



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in  
Biologia Molecolare e Applicata  
CLASSE LM-6

**NANOPARTICELLE LIPIDICHE CATIONICHE  
PER IL DELIVERY DI siRNA**

**CATIONIC LIPID NANOPARTICLES FOR siRNA  
DELIVERY**

Relatore: Chiar.ma  
Prof.ssa Giovanna Mobbili

Tesi di Laurea di:  
Brenda Romaldi

Correlatore: Chiar.ma  
Dott.ssa Cristina Minelli

Anno Accademico 2020/2021



## Sommario

<b>Small Interfering RNA</b> .....	3
1.1 <i>Introduzione</i> .....	3
1.2 <i>siRNA: potenzialità e limitazioni</i> .....	7
1.3 <i>Delivery di siRNA</i> .....	8
1.4 <i>Applicazioni terapeutiche dei siRNA</i> .....	13
<b>Liposomi</b> .....	16
2.1 <i>I liposomi</i> .....	16
2.2 <i>Farmacocinetica e farmacodinamica della molecola</i> .....	21
2.3 <i>Meccanismi di internalizzazione delle nanoparticelle lipidiche</i> .....	22
<b>Materiali e metodi</b> .....	28
3.1 <i>Materiali</i> .....	28
3.2 <i>Preparazione dei liposomi</i> .....	28
3.2.1 <i>Dimensioni e Zeta Potential dei liposomi</i> .....	31
3.2.2 <i>Parametri</i> .....	31
3.3 <i>Elettroforesi su gel d'agarosio</i> .....	36
<b>Esperimenti cellulari</b> .....	39
4.1 <i>Colture cellulari</i> .....	39
4.2 <i>Valutazione dell'efficienza di trasfezione mediante citofluorimetria</i> .....	39
<b>Risultati e discussioni</b> .....	41
5.1 <i>DODAB: bromuro di diottadecildimetilammonio</i> .....	42
5.2 <i>DC-CHOL: DC-cholesterol</i> .....	43
5.3 <i>DOPE: Dioleoylphosphatidylethanolamine</i> .....	44
5.4 <i>GMO: glicerolo mono-oleate</i> .....	46
5.5 <i>Risultati</i> .....	47
5.5.1 <i>Formulazioni lipidiche a base di DOPE:GMO:DC-CHOL</i> .....	48
5.5.2 <i>Formulazioni lipidiche a base di DODAB:GMO con e senza PEG-2000</i> .....	49
5.5.3 <i>Formulazioni lipidiche a base di DOPE:DODAB:PEG-2000</i> .....	51
5.5.4 <i>Efficienza di trasfezione delle formulazioni DOPE:DODAB:PEG-2000</i> .....	52
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	54

## Capitolo primo

### Small Interfering RNA

#### *1.1 Introduzione*

All'interno della cellula sono presenti moltissime tipologie di RNA e l'aspetto più importante è la natura regolatoria che contraddistingue la maggior parte di esse. La regolazione dell'espressione genica, infatti, non è esclusivamente a carico delle proteine (fattori di trascrizione, fattori di traduzione o fattori di splicing), ma può essere anche esercitata da vari tipi di RNA aventi tale capacità o, più spesso, da veri e propri complessi RNA-proteine. In particolare, tra i più potenti tipi di RNA scoperti ci sono senza dubbio i miRNA (micro-RNA) e siRNA (small interfering RNA), che a causa delle loro ridottissime dimensioni, per molto tempo sono passati inosservati, sfuggendo all'attenzione dei ricercatori.

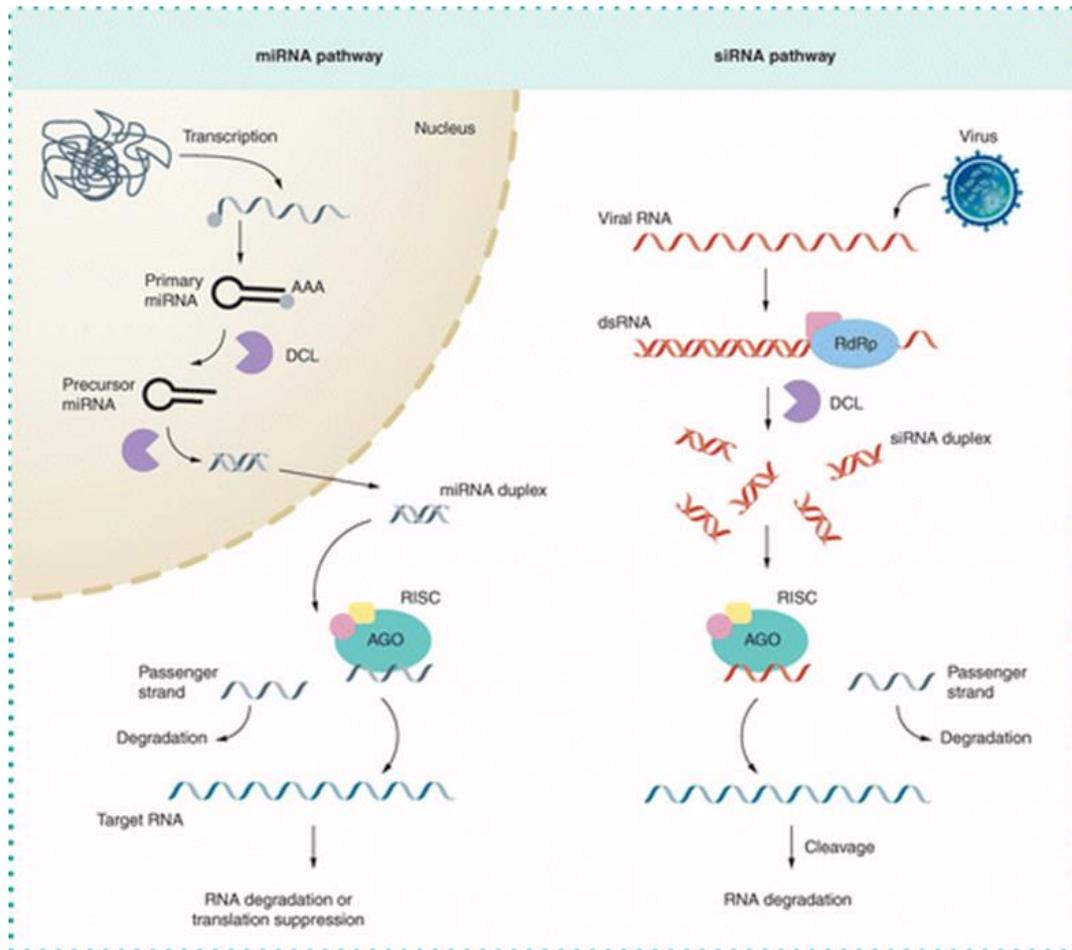
Spesso nei vari approcci sperimentali di purificazione e di isolamento di RNA, queste tipologie venivano considerate dei prodotti di degradazione in quanto avevano dimensioni di circa 22 nucleotidi. Fra questi possiamo distinguere i siRNA e miRNA, ma la principale differenza è che, i miRNA derivano da geni specifici trascritti e processati, ovvero provengono dal genoma, perciò sono endogeni. Al contrario i siRNA derivano da una serie di molecole a dsRNA che possono essere di diversa origine, sia endogeni che esogeni (RNA virali). I dsRNA possono essere quindi usati artificialmente con l'intenzione di bloccare l'espressione del gene. In particolare, i siRNA sono delle molecole che vanno ad interferire con l'espressione di alcuni geni che, nella maggior parte dei casi, sono dei

repressori dell'espressione genica, anche se questo risultato non è valido in assoluto per tutti i siRNA attualmente individuati.

La scoperta dei siRNA venne fatta da ricercatori che stavano lavorando su petunie, essi volevano ottenere dei fiori che fossero tutti viola o con un viola più scuro. Pensarono di transfettare le cellule con delle copie del gene che codificasse per l'enzima calcione sintasi, che è coinvolto nella sintesi del pigmento. Per transfettare le cellule essi non fecero uso di un vettore ma usarono in prima istanza il DNA per poi passare direttamente all'utilizzo dell'RNA. I ricercatori erano a conoscenza del fatto che con poche aggiunte del gene, che codifica per l'enzima calcione sintasi, sarebbero stati in grado di ottenere fiori con una colorazione più intensa. Il risultato fu però del tutto inaspettato, i ricercatori ottennero infatti dei fiori con chiazze bianche. Tale risultato poteva essere spiegato ammettendo che l'aggiunta di RNA, anziché produrre più enzima, che avrebbe dovuto aumentare la quantità di pigmento, ne aveva in qualche modo inibito la sintesi. Una volta scoperto e compreso meglio il meccanismo di funzionamento di questi RNA, sono stati fatti degli esperimenti in *Caenorhabditis elegans* per verificare l'attività di silenziamento. Furono effettuate trasfezioni con ssDNA dirette contro uno specifico gene, ma non si ottenne il silenziamento del gene o fu molto limitato. Le stesse molecole di RNA, più precisamente dsRNA, ovvero miscele di RNA senso-antisense della stessa molecola di RNA appaiata con il suo complementare, portarono ad un silenziamento molto più efficiente. I ricercatori fecero molti tentativi e scoprirono che il motivo per cui si erano ottenuti fiori con chiazze bianche era dovuto al fatto che gli RNA, che si pensava fossero a singolo filamento, in realtà erano contaminati dal filamento complementare e, la presenza dei doppi

filamenti, non permetteva di ottenere l'espressione del gene: così furono scoperti i siRNA.<sup>[1]</sup>

Per quanto riguarda le proteine che partecipano a questo processamento sono coinvolte DICER e DROSHA, che presentano due domini catalitici piuttosto simili, sono siti a livello dei quali viene espletata l'attività catalitica di taglio. Sono coinvolti anche altri domini collocati all'estremità N-terminale della proteina. In particolare, DROSHA è contraddistinta dalla presenza di domini con regioni ricche in prolina o arginina e serina mentre DICER presenta domini elicasici o ATPasici a questo livello. Per quanto riguarda il modello di funzionamento di DICER, sono presenti due siti catalitici che determinano il punto di taglio, uno su un filamento e l'altro sul complementare. Di conseguenza, oltre a DROSHA, che è in grado di legare specificatamente i miRNA, anche DICER può svolgere una funzione analoga grazie alla presenza di un dominio di legame all'RNA noto come PAZ. Quest'ultimo riconosce l'RNA proprio nella regione dello stem loop, in particolare questo dominio è importante perché riconosce l'estremità rilasciata prima da DROSHA (quella con l'estremità 3' più lunga rispetto alla 5').



**Figura 1.** Componenti della cascata RNAi fondamentali per la maturazione dei complessi miRNA e siRNA negli esseri umani

Alcuni dei domini presenti in DROSHA e DICER sono condivisi anche dalla famiglia delle proteine argonata (Ago1 e Ago2 sono le più studiate). Un importante dominio condiviso da tutti questi elementi è noto come dominio Piwi e presenta un folding molto simile a quello delle RNasi H, enzimi in grado di tagliare duplex ibridi RNA-DNA. Esiste una categoria di proteine, della famiglia argonata, caratterizzata dalla prevalenza di domini Piwi e proprio in virtù di questi domini, sono definite proteine Pi. [2]

## *1.2 siRNA: potenzialità e limitazioni*

Come accennato precedentemente, la potenzialità di questa tipologia di RNA risiede nel meccanismo di silenziamento genico dell'RNAi endogeno che può essere indirizzato per regolare artificialmente i geni di interesse. Il complesso RISC viene attivato con l'introduzione di un effettore RNAi attivo e il rilascio di tale effettore in una cellula determina un abbattimento potente e specifico del suo bersaglio. Teoricamente i siRNA possono essere progettati per qualsiasi gene di interesse sulla base della sola sequenza di mRNA bersaglio. Tale potenziale "illimitato" ha reso gli RNAi la strategia di knockdown genica preferita nelle cellule di mammifero. L'aspetto più importante è che il silenziamento, basato sull'RNAi, può potenzialmente essere applicato per progettare promettenti terapie per un vasto numero di malattie umane causate da uno o pochi geni, come difetti genetici, malattie virali, malattie autoimmuni e tumori. Inoltre, mentre i miRNA non sono targettizzabili per i geni di scelta come lo sono gli siRNA, molti miRNA endogeni funzionano come oncogeni e quindi essi stessi possono servire come bersagli terapeutici.

