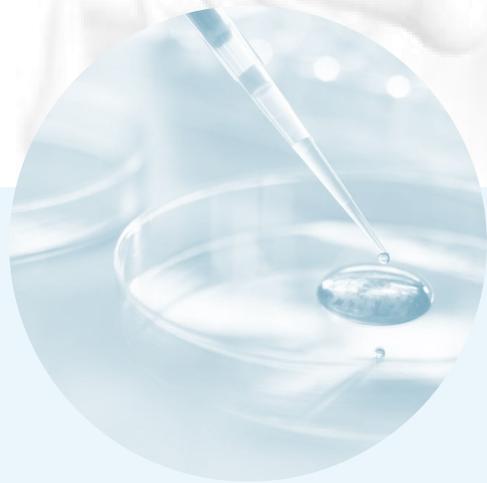




RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI:

- Shah S., Famta P., Bagasariya D., et al. Nanotechnology based drug delivery systems: Does shape really matter?
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122101>
- D. Li, J. Zhuang, H. He, et al. Influence of Particle Geometry on Gastrointestinal Transit and Absorption following Oral Administration
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.7b11821>
- X. Xie, J. Liao, X. Shao, Q. Li, Y. Lin, The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-04229-z>
- A. Da Silva-Candal , T. Brown , V. Krishnan, et al. Shape effect in active targeting of nanoparticles to inflamed cerebral endothelium under static and flow conditions
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365919304134?via%3Dihub>
- P.F. Hsiao , H.C. Tsai , S. Peng, et al. Transdermal delivery of poly(ethylene glycol)-co-oleyamine modified gold nanoparticles: Effect of size and shape
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254058418310186?via%3Dihub>
- Y. Guo , S. Zhao , H. Qiu, et al. Shape of Nanoparticles as a Design Parameter to Improve Docetaxel Antitumor Efficacy
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.bioconjchem.8b00059>
- S. Cao , X. Liu , X. Li, et al. Shape Matters: Comprehensive Analysis of Star-Shaped Lipid Nanoparticles
<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2020.00539/full>
- Kang S., et al. Organ-on-a-chip technology for nanoparticle research
<https://doi.org/10.1186/s40580-021-00270-x>





GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