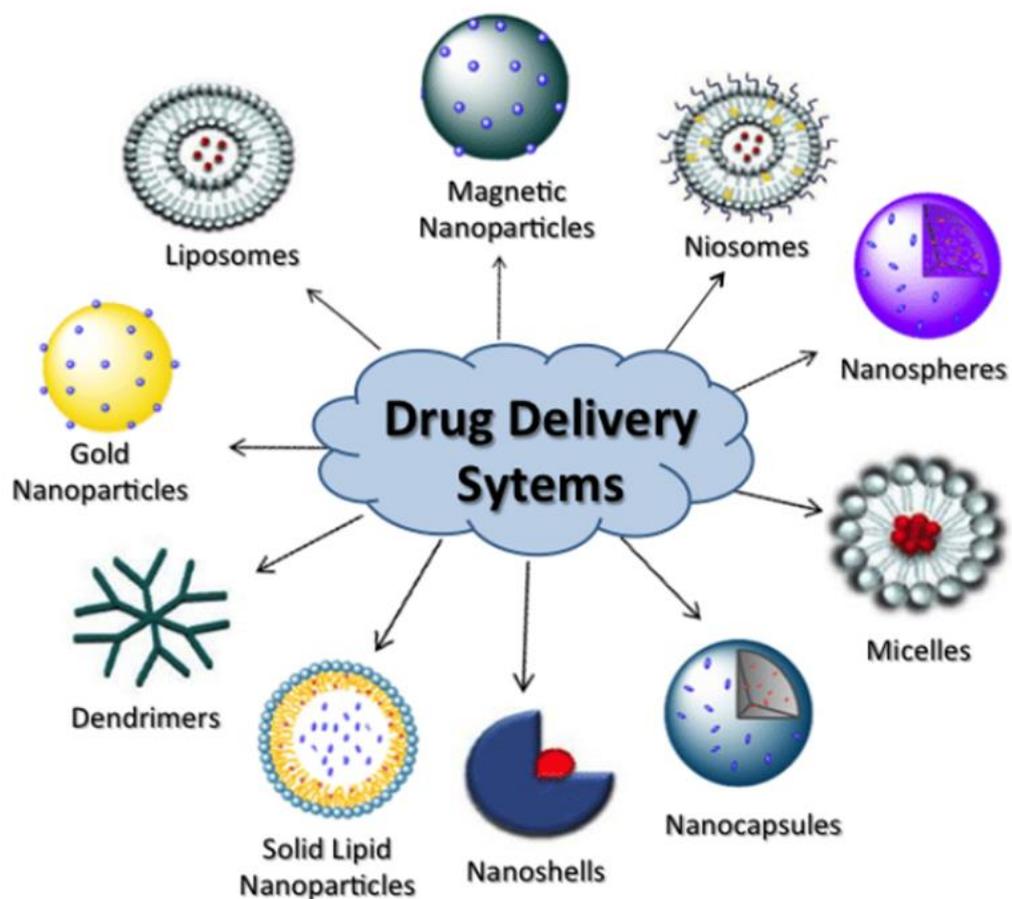
La potenza è una considerazione molto rilevante nella progettazione dei farmaci e, un altro vantaggio dell'RNAi, consiste nel fatto che è significativamente più potente di altre tecnologie antisense a base di acidi nucleici. A causa del fatto che un singolo filamento guida di siRNA può essere riciclato per diversi cicli di scissione dell'mRNA, il percorso RNAi può raggiungere un'efficienza importante con il giusto trigger. L'efficienza del silenziamento mediato da RNAi per un particolare gene può variare considerevolmente e molti fattori sono implicati nell'efficacia di un dato siRNA. Gli RNAi fanno uso di un complicato processo biologico endogeno che dipende da una serie di interazioni specifiche tra le molecole

effettrici e il meccanismo naturale. La capacità di comprendere queste interazioni è indispensabile per la progettazione di siRNA mentre è noto che caratteristiche come la stabilità termodinamica delle estremità, l'accessibilità del bersaglio, caratteristiche relative alla posizione e altre proprietà strutturali svolgono una funzione la cui conoscenza attuale è ancora limitata. Per quanto concerne la stabilità termodinamica dell'estremità, dobbiamo pensare, che, come per la costruzione di primer o sonde, la percentuale di coppie di GC dovrebbero essere circa il 30-50% o al massimo 30-70%, non devono essere presenti consecutivamente più di 4 C o G, in quanto la troppa stabilità termodinamica fornita da queste basi può interferire con il processo di silenziamento. Inoltre, una maggiore stabilità ad entrambe le estremità 3' protrudenti dei siRNA viene fornita da due nucleotidi (dTdT), in quanto sono più resistenti all'attacco delle nucleasi. Un siRNA ottimale è dotato di; una bassa stabilità all'estremità 5'antisenso e maggiore stabilità all'estremità 5'senso; l'estremità 5'antisenso è quindi dotata di una maggiore flessibilità, ciò guida il RISC nel corretto svolgimento del siRNA e trattenimento del filamento antisenso. Una migliore comprensione di queste caratteristiche potrebbe un giorno portare a siRNA super-attivi che richiedono un minore accumulo del siRNA nel sito bersaglio per espletare la loro funzione biologica. Le potenziali limitazioni della terapia con siRNA potrebbero essere: l'attivazione del sistema immunitario, effetti off-target e la saturazione di vie di silenziamento endogene (miRNA). [3]

### *1.3 Delivery di siRNA*

Per drug delivery si intende un insieme di approcci, formulazioni, tecnologie e sistemi di veicolazione di farmaci in siti specifici

dell'organismo per ottimizzare l'effetto terapeutico. Negli ultimi anni, il miglioramento e il perfezionamento nelle tecniche di somministrazione dei farmaci sono stati un fattore di notevole importanza per l'approvazione di nuove terapie e per ottenere con precisione gli effetti terapeutici desiderati quindi, migliore è la somministrazione e maggiore l'efficienza del farmaco. Questi progressi hanno portato allo sviluppo di nanomateriali e nanostrutture innovative.



**Figura 2.** Esempi di sistemi di trasporto impiegati nel drug delivery

Aumentare la disponibilità di sistemi di trasporto (*carriers*) potrebbe ampliare il numero di molecole utilizzabili dato che spesso non possono

essere sperimentate o usate efficacemente a causa di problemi riguardanti la loro metabolizzazione da parte della cellula. Le tecnologie di trasporto di farmaci spesso utilizzano nanosistemi in grado di incapsulare la molecola bioattiva e di modificarne diversi aspetti quali assorbimento, profilo di rilascio, eliminazione e distribuzione. Le principali vie di somministrazione utilizzabili per introdurre un farmaco in un organismo vivente sono quella gastrointestinale, topica, orale, inalatoria e parenterale. A causa della potenziale degradazione enzimatica o del mancato assorbimento nella circolazione sistemica, che potrebbe essere dato dalle dimensioni molecolari o dalla carica della molecola, queste vie non possono essere sfruttate per la somministrazione di numerosi farmaci come peptidi, vaccini, farmaci a base genica e anticorpi. Le nanoparticelle per il trasporto dei farmaci si suddividono in organiche e inorganiche a seconda del tipo di materiale utilizzato e sono classificate in base alla tipologia di bersaglio (*targeting*) che può essere attivo o passivo. Infatti, un vantaggio importante del drug delivery è la capacità di poter indirizzare il rilascio del farmaco in una specifica zona, in questo modo si evitano effetti potenzialmente nocivi nei confronti di organi non direttamente interessati. Questa metodologia, chiamata *targeted drug delivery*, risulta essere molto sfruttata nel trattamento del cancro.

Un efficiente sistema di trasporto deve poter evitare i meccanismi di difesa dell'ospite e avere la capacità di raggiungere il sito d'azione previsto. Esistono diverse formulazioni a rilascio prolungato tra cui ricordiamo liposomi, cubosomi, farmaci coniugati a polimeri e microsfele caricate con il farmaco. In virtù della natura anionica e idrofila i siRNA sono incapaci di entrare nella cellula mediante meccanismi di diffusione passiva, meccanismo in cui le molecole si muovono liberamente secondo il proprio gradiente di concentrazione. Il rilascio in vitro/in vivo di siRNA

non coniugati per i siti di destinazione rimane una barriera sostanziale e causa un assorbimento inefficace da parte dei tessuti, una limitata penetrazione attraverso l'endotelio capillare, l'eliminazione renale e una rapida degradazione enzimatica nel plasma. Per far fronte a queste problematiche risulta indispensabile lo sviluppo di sistemi di trasporto efficaci. La consegna di siRNA non modificato, nelle colture cellulari, di solito porta a un knockdown inefficace del gene bersaglio; ad esempio, nelle cellule di mammifero che mancano del meccanismo operativo di assorbimento del dsRNA, che è invece presente in molte altre specie come *C. elegans*, i siRNA non riescono ad attraversare prontamente i doppi strati lipidici delle membrane plasmatiche poiché sono molecole polianioniche idrofile con un'area superficiale relativamente ampia.

Rispetto al DNA plasmidico (pDNA), i siRNA entrano nelle cellule per via endocitica, vengono quindi trasportati in endosomi e/o lisosomi, all'interno dei quali essi sono vulnerabili alla degradazione da parte delle nucleasi, a causa dell'ambiente acido presente all'interno di entrambe le vescicole (pH 5-6.5). Inoltre, i lisosomi sono provvisti di idrolasi, (*ribonucleasi, desossiribonucleasi, fosfatasi acida, fosfodiesterasi e pirofosfatasi*) enzimi che possono degradare i siRNA rendendoli incapaci di indurre RNAi. Si è osservato che la localizzazione di siRNA sintetici trasportati all'interno della cellula da liposomi è limitata alle regioni perinucleari in cui sono localizzati; tale comportamento potrebbe limitare l'entrata nel nucleo anche in seguito ad un'incubazione prolungata. Diversamente, i siRNA introdotti direttamente nel citosol, sfruttando metodi fisici come ad esempio l'iniezione diretta, manifestano un'entrata nel nucleo più rapida che permette di ottenere un ulteriore sito per l'attività di siRNA oltre al citoplasma. Sulla base di questo risultato, i siRNA sintetici o espressi a livello intracellulare possono essere utilizzati per

somministrare siRNA nelle cellule di mammifero. Il siRNA espresso intracellulare viene prodotto in seguito all'introduzione nelle cellule di informazioni genetiche codificate da pDNA o siRNA virale. Il rilascio di DNA codificanti è però più complicato da ottenere, rispetto a quello degli RNA codificanti, perché richiede il rilascio nel nucleo dove, il sito per il costrutto di DNA codificato viene trascritto. Diverse strategie sono state sviluppate per il rilascio di siRNA intracellulare, come l'incorporazione di siRNA in liposomi o polimeri cationici, la manipolazione di vettori virali e la modificazione dell'integrità della membrana cellulare per mezzo di metodi fisici, compreso l'inserimento di siRNA nelle cellule, magnetofection o l'indebolimento della barriera della membrana cellulare per elettroporazione o ultrasuoni. Tuttavia, è noto che metodi fisici come l'elettroporazione riducano la vitalità cellulare a meno del 60%.

Inoltre, è stato dimostrato, che un certo numero di fattori cellulari influenzano la trasfezione di siRNA nelle cellule di mammifero, incluso il tipo stesso di cellula. Nel caso di trasportatori cationici, come i liposomi, è stata evidenziata anche la loro compatibilità con il mezzo di crescita, che mostra un impatto sull'efficienza della trasfezione di siRNA, oltre a fattori noti, come gli effetti citotossici e le caratteristiche fisiche delle particelle cationiche. Oltre alle piccole dimensioni, le particelle cationiche devono essere progettate per facilitare l'assorbimento cellulare tramite endocitosi e capacità di sfuggire alle vescicole endolisomiali. Recenti studi, evidenziano lo sviluppo di veicoli efficienti per la somministrazione di siRNA, in grado di sfuggire alle vescicole endolisomiali. Si tratta di polimeri "intelligenti" in grado di rispondere a determinati stimoli come, il cambiamento del pH nell'ambiente circostante, attualmente utilizzato per migliorare l'efficacia del silenziamento genico. Un esempio dell'utilizzo di questo innovativo approccio prevede l'utilizzo della poli

(allilamina cloridrato)-anidride citracronica (PAH-Cit) la quale è stata sviluppata per indurre il disassemblaggio di nanocomplessi multistrato (MLN) e facilita la loro fuga nel citosol attraverso un'inversione di carica del PAH-Cit, innescata dal pH acido (pH 5) degli interni lisosomiali. Lo *Swelling/Deswelling* (fenomeni fisici che causano rispettivamente il rigonfiamento o non dei polimeri) e la degradazione dei sistemi polimerici sono varie risposte riportate in seguito ad uno studio precedente di Han e Yin., è stata inoltre facilitata la loro fuga dal citosol attraverso un'inversione di carica della PAH-Cit, questa inversione di carica è innescata dall'acidità (pH 5,0) degli interni endolisosomiali. Inoltre, anche le nanoparticelle d'oro modificate (AuNP) sono state sviluppate come strategia per superare i problemi di scarsa stabilità dei siRNA e il basso assorbimento cellulare. [2]

#### *1.4 Applicazioni terapeutiche dei siRNA*

Il silenziamento genico mediante interferenza dell'RNA (RNAi) rappresenta uno strumento promettente per il trattamento di diversi tipi di patologie caratterizzate da cambiamenti di espressione genica. Un esempio importante è rappresentato dalle malattie oncologiche in cui l'alterazione nell'espressione dei geni definiti protooncogeni e oncosoppressore, si rendono responsabili dell'iniziazione e sviluppo del processo tumorale. In questo contesto, i siRNA possono essere utilizzati per disattivare particolari geni cancerogeni. Questi, possono essere utilizzati per determinare il silenziamento di specifici geni, che portano alla produzione di proteine dannose o anormali. [4]

I siRNA trovano potenziale applicazione anche nel trattamento di altre patologie quali: infezioni virali, malattie genetiche di varia natura, disturbi autoimmuni e cardiovascolari.

Per quanto riguarda le malattie di origine virale la tecnologia RNAi offre diversi vantaggi rispetto al trattamento tradizionale che fa uso di farmaci antivirali, in particolare a causa dell'elevata efficienza e specificità quando esso viene sfruttato a diversi stadi dell'interazione ospite-virus. I ricercatori hanno studiato la tecnologia RNAi nel trattamento dell'infezione da virus dell'epatite B (HBV). Nel fegato, in particolare negli epatociti, è stata raggiunto un calo del 99% relativo agli antigeni centrali dell'epatite B. L'efficienza dei siRNA nell'inibire la replicazione virale è stata studiata in diversi sistemi replicone, anche per il virus dell'epatite C, patogeno responsabile di una malattia epatica cronica, con conseguente sviluppo di carcinoma epatocellulare e cirrosi epatica. Questo virus colpisce circa il 3% della popolazione a livello globale. I risultati più promettenti erano relativi ai siRNA mirati contro le regioni non tradotte nel genoma virale o non strutturali, siti di ingresso delle proteine e dei ribosomi interni. Inoltre, siRNA mirato all'HCV sembra essere attivo contro le linee cellulari di epatoma umano che si riproducono costantemente repliconi di HCV.

In un altro studio, il siRNA è stato segnalato per il trattamento dell'epatite fulminante in vivo a base di anti-Fas specifici. Dieci giorni dopo la somministrazione di siRNA anti-Fas, si è manifestata una sopravvivenza dell'82% questo tasso è stato osservato nei topi trattati, mentre la morte dei topi non trattati e del controllo si sono verificati entro tre giorni. Gli RNAi possono essere impiegati anche per colpire il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), grazie a una migliore comprensione del profilo di espressione genica e del ciclo di vita del virus. Ad esempio,

L'RNAi è stato utilizzato per regolare in modo efficiente cofattori cellulari come il fattore nucleare-kappa B e il recettore dell'HIV CD4, responsabile dell'inibizione della replicazione del virus. Inoltre, l'ottenimento dell'inibizione della replicazione si è verificata in cellule primarie contenenti linfociti T, cellule staminali ematopoietiche derivate e macrofagi, così come molte altre linee cellulari umane. I virus potrebbero sviluppare resistenza ai farmaci antivirali. Questo può verificarsi in metodi basati su RNAi in quanto, un singolo siRNA nella regione mirata può accidentalmente consentire la sfuggita dei virus dalla via RNAi. Quest'ultimo effetto è stato osservato in diversi virus come il poliovirus, HIV-1 e HCV. Diverse tecniche potrebbero essere applicate per evitare questo problema, utilizzando pool di siRNA o prendendo di mira le regioni non tradotte di virus a RNA che sono di importanza vitale per la replicazione virale e sensibili alla mutazione. Diversamente dai virus, l'uso di siRNA non risulta essere proficuo per inibire l'infezione batterica, in quanto i batteri si riproducono in gran parte all'esterno delle cellule ospiti senza coinvolgere il macchinario cellulare della cellula ospite. Tuttavia, ci potrebbero essere siRNA usati come agente potenziale per ridurre gli effetti avversi relativi alle risposte immunitarie dell'ospite e dai geni dell'ospite coinvolti nell'invasione batterica, ad esempio determinando una riduzione dell'espressione delle citochine proinfiammatorie. I ricercatori in seguito a questo studio hanno concluso dichiarando che i siRNA sembrano essere un approccio promettente e innovativo per combattere le infezioni batteriche e ceppi particolarmente resistenti.

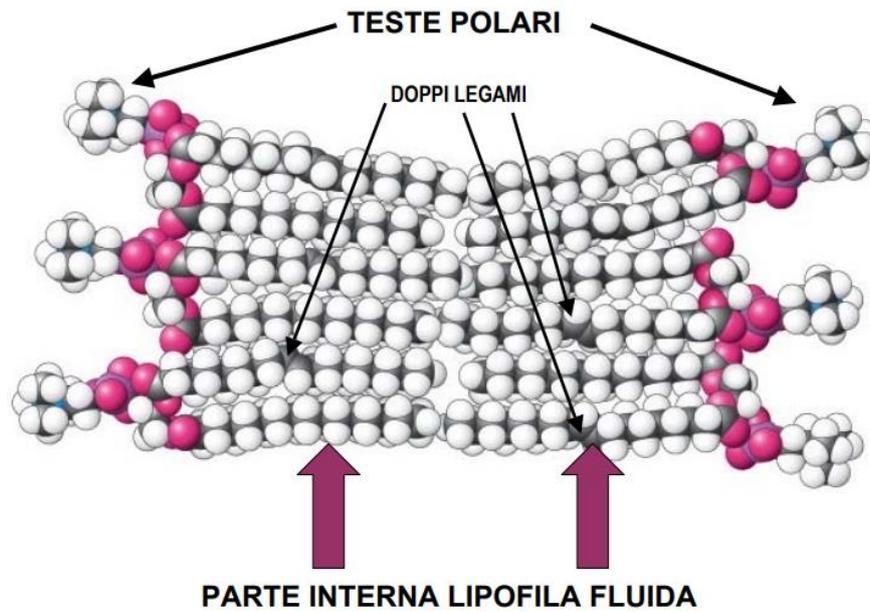
Ad oggi, si contano oltre 30 studi clinici che coinvolgono l'applicazione di miRNA e siRNA, riportando il loro uso nel trattamento di infezioni virali, tumori, malattie respiratorie e degenerazione maculare. [2]

## Capitolo secondo

### Liposomi

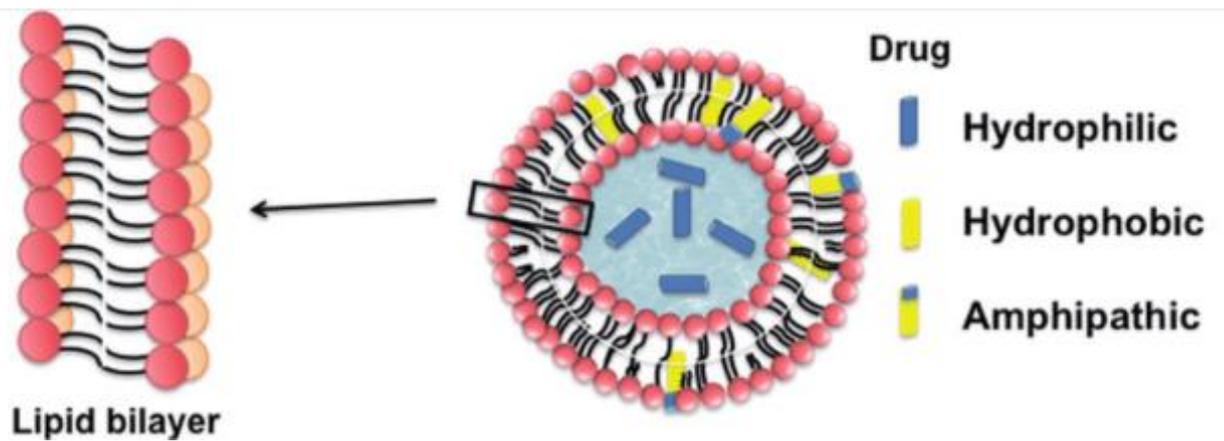
#### 2.1 I liposomi

Nell'ambito della ricerca sulle nanotecnologie applicate al drug delivery, è stata studiata e realizzata una grande varietà di vettori. I liposomi sono un esempio di vettore colloidale. Essi si presentano sotto forma di vescicole artificiali sferiche, costituite da uno o più strati fosfolipidici idratati; la struttura chimica dei fosfolipidi permette loro di autoassemblare e formare sistemi supramolecolari quando vengono dispersi in acqua. I lipidi che costituiscono i liposomi, infatti, in virtù del fatto che presentano una porzione idrofilica e una idrofobica sono detti *anfifilici*: quando vengono posti in un ambiente acquoso, essi si organizzano in modo da far interagire le code idrofobiche tra di loro ed esporre le teste idrofiliche verso l'ambiente acquoso, mimando il bilayer fosfolipidico della cellula. Il doppio strato fosfolipidico, chiudendosi, intrappola il solvente acquoso al suo interno, formando piccole vescicole.



*Figura 3. Doppio strato lipidico, disposizione delle teste idrofiliche e delle code idrofobiche*

Tali vescicole possono trasportare farmaci idrofilici o lipidici, posizionati in differenti porzioni del vettore, a seconda della struttura chimica della molecola incapsulata. Molecole fortemente lipofile sono intrappolate quasi totalmente nel doppio strato lipidico, mentre strutture fortemente idrofile sono localizzate nel compartimento acquoso; composti con caratteristiche di idrofilicità e idrofobicità intermedie, possono distribuirsi nelle due fasi e all'interfaccia doppio strato lipide-acqua.



**Figura 4.** *Diverse modalità di incapsulamento delle molecole*

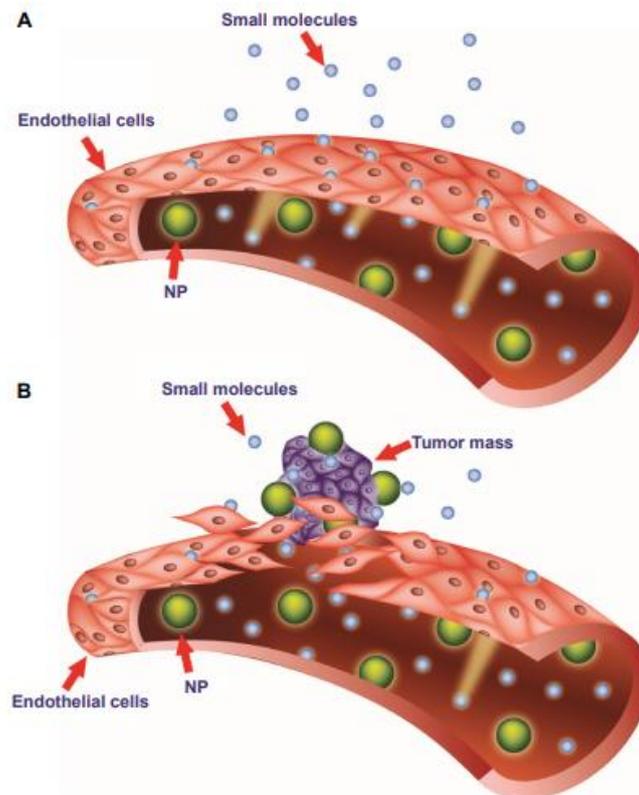
La farmacocinetica della molecola somministrata può essere ottimizzata variando la struttura dei liposomi, che influisce sull'uptake, la stabilità e la clearance del principio attivo in essi incapsulato.

È stato osservato che liposomi di diametro più piccolo, 100 nm, interagiscono meno con le proteine plasmatiche, sfuggono alla cattura da parte del sistema reticoloendoteliale (RES), hanno un'emivita più lunga nel sangue e vengono accumulati per targeting passivo nel sito tumorale. Le dimensioni delle giunzioni endoteliali nei tessuti tumorali, infatti, possono raggiungere i 100 nm mentre nei tessuti sani sono attorno agli 8 nm. Nei tumori solidi, inoltre, il drenaggio linfatico non è efficiente e conseguentemente macromolecole e nanoparticelle si accumulano nel microambiente tumorale. Tale fenomeno viene definito EPR (Enhanced Permeability and Retention Effect). Contrariamente ai liposomi ed altre nanoparticelle, i farmaci a basso peso molecolare non vengono trattenuti nei tessuti tumorali per un lungo periodo di tempo e rientrano in circolo. L'effetto EPR può quindi essere sfruttato per dirigere secondo un targeting passivo nanopreparazioni nei siti tumorali. [6]

Al contrario, liposomi di dimensione maggiore, sono eliminati più rapidamente dalla circolazione sanguigna e non sfuggono all'assorbimento del sistema reticoloendoteliale. La dimensione di questi sistemi di somministrazione dei farmaci può essere facilmente modulata. Teoricamente un liposoma ideale progettato per la somministrazione di chemioterapici dovrebbe essere di 50-100 nm di diametro. Il limite di dimensione inferiore a 50 nm dovrebbe impedire a nanovettori somministrati per via endovenosa di penetrare casualmente dalle pareti normali dei vasi durante la circolazione. È stato inoltre riportato che liposomi PEGilati<sup>1</sup> con un diametro di 250 nm, vengono rimossi dalla circolazione più rapidamente, rispetto ai liposomi con un diametro di 100 nm con la stessa composizione lipidica; tale comportamento compromette l'efficacia del principio attivo. Gran parte dei farmaci antisense possono essere modificati chimicamente per potenziare le loro caratteristiche farmacologiche e favorire il targeting passivo dei tessuti di interesse. Potenziando ad esempio il legame dell'agente terapeutico alle proteine plasmatiche si diminuisce la clearance, si aumenta il tempo di circolazione e il numero di passaggi del sangue attraverso il target. <sup>[7]</sup>

---

<sup>1</sup> Il rivestimento di PEG fa sì che il liposoma non venga riconosciuto dal sistema immunitario.

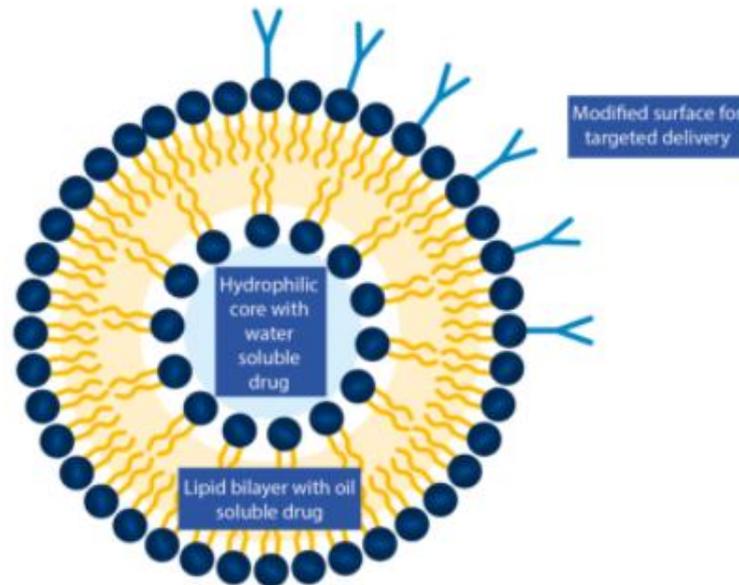


**Figura 5.** Targeting delle nanoparticelle grazie all'aumento della permeabilità e dell'effetto di ritenzione. Differenze tra endotelio cellulare normale A) e tumore B)

Le vescicole liposomiali possono essere anche decorate sulla superficie con molecole specifiche; inserendo, ad esempio, un anticorpo riconosciuto da un recettore specifico che è sovraespresso nelle cellule tumorali, si ottiene un sistema di drug delivery selettivo per una specifica cellula bersaglio. Tale modifica permette un accumulo selettivo del farmaco nei tessuti tumorali e consente di ottenere un effetto citotossico utilizzando dosi ridotte; la strategia di *active targeted delivery* favorisce una diminuzione degli effetti indesiderati quali nausea e vomito. Inoltre, essendo costituiti principalmente da fosfolipidi, i liposomi possono essere

introdotti nell'organismo senza provocare reazioni immunitarie di rigetto.

[5]



**Figura 6.** Rappresentazione di un liposoma bilamellare

## 2.2 Farmacocinetica e farmacodinamica della molecola

I vantaggi di farmaci a base di liposomi sono: una maggiore solubilità del carico, un aumento dell'emivita, una potenziale consegna selettiva al sito di azione, un indice terapeutico migliore e la capacità di superare la resistenza contro i chemioterapici. Quando un agente terapeutico viene caricato nei liposomi, teoricamente diviene un'unica entità con il suo vettore; di conseguenza, i liposomi possono modificare sia la distribuzione tissutale che la velocità di eliminazione del farmaco caricato.

La farmacocinetica del sistema liposoma-molecola bioattiva dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche del veicolo lipidico quali composizione

lipidica, dimensione, impaccamento, stabilizzazione sterica, carica superficiale.

Una volta all'interno dell'organismo, la stabilità dei liposomi nel flusso sanguigno, così come la loro capacità di entrare nei tessuti bersaglio, determina il destino della molecola trasportata. Durante la loro circolazione nel sangue, i liposomi incontrano le proteine plasmatiche, come opsonine, HDL e LDL.

Le opsonine includono vari tipi di proteine come le immunoglobuline e la fibronectina, che aiutano il RES a riconoscere ed eliminare i liposomi. L'interazione di HDL e LDL con i liposomi ne riduce la stabilità. [6]

La modifica della superficie dei carrier lipidici permette di ottenere il superamento di alcune limitazioni. I liposomi possono essere ricoperti da polimeri idrofilici come il PEG (polietilenglicol), il quale conferisce stabilità sterica attraverso la formazione di uno strato protettivo esterno che di conseguenza rallenta il riconoscimento da parte delle opsonine e la conseguente eliminazione. Questo ulteriore strato riduce la tossicità, aumenta la durata nel circolo sanguigno e evita la fagocitosi. [8]

### *2.3 Meccanismi di internalizzazione delle nanoparticelle lipidiche*

Quando un liposoma interagisce con una cellula, la consegna del farmaco e la sua distribuzione nella cellula bersaglio possono verificarsi in diversi modi. I liposomi possono essere assorbiti dalla membrana cellulare, dove avviene la degradazione del doppio strato lipidico del vettore da parte di enzimi, come le lipasi, o da sforzo meccanico.

Questo processo conduce al rilascio dei principi attivi nell'ambiente fluido extracellulare dal quale essi possono diffondere attraverso la membrana cellulare nel citoplasma. Tuttavia, quest'ultimo processo non può



*A) I liposomi caricati con un farmaco interagiscono con la cellula legandosi alla superficie attraverso i recettori. B) L'assorbimento sulla membrana plasmatica può avvenire anche da interazioni elettrostatiche. C) La consegna del carico nel citoplasma cellulare può avvenire attraverso diverse modalità, i nanocarrier lipidici si fondono con la membrana plasmatica e scaricano i farmaci nella cellula. D) Dopo l'interazione con la cellula, la struttura del doppio strato liposomiale può essere influenzata e il carico viene rilasciato. E) Può anche verificarsi lo scambio di componenti lipidici portatori con la membrana cellulare. I liposomi interiorizzati dall'endocitosi (F) possono avere destini diversi a seconda, che, gli endosomi si fondono con i lisosomi (G): in questo caso, il basso pH induce la degradazione della membrana liposomica e il farmaco è rilasciato. Gli endosomi seguono un altro percorso (H): i liposomi rilasciano il loro carico dopo fusione o destabilizzazione della vescicola endocitica.*

#### *2.4 Caratteristiche dei lipidi che costituiscono i liposomi*

I liposomi sono generalmente costituiti da fosfolipidi *zwitterionici*, che possiedono un gruppo funzionale carico positivamente ed uno che presenta una carica negativa; la contemporanea presenza di due cariche localizzate di segno opposto conferisce a tali molecole una carica complessivamente neutra.

La mancanza di carica superficiale (liposomi neutri) aumenta l'aggregazione dei liposomi, riducendone la stabilità fisica. Inoltre, i liposomi neutri non interagiscono in modo significativo con le cellule e questo provoca il rilascio del farmaco dai liposomi nello spazio

extracellulare; possono però essere ottenuti liposomi cationici o anionici utilizzando insieme ai fosfolipidi zwitterionici, altri lipidi carichi positivamente o negativamente; tali sistemi di delivery presentano numerosi vantaggi rispetto ai liposomi neutri. Ad esempio, la presenza di una carica sulla superficie, induce repulsione elettrostatica tra i liposomi creando un potenziale  $\zeta$ , positivo o negativo, che impedisce la loro flocculazione e aggregazione. Inoltre, una carica superficiale positiva potrebbe favorire l'interazione di liposomi con cellule.

I liposomi cationici (CLP), descritti per la prima volta nel 1987 da Felgner et al sono tipicamente usati per il gene delivery, sfruttando l'interazione elettrostatica tra lipidi caricati positivamente e acidi nucleici caricati negativamente. Sono costituiti da una base di lipidi neutri zwitterionici in cui si inseriscono lipidi cationici.

I fosfolipidi neutri comunemente usati includono: dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) e sono nella maggior parte dei casi necessari per la stabilizzazione della struttura supramolecolare di doppio strato lipidico che caratterizza le vescicole liposomiali. Sul mercato sono già presenti una varietà di lipidi cationici, come il colesterolo DC-Cholesterol HCl, (3 $\beta$ - [N- (N', N'-dimetilamminoetano) -carbamil] colesterolo cloridrato), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilammonio-propano [sale cloruro]), DOBAQ (N- [4-carbossibenzil] -N, N-dimetil-2,3-bis (oleoilossi)propan-1-amminio), DDAB (dimetildioctadecilammonio [sale di bromuro]) e MLV5 (N1- [2 - ((1S) -1 - [(3-amminopropile) ammino] -4- [di (3-ammino-propil) ammino] butilcarbossammido) etil] -3,4-di [oleilossi] -benzammide), e molti altri lo sono in fase di sviluppo. <sup>[6]</sup>

La classificazione dei liposomi viene fatta sulla base del numero degli strati che li compongono e sulla base delle loro dimensioni. (Fig. 8)

VEVICOLE UNILAMELLARI PICCOLE (SUVs): dimensione sotto i 50 nm

VEVICOLE UNILAMELLARI LARGHE (ULVs): dimensione compresa tra 10 e 100 nm

VEVICOLE MULTILAMELLARI (MLV): dimensioni circa di 1  $\mu$ m

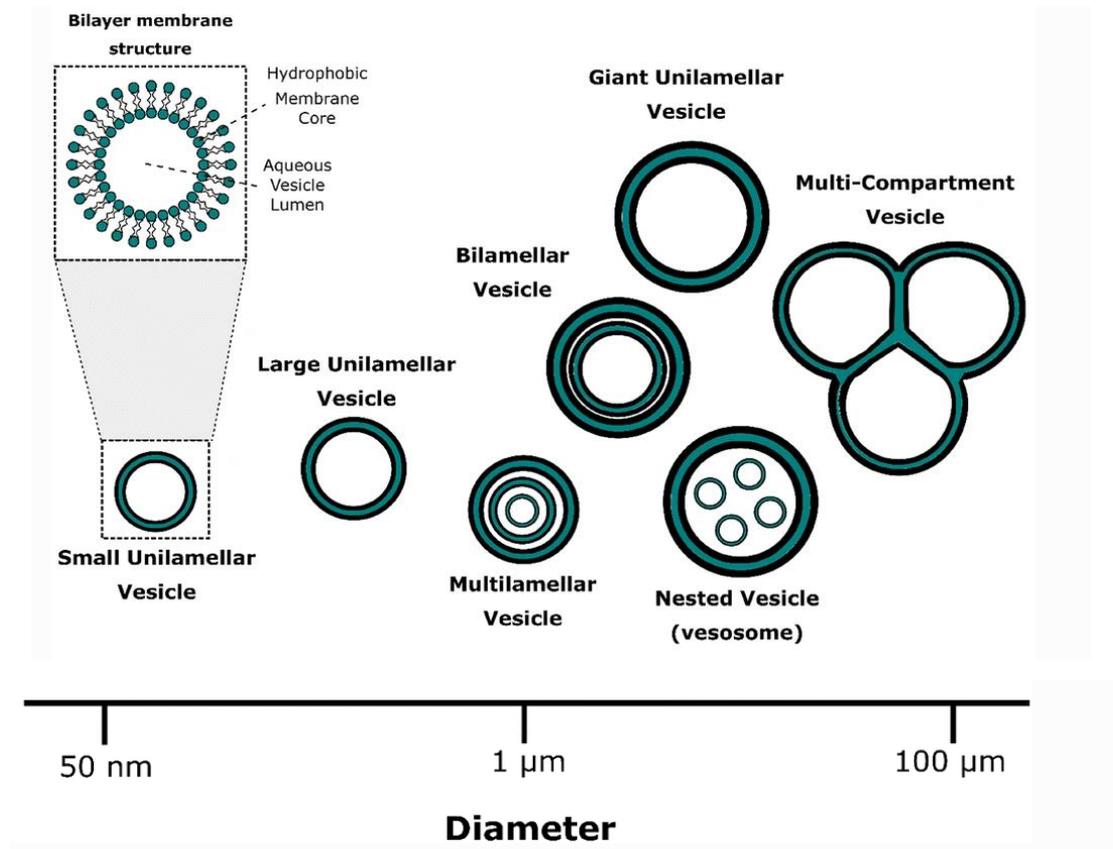
VEVICOLE BILAMELLARI: dimensioni maggiori di 1  $\mu$ m

VEVICOLE UNILAMELLARI GIGANTI (GUVs): dimensione compresa tra 100 e 300 nm

VASOSOMI: dimensioni circa di 50  $\mu$ m

VEVICOLE MULTI-COMPARTIMENTO: dimensioni circa di 100  $\mu$ m

[9]



***Figura 8. Rappresentazione dimensione delle vescicole lipidiche***

Le ULV sono caratterizzate da un grande core acquoso, questo determina un'efficienza maggiore nel trasporto di farmaci idrofilici.

Le MLV, invece, essendo caratterizzate da strati concentrici di fosfolipidi, le permettono di intrappolare molecole liposolubili a questo livello. <sup>[10]</sup>

## Capitolo terzo

### Materiali e metodi

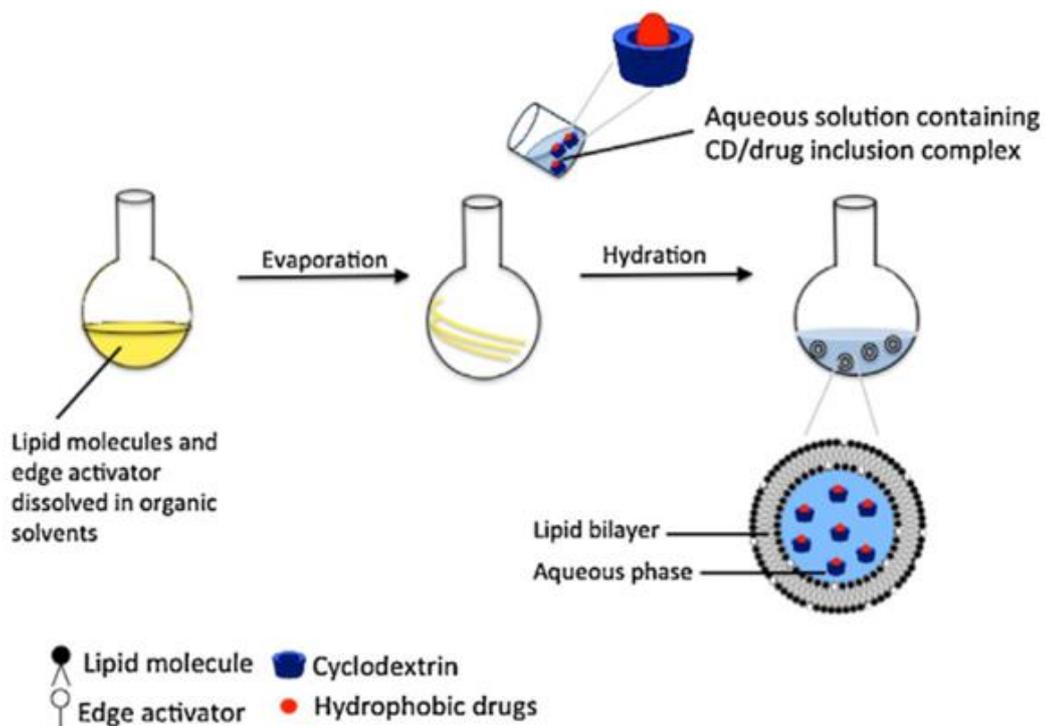
#### *3.1 Materiali*

Il bromuro di diottadecildimetilammonio (DODAB), la glycerol mono-oleate (GMO), il 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), il DC-cholesterol-HCl (DC-CHOL) e il glicole polietilenico (PEG) utilizzate nella preparazione dei liposomi sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich Co. (Stenheim, Germania). Dicer-Substrate Short Interfering RNAs (DsiRNAs) and TriFECTa® Kit è stato acquistato da IDT (Integrated DNA Technologies). La linea cellulare utilizzata nelle prove biologiche è la linea VERO C1008 isolata dal rene di scimmia e acquistata da American Type Culture Collection (ATCC, #CRL-1586).

#### *3.2 Preparazione dei liposomi*

La tecnica usata per la preparazione dei liposomi è la “thin film hydration”. Opportune aliquote delle soluzioni contenenti i costituenti lipidici disciolti in solvente organico (cloroformio o metanolo) sono miscelate per ottenere liposomi con differenti rapporti molari (mol/mol) dei lipidi helper e cationici usati. Il solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta per permettere poi la formazione di un sottile film lipidico. Successivamente i campioni sono stati idratati con una soluzione di HEPES (pH, 7.4) preparato in condizioni RNase free per ottenere una concentrazione finale di lipide nei campioni studiati di  $1\text{mg/ml}^{-1}$ . La sospensione liposomiale ottenuta viene mantenuta in

agitazione per 24 h e ad una temperatura superiore alla temperatura in cui i lipidi utilizzati si trovano in fase liquido-cristallina (temperatura critica,  $T_c$ ) e successivamente viene sottoposta a cicli di congelamento e scongelamento, per rompere le MLV e favorire il processo di ridimensionamento. <sup>[16]</sup>



**Figura 9:** Tecnica utilizzata per la costruzione dei sistemi di trasporto “thin film hydration”.

Le dispersioni delle vescicole ottenute, probabilmente multilamellari (MLV) sono state sottoposte, attraverso un sonicatore Sonic Vibracell MOD VCX, ad un impulso continuo (15 min, 50%) per ottenere nanoparticelle di dimensioni omogenee. La sonicazione rappresenta una delle tecniche maggiormente utilizzate per il ridimensionamento dei liposomi e permette la rottura degli agglomerati presenti nelle sospensioni

liposomiali a causa delle onde d'urto generate dal collasso delle bolle di gas che si formano nel liquido per la pressione acustica applicata.

Un sonificatore risulta essere costituito da un generatore di corrente, da un convertitore che trasforma l'energia elettrica in energia meccanica, e di sonde che amplificano la vibrazione prodotta. <sup>[17]</sup>

Un'altra tecnica che permette di ridurre le dimensioni delle sospensioni liposomiali è l'estrusione che deve essere effettuata ad una temperatura superiore alla temperatura critica  $T_c$  dei lipidi utilizzati, in cui essi si trovano in fase liquido-cristallina. La sospensione viene fatta passare un numero dispari di volte su membrane di policarbonato a porosità decrescente (0,4; 0,2; 0,1  $\mu\text{m}$  per liposomi di 100 nm) ottenendo così liposomi unilamellari (LUV) con delle dimensioni uniformi. <sup>[16]</sup>

Sono state preparate nanoparticelle lipidiche con le seguenti formulazioni:

- DOPE:GMO:DC-CHOL (2:1:1)
- DOPE:GMO:DC-CHOL (1:1:1)
- DOPE:DC-CHOL (1:1)
- DODAB:GMO (1:2)
- DODAB:GMO (3:2)
- DODAB:GMO (2:1)
- DODAB:GMO:PEG-2000 (2:1:2)
- DODAB:GMO:PEG-2000 (1:2:2)
- DODAB:GMO:PEG-2000 (3:1:2)
- DODAB:GMO:PEG-2000 (3:1:4)
- DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:1:2)
- DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:2:2)
- DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:3:2)
- DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:5:2)
- DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:7:2)

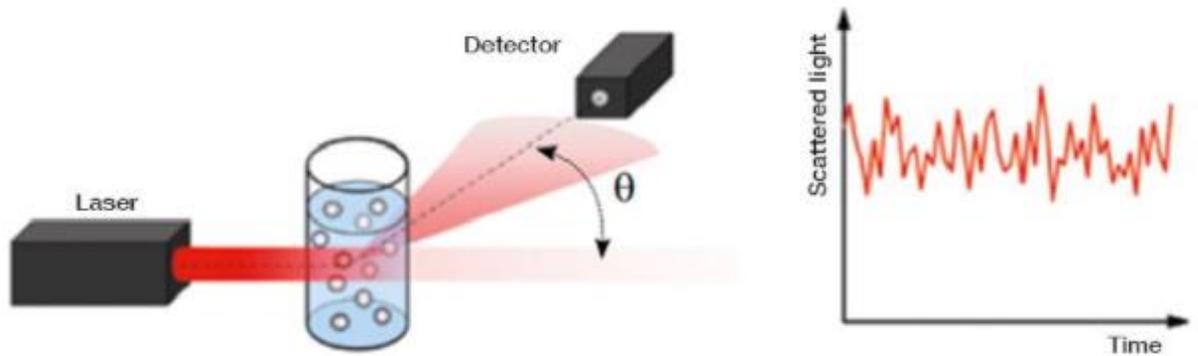
### *3.2.1 Dimensioni e Zeta Potential dei liposomi*

L'analisi dimensionale dell'indice di polidispersione e del potenziale zeta dei liposomi è stata condotta con lo strumento Zen3600 Nanosizer ZS della Malvern mediante la tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS) e Electrophoretic Light Scattering (ELS). Un'aliquota della sospensione di liposomi è stata diluita alla concentrazione finale di 0.1 mg/ml con acqua MQ e filtrata con filtri di acetato di cellulosa aventi pori di diametro di 0.2  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedium Biotech) per eliminare impurezze eventualmente presenti nella sospensione che potrebbero disturbare le analisi, ad esempio particelle metalliche rilasciate dalla punta del sonicatore. Le misure sono state effettuate a 25 °C e con un angolo fisso di 173°. Le determinazioni sono state condotte in triplicato.

### *3.2.2 Parametri*

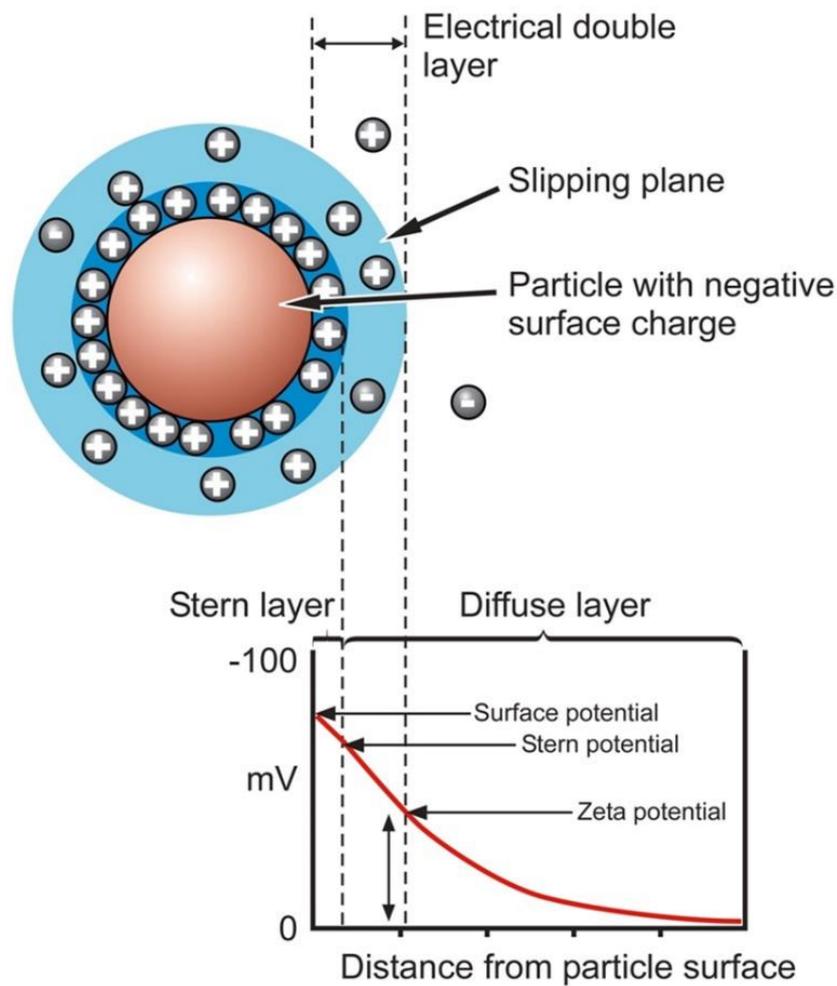
*Size*: il campione viene illuminato da un raggio laser e la variazione d'intensità della dispersione (scattering) della luce vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle all'origine dello scattering. A parità di temperatura e di viscosità le particelle piccole si muovono rapidamente creando rapide variazioni dell'intensità di scattering, mentre le particelle di dimensioni più grandi si muovono più lentamente creando variazioni di intensità lente. Questo fenomeno è alla base della tecnica del Dynamic Light Scattering. Un autocorrelatore misura la velocità delle variazioni d'intensità e il coefficiente di diffusione delle particelle calcolato dalla funzione di correlazione. Sfruttando

l'equazione di Stokes Einstein ci consente di convertire il coefficiente di diffusione in diametro idrodinamico.



**Figura 10:** tecnica del *Dynamic Light Scattering*

*Zeta potential:* la determinazione del potenziale zeta è una tecnica di caratterizzazione significativa dei nanosistemi per stimare la carica superficiale, che può essere impiegata per comprendere la stabilità fisica delle nanosospensioni. Un grande valore positivo o negativo del potenziale zeta dei nanosistemi indica una buona stabilità fisica delle nanosospensioni a causa della repulsione elettrostatica delle singole particelle. Un valore di potenziale zeta diverso da -30 mV a +30 mV è generalmente considerato avere una forza repulsiva sufficiente per ottenere una migliore stabilità colloidale fisica.



**Figura 11:** tecnica di determinazione del Potenziale Zeta

*Indice di polidispersione:* la misura dell'indice di polidispersione (IP) permette la rilevazione del carattere mono o polidisperso del sistema che è sottoposto all'analisi ed è stato direttamente calcolato dal software dello strumento. L'analisi viene effettuata prelevando 250  $\mu\text{l}$  della sospensione liposomiale e inserendola nell'apposita cuvetta, si prosegue diluendo l'aliquota con l'apposito buffer, infatti a ciascun campione sono stati aggiunti 2 mL di acqua deionizzata (acqua MilliQ) filtrata. [18]

Sono state ottenute le misure di size e zeta potential alla temperatura di 25°C e ad un angolo fisso di 173°. L'Electrophoretic Light Scattering

consente di misurare la mobilità elettroforetica di particelle sospese in un liquido, la quale è direttamente proporzionale al loro potenziale Zeta come descritto dall'equazione di Henry:

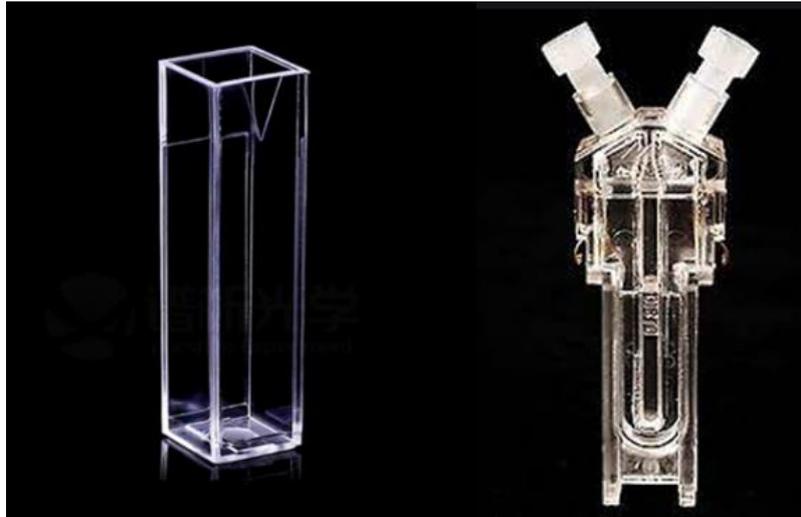
$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(ka)}{3 \eta}$$

Dove  $U_E$  è la mobilità elettroforetica,  $\varepsilon$  è la costante dielettrica,  $z$  il potenziale zeta,  $f(ka)$  la funzione di Henry e  $\eta$  la viscosità del solvente. Il Potenziale Zeta, noto anche come potenziale elettrocinetico, è una misura della carica elettrica delle particelle sospese in un liquido. La maggior parte delle nanoparticelle disperse in acqua presenta una carica superficiale, causata da fenomeni di ionizzazione o assorbimento di specie cariche o, nel caso dei liposomi, dalla presenza di lipidi che possiedono una carica netta positiva o negativa. Il liposoma o, in generale, una nanoparticella carica, è circondato nella soluzione da diversi strati ionici, che hanno una composizione diversa da quella del bulk. In particolare, esso è accerchiato da uno strato denso di ioni caratterizzato da una specifica carica elettrica, circondato da uno strato più diffuso di ioni presente nel liquido di sospensione. I liposomi in soluzione si spostano quindi insieme ad un doppio strato ionico ed il potenziale Zeta è il potenziale al livello di questo doppio strato, anche chiamato piano di scivolamento (slipping plane). Il Potenziale Zeta, misurato in millivolts (mV), può essere considerato un buon indicatore di stabilità dei sistemi colloidali. La differenza di potenziale tra il fluido di sospensione e lo strato denso di ioni cambia nel momento in cui altri ioni o polimeri si adsorbono allo strato denso. Il potenziale zeta è responsabile della forza con cui

interagiscono le particelle, ed è molto sensibile alla composizione delle specie caricate nella dispersione. Per nanoparticelle di bassa densità sospese, il valore del Potenziale Zeta consente di predire la loro stabilità e la capacità di rimanere in sospensione. In effetti, un valore di potenziale zeta elevato (i.e.  $<-30\text{mV}$  e  $>+30\text{mV}$ ) permette il distanziamento delle nanoparticelle che si respingono con una forza sufficiente da eliminare la possibilità di agglomerazione, aggregazione e/o flocculazione. Valori al di sotto di questi indicano sistemi in grado di fondersi e di aggregarsi.

Per misurare la mobilità elettroforetica delle particelle, si applica un campo elettrico tra gli elettrodi della cella di misura la quale viene illuminata da un raggio laser. Le particelle cariche si spostano verso l'elettrodo di segno opposto, creando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica. La dimensione dei liposomi e dei lipoplessi sono parametri importanti. L'interazione elettrostatica che avviene non appena la molecola carica negativamente (RNA) viene introdotto nei liposomi cationici, porta a miscele eterogenee di particelle con dimensioni maggiori di 100 nm. <sup>[19]</sup>

Per il Size è stata utilizzata una cuvetta di plastica e le misure sono state eseguite in triplicato. Diversamente per il potenziale zeta è stata utilizzata una cuvetta specifica a due entrate e anche in questo caso le misure sono state ottenute in triplicato.



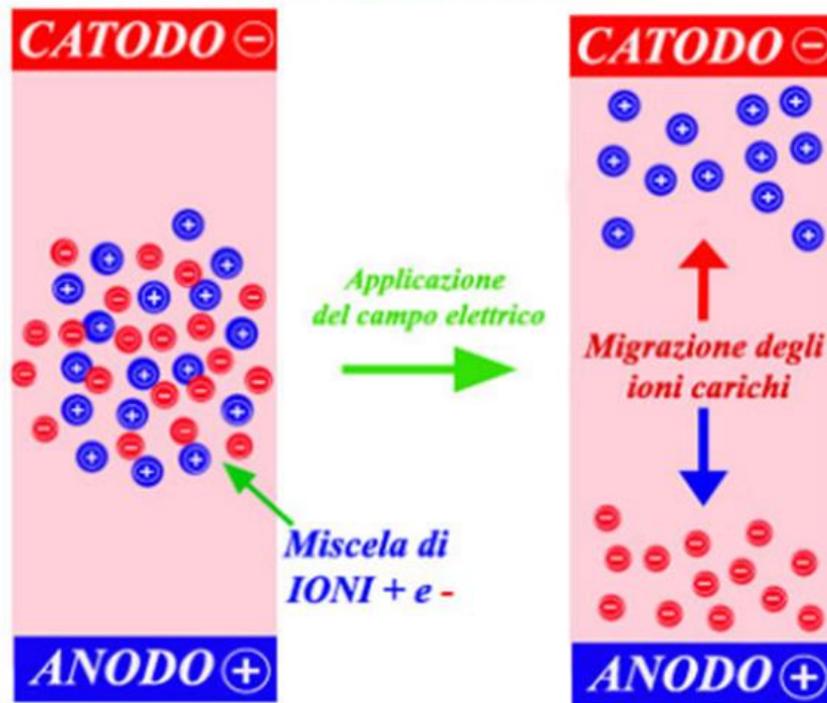
*Figura 12: cuvette utilizzate per il Size e per lo Zeta Potential*

### *3.3 Elettroforesi su gel d'agarosio*

L'elettroforesi è una tecnica che consiste nella migrazione differenziata di molecole cariche elettricamente, poste in un campo elettrico.

Gran parte delle molecole di interesse biologico hanno gruppi ionizzabili e, quindi, con un valore di pH consono sono presenti in soluzione come specie cariche elettricamente. Sottoposte ad un campo elettrico queste molecole cariche negativamente o positivamente migrano verso il catodo o verso l'anodo. I fattori che influenzano la mobilità della molecola in un campo carico elettricamente comprendono: la carica relativa alla molecola ( $q$ ), il gradiente del voltaggio del campo elettrico ( $E$ ) e la resistenza d'attrito del mezzo di supporto ( $f$ ) che si oppone al movimento, ma anche fattori come la concentrazione di agarosio nel gel, la conformazione del DNA o dell'RNA, la composizione (forza ionica) del buffer e la presenza del bromuro d'etidio. <sup>[20]</sup>

## ELETTROFORESI



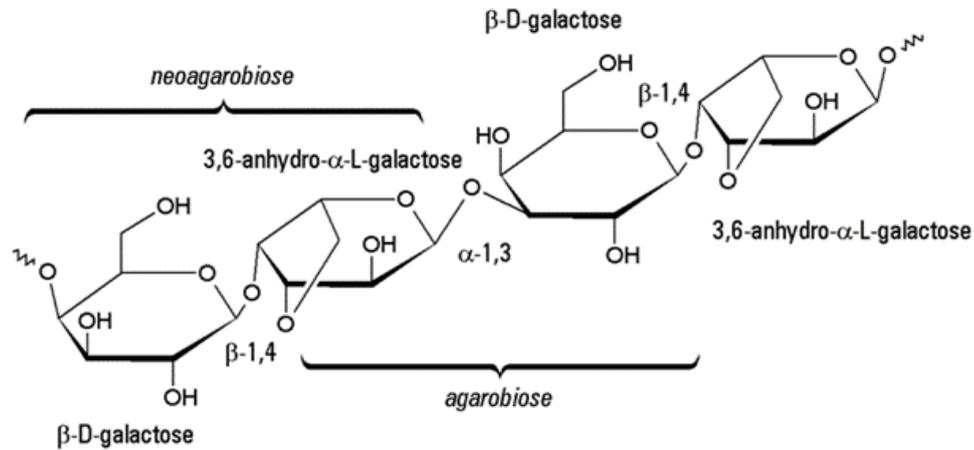
**Figura 13:** Rappresentazione del movimento molecolare con e senza campo elettrico

L'agarosio è un polisaccaride ottenuto da alcune alghe rosse, grazie alla sua particolare struttura permette la gelificazione spontanea. È un polimero lineare la cui unità fondamentale è l'agarobiosio, ovvero un disaccaride composto da (1,3)- $\beta$ -D-galattopiranosio-(1,4)-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galattopiranosio. I due monosaccaridi sono uniti tra loro da legame glicosidico<sup>2</sup>. L'agarosio è uno dei due componenti principali dell'agar, ed

<sup>2</sup> Legame covalente che unisce il gruppo emiacetalico di uno zucchero con un atomo, di solito nucleofilo, di un'altra molecola.

è ottenuto purificando l'agar dal suo secondo componente, l'agaropectina.

[21]



**Figura 14:** (1,3)-β-D-galattopiranosio-(1,4)-3,6-anidro-α-Lgalattopiranosio

È deputato alla formazione di una matrice semisolida, costituita da pori di dimensione diversa che varia in funzione della concentrazione utilizzata. Infatti, la concentrazione di agarosio determina il potere risolutivo del gel. La conformazione degli acidi nucleici (superavvolta, lineare o circolare) incide sulla velocità di migrazione anche se le dimensioni sono uguali. La presenza del bromuro di etidio, cioè un colorante fluorescente che si intercala tra basi degli acidi nucleici, permettendo la visualizzazione del risultato.

## Capitolo quarto

### Esperimenti cellulari

#### *4.1 Colture cellulari*

La linea cellulare VERO-E6, cellule renali di scimmia, è stata coltivata in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplementato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum), glutammina 2 mM e 100 U/mL di antibiotici penicillina/streptomina. Le cellule sono state mantenute in ambiente umido a 37°C e con il 5% di CO<sub>2</sub>. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni e, al raggiungimento della confluenza, le cellule sono state tripsinizzate; la conta vitale è stata effettuata mediante l'utilizzo del Trypan Blu.

#### *4.2 Valutazione dell'efficienza di trasfezione mediante citofluorimetria*

Le cellule VERO-E6 sono state coltivate in piastra da 6-multiwell (1.2x10<sup>5</sup> cells/well) in terreno DMEM completo. Il giorno successivo, nelle 4 ore antecedenti al trattamento, le cellule sono state poste in presenza di terreno DMEM privo di FBS. Durante questo periodo di incubazione è stata effettuata la complessazione dei liposomi con le molecole di siRNA fluorescenti con un rapporto molare tra il lipide cationico DODAB e siRNA pari a 4:1. In particolare, opportune aliquote di siRNA e liposoma sono stati diluiti separatamente in DMEM privo di siero e lasciati ad incubare per 15 min a temperatura ambiente; successivamente, le due soluzioni sono state mescolate e poste in lenta agitazione per 15 min. Trascorso tale periodo di incubazione, le cellule sono state trattate con i sistemi liposoma: siRNA al fine di raggiungere

una concentrazione finale di siRNA e lipide nel terreno pari a 10 nM. Come controllo, le cellule sono state trattate con la stessa quantità di siRNA in assenza di liposoma. La quantità di lipide somministrata è dipendente invece dalla tipologia di sistema utilizzato, ovvero legata alla quantità di DODAB presente nella formulazione. Le cellule sono state incubate per 4 ore a 37°C e con il 5% di CO<sub>2</sub> per consentire l'interazione tra i liposomi e la superficie cellulare. Successivamente le cellule sono state raccolte, mediante tripsinizzazione, e centrifugate a 1200 g per 10 min, lavate due volte in PBS e diluite ad una concentrazione di 5x10<sup>6</sup> cells/ml per l'analisi al citofluorimetro.

## Capitolo quinto

### Risultati e discussioni

Le formulazioni lipidiche studiate in questo lavoro di tesi sono state ottenute miscelando opportunamente “lipidi helper” e lipidi cationici. Per quanto riguarda i lipidi helper sono stati utilizzati la 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3 phosphoethanolamine (DOPE), il gliceril mono-oleate (GMO), mentre tra i lipidi cationici rientrano il dioctadecildimetilammonio bromuro (DODAB) e il DC-cholesterol (DC-CHOL). Il polietilenglicole (PEG-2000) è stato utilizzato successivamente per fornire una maggiore stabilità chimica alle nanoparticelle, oppure, a funzioni di protezione, volte all’inibire i processi di aggregazione e flocculazione delle sospensioni lipidiche. I lipidi “helper” sono responsabili dell’aumento della stabilità delle formulazioni e dell’efficienza di somministrazione. Essi risultano essere di fondamentale importanza per avere un incapsulamento stabile di siRNA nella nanoparticella. [22]

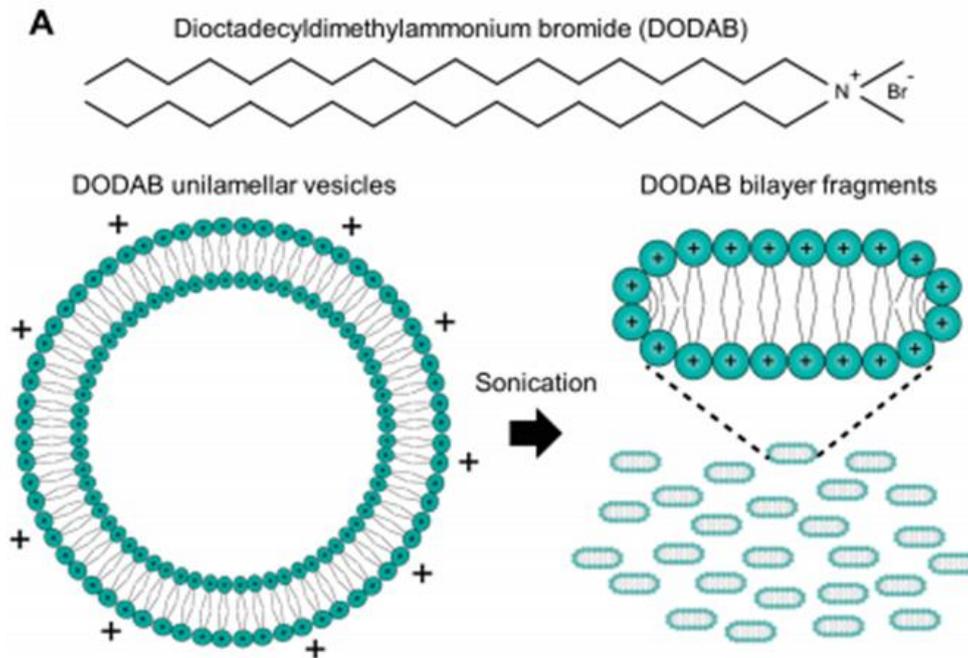
Come ampiamente descritto nel primo capitolo, la membrana cellulare risulta essere un’importante barriera che ostacola l’ingresso di molecole idrofile e cariche come, appunto i siRNA. Sono stati studiati diversi tipi di nanoparticelle lipidiche che possano favorire la loro interazione e le più efficaci contengono lipidi cationici che garantiscono un’efficiente incorporazione di molecole cariche negativamente facilitando l’interazione con le cariche negative presenti sulle molecole siRNA. Tali lipidi possono inoltre mediare l’interazione elettrostatica tra le nanoparticelle lipidiche e il plasma cellulare o la membrana endosomiale che presentano una seppur debole carica negativa. I lipidi cationici, infatti, possono dare interazioni

elettrostatiche con lipidi anionici presenti nella membrana cellulare; è stato dimostrato attraverso l'utilizzo di liposomi cationici fusogenici e liposomi anionici quali mimici della membrana cellulare, che l'interazione tra lipidi che presentano cariche di segno opposto destabilizza i complessi lipide cationico-acido nucleico, permettendo la separazione del lipide cationico dall'acido nucleico a causa della formazione di coppie ioniche di lipidi cationici e anionici liberando l'acido nucleico. Utilizzando liposomi contenenti lipidi fusogenici (ad esempio il DOPE) l'acido nucleico può essere rilasciato all'interno della cellula. [23]

### *5.1 DODAB: bromuro di diottadecildimetilammonio*

Il DODAB è un lipide cationico che genera un doppio strato e, in eccesso di acqua, tende a formare grandi vescicole unilamellari (LUV), ma possono essere ottenuti frammenti cationici a doppio strato di dimensioni nanometriche mediante la sonicazione. La molecola di DODAB è formata da una porzione idrofoba costituita da una doppia catena acilica (C18:0), legata ad una testa polare costituita da un ammonio quaternario che presenta la carica positiva. Il DODAB è un lipide cationico molto studiato, perciò è abbastanza semplice controllare le sue caratteristiche chimico-fisiche, rendendone facile l'utilizzo per la realizzazione di formulazioni lipidiche. Il limite principale di questo lipide è la temperatura di transizione dalla fase gel a quella liquido-cristallina che è parzialmente elevata (45°C), superiore alla temperatura fisiologica del corpo umano (35°C). Ciò determina il fatto che i doppi strati di DODAB sono provvisti di forte rigidità ad una temperatura corporea normale che ne limita l'uso come sistema di somministrazione di farmaci. Questo limite può essere

superato inserendo un colipide, come il DOPE o DC-CHOL, che abbassi la temperatura di melting della miscela lipidica contenente il DODAB. [12]

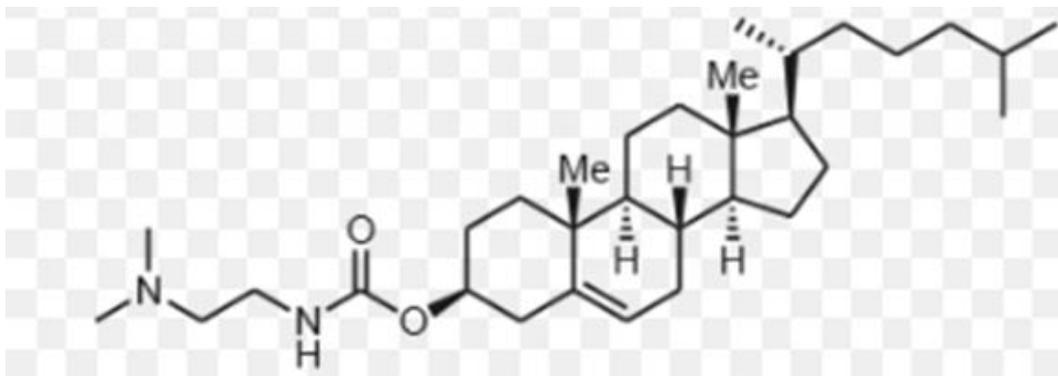


**Figura 15.** Struttura chimica del DODAB schematizzata ( $C_{38}H_{80}NBr$ ) e assemblaggio di doppi strati DODAB in dispersioni acquose

### 5.2 DC-CHOL: DC-cholesterol

Il colesterolo DC appartiene ai lipidi cationici con gruppi steroidei e fa parte della serie dei lipidi colesterolici. Il colesterolo può essere impiegato come colipide e combinato con altri lipidi cationici come DOPE, DODAB, ecc. per ottenere dei liposomi più efficaci. Molto spesso per il gene delivery si ricorre a lipidi cationici che contengono una porzione steroidea. L'analisi della struttura chimica di questo lipide fa notare l'assenza del backbone e la testa polare è legata direttamente al dominio idrofobico. [13]

La peculiarità del colesterolo sta nella capacità di modulare la fluidità del doppio strato lipidico; esso è in grado di diminuire i gradi di libertà delle catene aciliche dei fosfolipidi che costituiscono bilayers fosfolipidici che presentano uno stato liquido-cristallino, ma al contrario aumenta la fluidità di membrane lipidiche che si trovano in fase gel. Inoltre, essendo il colesterolo dotato di un effetto fluidificante in un sistema contenente catene sature, la sua presenza determina un aumento della fusogenicità dei lipoplessi contenenti DODAB. [12]



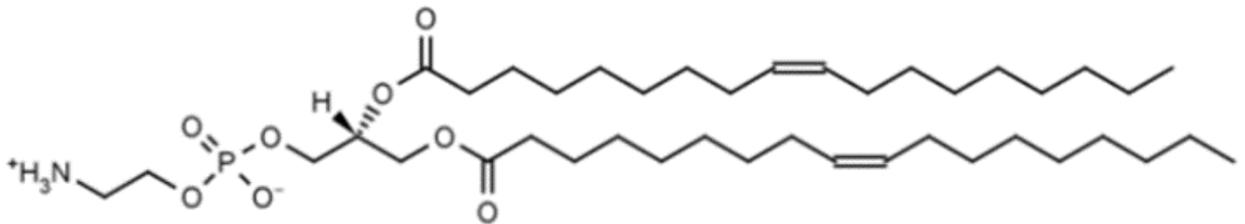
**Figura 16.** struttura chimica del DC-CHOL

### 5.3 DOPE: Dioleoylphosphatidylethanolamine

Il co-lipide neutro DOPE è spesso il protagonista delle formulazioni lipidiche, dal momento che, attraverso la stabilizzazione del complesso RNA/lipide, migliora la trasfezione mediata da diverse formulazioni di liposomi cationici. Il DOPE è inoltre uno dei lipidi helper più affermati e utilizzati nei vettori non virali. Esso è costituito da una piccola testa polare e il grosso dominio idrofobico a forma di cuneo porta il lipide ad assumere una forma a cono, che è adatta a formare la fase HII (esagonale).

Il DOPE stimola, infatti, la formazione di strutture esagonali invertite che rappresentano un'importante variazione strutturale dal classico modello a sandwich multilamellare di organizzazione dei lipoplessi (lipide-acido nucleico). Tuttavia, alcuni studi dimostrano che la sua applicazione nella terapia genica è stata limitante a causa della forte citotossicità ad esso associata. Questo ha motivato la ricerca di nuovi lipidi helper con livelli più alti di biocompatibilità mantenendo la stessa efficienza del DOPE, ad esempio, il colesterolo, grazie alla sua capacità di modificare la fluidità del doppio strato.

Il DOPE è biodegradabile ed ha una stabilità chimica più alta di quella degli esteri ma più bassa di quella delle ammidi. Diversi studi avanzano l'ipotesi che il DOPE faciliti l'uscita dei sistemi internalizzati dagli endosomi<sup>3</sup> grazie alla sua fusogenicità dovuta alla tendenza a passare da una fase instabile esagonale (HII) ad una fase stabile a doppio strato in presenza della membrana cellulare. [12]



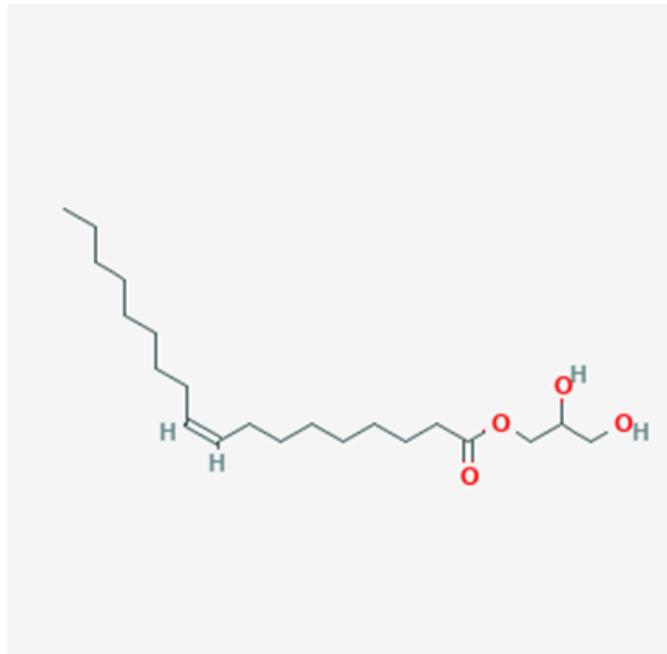
**Figura 17:** struttura chimica del DOPE

---

<sup>3</sup> Passaggio critico nella trasfezione, dove un'elevata percentuale di lipoplessi viene distrutta dalla degradazione endosomiale e l'escape endosomiale, nella prima fase, si pensa possa essere essenziale al lipoplesso per evitarne la degradazione.

#### 5.4 GMO: glicerolo mono-oleate

Il glicerolo monooleato è uno dei più studiati lipidi anfifilici, utilizzati nella realizzazione di varie formulazioni liquido cristalline. Da un punto di vista molecolare, è un estere in cui una molecola di acido oleico, un acido grasso che ha un doppio legame cis in C9, è legato mediante un legame estereo al backbone del glicerolo. Gli altri due ossidrili del triolo sono liberi e conferiscono caratteristiche polari a questa porzione della molecola. La testa idrofilica del lipide può formare legami idrogeno con l'acqua in ambiente acquoso (gruppo di testa), mentre la catena degli idrocarburi (la coda) conferisce proprietà idrofobiche a questo lipide.



**Figura 18:** struttura chimica del glicerolo monooleato

In eccesso di acqua e con ampi intervalli di temperature, questo lipide forma entrambi le fasi: cubiche e esagonali. Inoltre, questo lipide è

atossico, biodegradabile e biocompatibile, classificato come GRAS<sup>4</sup> ed è incluso nella FDA<sup>5</sup>, Inactive Ingredients Guida. È stato dimostrato che il GMO scompare in vivo dopo iniezione sottocutanea e intramuscolare, principalmente grazie all'attività idrolitica delle lipasi e delle esterasi. L'effetto non irritante sui tessuti non è stato ancora del tutto confermato. Esso ha proprietà emolitiche quindi non può essere effettuata la somministrazione endovenosa. [14]

La bassa citotossicità risulta essere un motivo di rilevante importanza per migliorare le caratteristiche chimico-fisiche e la stabilità dei farmaci incorporati, comprese le biomacromolecole come proteine, peptidi e acidi nucleici. Tali caratteristiche rendono le nanoparticelle lipidiche a base di GMO potenziali candidati per il delivery di molecole biologicamente attive. [15]

### 5.5 Risultati

Come citato all'inizio del capitolo sono state opportunamente sviluppate diversi sistemi lipidici costituiti sia da lipidi *helper*, ritenuti responsabili dell'aumento della stabilità e dell'efficienza di somministrazione, sia da lipidi cationici che facilitano l'interazione con gli oligonucleotidi anionici. Le formulazioni progettate e realizzate sono riportate nelle tabelle che seguono, considerando diversi parametri quali: tempo di analisi, diametro medio (Size), indice di polidispersione (PDI) e carica superficiale delle nanodispersioni.

---

<sup>4</sup> Generalmente riconosciuto come sicuro.

<sup>5</sup> Processo metabolico che prevede la scissione dei trigliceridi permettendo la liberazione di acidi grassi liberi (FFA).

### 5.5.1 Formulazioni lipidiche a base di DOPE:GMO:DC-CHOL

<u>Formulazione</u>	<u>Tempo di analisi</u>	<u>Size ± SD (nm)</u>	<u>PDI ± SD</u>	<u>ζ-potential ± SD (mV)</u>
<b>DOPE:GMO:DC-CHOL (2:1:1)</b>	0 hrs	110 ± 13	0.26 ± 0.02	25 ± 6
	24 hrs	170 ± 10	0.40 ± 0.10	
<b>DOPE:GMO:DC-CHOL (1:1:1)</b>	0 hrs	168 ± 1	0.28 ± 0.02	17 ± 0.6
	24 hrs	180 ± 3	0.60 ± 0.09	
<b>DC-CHOL:DOPE (1:1)</b>	0 hrs	104 ± 3	0.28 ± 0.01	22 ± 14
	24 hrs	130 ± 10	0.50 ± 0.10	

**Tabella 1.** Valori di Size, PDI e Potenziale Zeta delle diverse formulazioni lipidiche, DOPE:GMO:DC-CHOL, a diversi intervalli di tempo effettuate con il Dynamic Light Scattering.

Le formulazioni lipidiche elencate in tabella a base di DOPE, non sono risultate molto promettenti, in quanto, si evidenzia un aumento della dimensione all'aumentare del tempo, nonché un aumento dell'indice di polidispersione e conseguente variazione della deviazione standard. Questo risulta essere particolarmente evidente nella formulazione lipidica DOPE:GMO:DC-CHOL 2:1:1, la quale passa da dimensioni di 110±13 a 170±10 e da un indice di polidispersione di 0.26±0.02 a 0.40±0.10 dopo 24 ore. Questi valori indicano una scarsa stabilità del sistema nel tempo. La carica superficiale è poi solo debolmente positiva. Di conseguenza l'attenzione è stata rivolta all'utilizzo di altre formulazioni più stabili e con una carica positiva maggiore.

### 5.5.2 Formulazioni lipidiche a base di DODAB:GMO con e senza PEG-2000

<u>Formulazione</u>	<u>Tempo di analisi</u>	<u>Size ± SD (nm)</u>	<u>PDI ± SD</u>	<u>ζ-potential ± SD (mV)</u>
<b>DODAB:GMO (1:2)</b>	0 hrs	94 ± 9	0.32 ± 0.02	40 ± 10
	24 hrs	97 ± 25	0.26 ± 0.04	
<b>DODAB:GMO (3:1)</b>	0 hrs	155 ± 29	0.37 ± 0.04	52 ± 2
	24 hrs	197 ± 29	0.29 ± 0.04	
<b>DODAB:GMO (2:1)</b>	0 hrs	76 ± 4	0.35 ± 0.02	50 ± 1
	24 hrs	80 ± 6	0.28 ± 0.03	
<b>DODAB:GMO:PEG-2000 (2:1:2)</b>	0 hrs	86 ± 13	0.22 ± 0.03	30 ± 8
	24 hrs	95 ± 33	0.26 ± 0.06	
<b>DODAB:GMO:PEG-2000 (1:2:2)</b>	0 hrs	108 ± 25	0.24 ± 0.01	29 ± 4
	24 hrs	109 ± 22	0.23 ± 0.01	
<b>DODAB:GMO:PEG-2000 (3:1:2)</b>	0 hrs	77 ± 22	0.27 ± 0.05	26 ± 6
	24 hrs	68 ± 17	0.27 ± 0.05	
<b>DODAB:GMO:PEG-2000 (3:1:4)</b>	0 hrs	117 ± 1	0.4 ± 0.02	42 ± 0.6
	24 hrs	130 ± 4	0.38 ± 0.06	

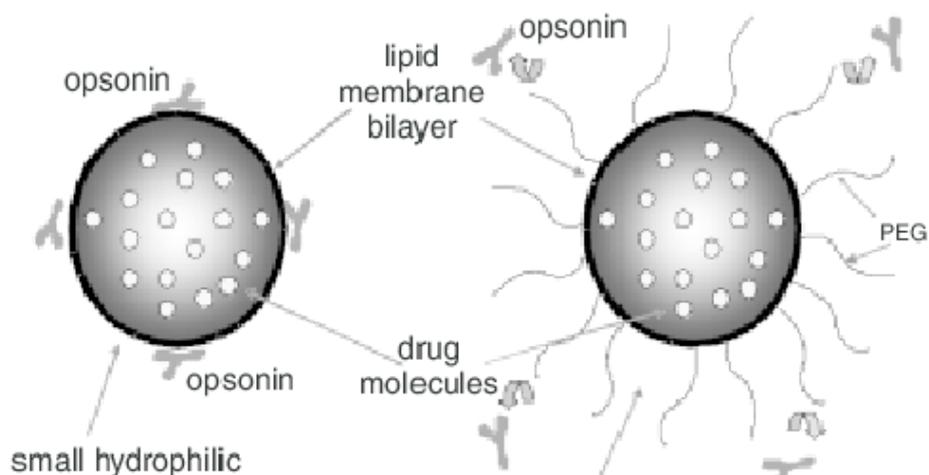
**Tabella 2.** Valori di Z-Averag, Size, PDI e Potenziale Zeta delle diverse formulazioni Lipidiche, DODAB:GMO con e senza PEG-2000, a diversi intervalli di tempo effettuate con il Dynamic Light Scattering.

I risultati riportati in tabella fanno riferimento alle diverse formulazioni lipidiche costituite principalmente dal lipide cationico DODAB e il lipide helper GMO, in presenza o in assenza del secondo lipide PEG-2000. I valori che fanno riferimento al Size e all'indice di polidispersione della formulazione DODAB:GMO, in rapporto 3:1 in assenza del PEG, risultano essere elevati rispetto alle altre formulazioni, nello specifico si nota un progressivo aumento della dimensione delle nanoparticelle e una diminuzione irrilevante dell'indice di polidispersione dopo le 24 ore, di

conseguenza risultano essere poco stabili nel tempo. Un decisivo miglioramento della stabilità in termini di dimensioni e PDI, a diversi intervalli di tempo, si può evidenziare nei sistemi con aggiunta di poli(etilenglicole), il quale potrebbe prevenire l'aggregazione delle nanoparticelle e quindi offrire alle nanoparticelle lipidiche una certa protezione stabilità colloidale. Infatti, i lipidi a base di polietilenglicole (PEG) sono emersi come tensioattivi interessanti a base di polimeri idrofili che potrebbero fornire stabilità sterica ai liposomi cationici, aumentando la vita nel flusso sanguigno dei lipoplessi e diminuendo anche gli effetti tossici osservati in vitro e in vivo. La controparte polimerica dei tensioattivi a base di PEG forma un rivestimento superficiale protettivo che inibisce l'adesione da parte dei componenti del plasma che potrebbero promuovere il rilascio di acido nucleico e l'aggregazione delle particelle. L'aggiunta di PEG determina una riduzione della carica elettrica netta e un aumento dell'idratazione della superficie dei liposomi, diminuendo l'immunogenicità e la citotossicità provocata dalle particelle. L'aggiunta di PEG non determina solo effetti positivi, infatti, ad alte concentrazioni, questi polimeri sono noti per essere tossici e di difficile eliminazione dall'organismo. Pertanto, quando sviluppando particelle PEGilate, bisogna prendere in considerazione vantaggi e svantaggi, specialmente quando lo scopo è la somministrazione terapeutica a lungo termine senza effetti visibili sulla struttura del lipoplesso. <sup>[12]</sup>

Nel complesso, le formulazioni lipidiche presenti nella tabella appena descritta mostrano un Potenziale Zeta il più delle volte  $>\pm 30\text{mV}$ , valori al di sotto di tale potenziale potrebbero indicare sistemi colloidali in grado di fondersi e aggregarsi. Perciò cifre importanti come  $52\pm 2$  o  $50\pm 1$ , ecc. generano repulsioni elettrostatiche che li rendono stabili e probabilmente

maggiormente efficaci sia nel complessare i siRNA che nell'interagire con la membrana cellulare.



**Figura 19.** Rappresentazione del liposoma in assenza e in presenza del polietilenglicole

### 5.5.3 Formulazioni lipidiche a base di DOPE:DODAB:PEG-2000

<u>Formulazione</u>	<u>Tempo di analisi</u>	<u>Size ± SD (nm)</u>	<u>PDI ± SD</u>	<u>ζ-potential ± SD (mV)</u>
DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:1:2)	0 hrs	106 ± 6	0.28 ± 0.04	34 ± 10
	24 hrs	140 ± 23	0.29 ± 0.06	
DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:2:2)	0 hrs	97 ± 5	0.27 ± 0.03	39 ± 3
	24 hrs	93 ± 1	0.23 ± 0.03	
DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:3:2)	0 hrs	96 ± 12	0.29 ± 0.07	31 ± 4
	24 hrs	98 ± 10	0.25 ± 0.03	
DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:5:2)	0 hrs	81 ± 9	0.30 ± 0.07	31 ± 5
	24 hrs	130 ± 22	0.23 ± 0.03	
DOPE:DODAB:PEG-2000 (1:7:2)	0 hrs	70 ± 1	0.30 ± 0.03	21 ± 12
	24 hrs	71 ± 9	0.31 ± 0.03	

**Tabella 3.** Valori di Z-Averag, Size, PDI e Potenziale Zeta delle diverse formulazioni lipidiche DOPE:DODAB:PEG-2000 a diversi intervalli di tempo effettuate con il Dynamic Light Scattering.

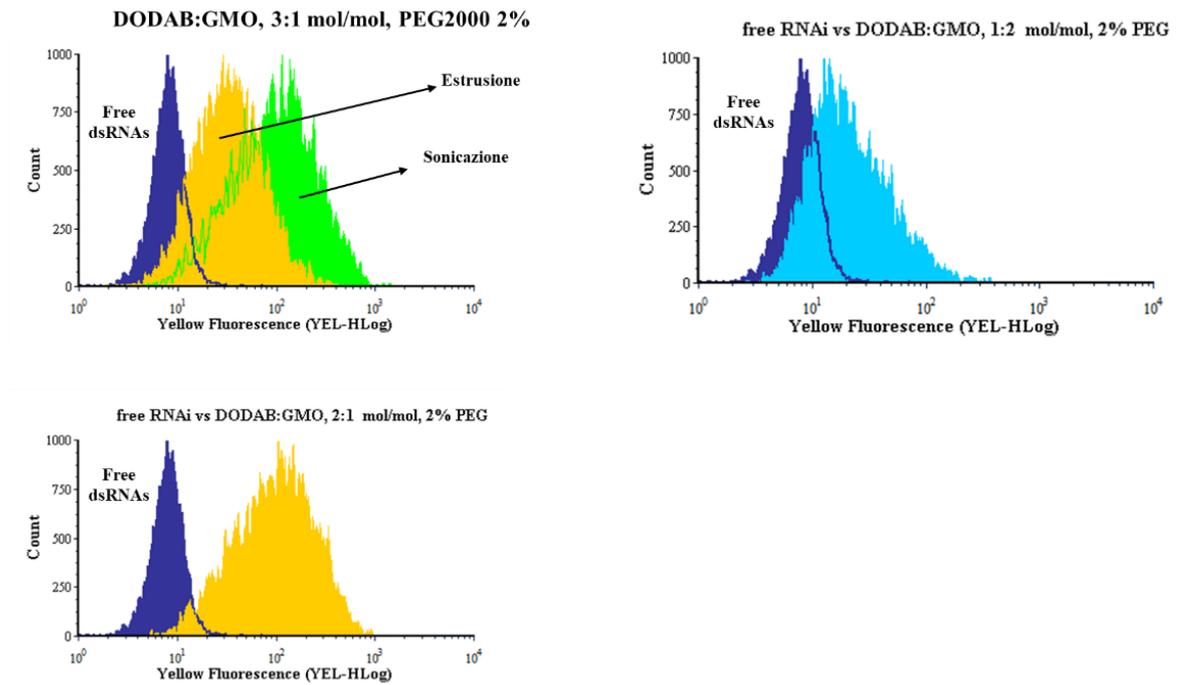
Le diverse formulazioni lipidiche a cui si fa riferimento sono costituite principalmente dal lipide cationico DODAB, associato ai due lipidi helper DOPE e PEG-2000. Le analisi sono state condotte a 0 e a 24 ore.

In generale, dunque, dai dati emerge che i valori relativi al Size, PDI e al Potenziale Zeta a intervalli di tempo diverso non variano molto, ciò significa che anche dopo 24 ore il sistema risulta essere il più delle volte stabile.

Tra i sistemi menzionati in tabella i più promettenti, in termini di stabilità relativa ai parametri sopracitati, sono DOPE:DODAB:PEG-2000 nelle concentrazioni 1:3:2, 1:5:2, 1:7:2 e pertanto sono stati portati avanti come oggetto di studio. In particolare, è possibile notare che le dimensioni rimangono quasi invariate nel tempo soprattutto nella formulazione 1:7:2 dopo 24 ore (da  $70\pm 1$  a  $71\pm 9$ ), in cui inoltre si evidenzia un irrisorio aumento del carattere mono o polidisperso del sistema da  $0.30\pm 0.03$  a  $0.31\pm 0.03$ .

#### *5.5.4 Efficienza di trasfezione delle formulazioni DOPE:DODAB:PEG-2000*

Come mostrato in figura, all'aumentare della quantità di DODAB utilizzato aumenta l'efficienza di trasfezione. In tutti i casi i sistemi testati provvedono ad aumentare la quantità di siRNA che viene veicolato dentro le cellule. I sistemi sonicati risultano essere molto più efficienti rispetto a quelli estrusi.



**Figura 19:** Valutazione efficienza di trasfezione mediante citofluorimetria in cellule VERO dopo 4 ore di incubazione con i sistemi in esami

## BIBLIOGRAFIA

[1] Chelliah et al., “Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent Trends”, *Chem Biol Drug Des*, 2017 November; 90(5): 665–678. DOI:10.1111/cbdd.12993.

[2] Maria Abdul Ghafoor Rajaa et al., “Design, mechanism, delivery and therapeutics of canonical and Dicer-substrate siRNA”, *Asian J Pharm Sci*, 2019 February, DOI:10.1016/j.ajps.2018.12.005.

[3] Kseniya Gavrilov et al., “Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies”, *Yale J Biol Med*, 2012 Jun;85(2):187-200.

[4] Md Abdus Subhan et al., “Efficient nanocarriers of siRNA therapeutics for cancer treatment”, *Transl Res*, 2019 December;214:62-91,DOI: 10.1016/j.trsl.2019.07.006.

[5] Abolfazl Akbarzadeh et al., “Liposome: classification, preparation, and applications”, 2013 Feb 22, DOI:10.1186/1556-276X-8-102.

[6] Giuseppina Bozzuto et al., “Liposomes as nanomedical devices”, *Affiliations expand*”, *Int J Nanomedicine*, 2015 Feb 2, DOI: 10.2147/IJN.S68861.

[7] Punit P. Seth et al., “Selective tissue targeting of synthetic nucleic acid drugs”, *J Clin Invest*, 2019 Mar 1, DOI: 10.1172/JCI125228.

[8] Temidayo O.B.O. et al. “Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs”, *Molecules*, 2018 Apr 14, DOI: 10.3390/molecules23040907.

[9] Zufika Qamar et al., “Nano based Drug Delivery System: Recent strategies for the Treatment of ocular disease and future perspective”, *Recent Patents on Drug Delivery e formulation*, vol 13, 246-254, 2019, DOI: 10.2174/1872211314666191224115211.

[10] Nisini R. et al., “The Multirole of Liposomes in therapy and prevention of Infectious diseases”, *Frontiers in immunology*, vol 9, 2018 Feb 5.

[11] Jayesh A Kulkarni et al., “On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA”, *Nanoscale*, 2019 Nov 2, DOI: 10.1039/c9nr09347h.

[12] J. P. Neves Silva et al., “Development of Dioctadecyldimethylammonium Bromide/Monoolein Liposomes for Gene Delivery”, 2012 Oct 10, DOI: 10.5772/48603.

[13] Rui Tada et al., “Attachment of class B CpG ODN onto DOTAP/DC-chol liposome in nasal vaccine formulations augments antigen-specific immune responses in mice”, 2017 Jan 26, DOI: 10.1186/s13104-017-2380-8.

[14] Spomenka Milak et al., “Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems”, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 478, Issue 2, 2015 January 30, Pages 569-587.

[15] Guoliang Zhen et al., “Glycerol Monooleate-Based Nanocarriers for siRNA Delivery in Vitro”, 2012 July 16.

[16] Hongwei Zhang, “Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation”, *Methods Mol Biol*, 2017, DOI: 10.1007/978-1-4939-6591-5\_2.

[17] Roberto Mendez et al., “Sonication-Based Basic Protocol for Liposome Synthesis”, *Methods Mol Biol*, 2017, DOI: 10.1007/978-1-4939-6996-8\_21

[18] M Danaei et al., “Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems”, *Pharmaceutics*, 2018 May 18, DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.

[19] Sourav Bhattacharjee, “DLS and zeta potential - What they are and what they are not?”, *J Control Release*, 2016 Aug 10, DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

[20] Robert M. Dondelinger, “Electrophoresis”, *Biomed Instrum Technology*, 2010.

[21] Paolo Zucca et al., “Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization”, *Molecules*, 2016 Nov 19, DOI: 10.3390/molecules21111577.

[22] Jayesh A Kulkarni et al., “On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA”, *Nanoscale*, 2019 Nov 2, DOI: 10.1039/c9nr09347h.

[23] <https://ita.acousticbiotech.com/mechanism-whereby-cationic-lipids-promote-intracellular-delivery-polynucleic-acids-142886>.