



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

Corso di Laurea Triennale in

INGEGNERIA BIOMEDICA

**“NANOSTRUTTURE LIQUIDO CRISTALLINE CONTENENTI
GLICOLIPIDI PER IL TRASPORTO DI DESAMETASONE”**

**“GLYCOLIPIDES BASED LIQUID CRYSTALLINE NANOSTRUCTURES
FOR THE DELIVERY OF DEXAMETHASONE”**

Tesi di Laurea di:

Calabrese Eleonora

Relatore:

Prof.ssa Pisani Michela

Correlatori:

Prof.ssa Astolfi Paola

Sessione autunnale

Anno accademico 2020/2021

INDICE

INTRODUZIONE	3
CAPITOLO 1	
1.1 Strutture per il drug delivery	4
1.2 Cristalli liquidi liotropici	9
1.3 Polimorfismo lipidico	13
CAPITOLO 2	
Targeted Drug Delivery	15
CAPITOLO 3	
3.1 Monooleina	19
3.2 Lipidi funzionalizzati con il mannosio	21
3.3 Desametasone	22
3.4 Preparazione dei campioni	23
3.5 Diffrazione dei raggi X: tecnica di caratterizzazione strutturale	24
CAPITOLO 4	
Risultati e discussione	28
CONCLUSIONE	35
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUZIONE

L'argomento trattato in questa tesi riguarda il "drug delivery" che si occupa dell'incapsulamento, trasporto e rilascio di farmaci o molecole bioattive all'interno di un organismo.

In particolare, la ricerca svolta nel settore riguarda l'individuazione di nuovi sistemi da utilizzare per il "drug delivery", in alternativa a quelli convenzionali come liposomi, micelle polimeriche e nanoparticelle inorganiche che sono ad oggi già presenti in commercio o sottoposti a sperimentazione. Negli ultimi anni, un interesse particolare è stato rivolto a nanoparticelle ottenute dai cristalli liquidi liotropici in grado di formare strutture 2-D e 3-D in ambiente acquoso. Queste strutture, più o meno complesse, sono estremamente biocompatibili e biodegradabili, caratterizzate da un elevato ordine strutturale e termodinamicamente stabili, sono particolarmente adatte ad ospitare al loro interno molecole di diverse dimensioni e di differente polarità. Inoltre, l'incapsulamento di un farmaco in tali sistemi ne migliora stabilità, la solubilità nei fluidi biologici, e la biodisponibilità. In questo modo si ha il miglioramento dell'assorbimento, si può ridurre la tossicità e, eventualmente, controllare il rilascio del farmaco a siti specifici funzionalizzando il nanovettore.

In questo ambito si inserisce l'argomento di questa tesi che riguarda la preparazione e la caratterizzazione di nano vettori a matrice lipidica per veicolare un farmaco con proprietà antinfiammatorie, il desametasone, che viene utilizzato per il trattamento di patologie o sintomi correlati in cui viene richiesto l'intervento di corticosteroidi. I nanovettori sono stati ottenuti da una miscela di monooleina (GMO) e di lipidi funzionalizzati con un glicoconiugato derivante dal mannosio, con una catena idrocarburica a diversa lunghezza, acido decanoico (MC10), acido miristico (MC14) e con acido oleico insaturo (MC18). Lo studio strutturale e l'identificazione delle mesofasi assunte dai sistemi preparati, vuoti e in presenza del desametasone, è stato effettuato mediante diffrazione dei raggi X a piccolo angolo (SAXS.)

CAPITOLO 1

1.1 STRUTTURE PER IL DRUG DELIVERY

Le nanotecnologie rappresentano una branca delle scienze applicate in continuo e rapido sviluppo che trova particolare applicazione nel campo della nanomedicina e nello specifico nella prevenzione, nella diagnostica e nella cura delle più svariate malattie. Come suggerisce il nome, tale tecnologia si occupa di “oggetti” con dimensioni appartenenti all’ordine dei nanometri (10^{-9} m) e, tra questi, di nanoparticelle da utilizzare in campo biomedico per il “drug delivery” ovvero l’incapsulamento, il trasporto ed il rilascio di farmaci o altre biomolecole direttamente nel loro sito di azione. Veicolare un farmaco attraverso un opportuno nanovettore permette di:

- Proteggere il farmaco dalla degradazione, rendendolo più stabile e attivo;
- Aumentare la solubilità del farmaco e migliorarne la biodisponibilità;
- Diminuire la concentrazione del farmaco ed aumentare l’indice terapeutico usando un numero minore di dosi;
- Ottenere un’azione mirata del farmaco rispetto ad uno specifico sito d’azione (“targeting farmaceutico”).

Sono noti diversi sistemi di nanoparticelle (Figura 1.1) che possono essere classificate in base alla loro natura in organiche (tra le più utilizzate: le micelle, liposomi, dendrimeri ed idrogel) ed inorganiche (nanoparticelle metalliche, ceramiche e a base di carbonio) ma che possiamo anche distinguere in base alla forma e alle dimensioni, alla tecnica utilizzata per la preparazione ma anche in base al suo utilizzo finale. Limitandoci alle nanostrutture di origine organica, descriviamo brevemente quali sono le caratteristiche delle nanoparticelle più comuni ^[1].

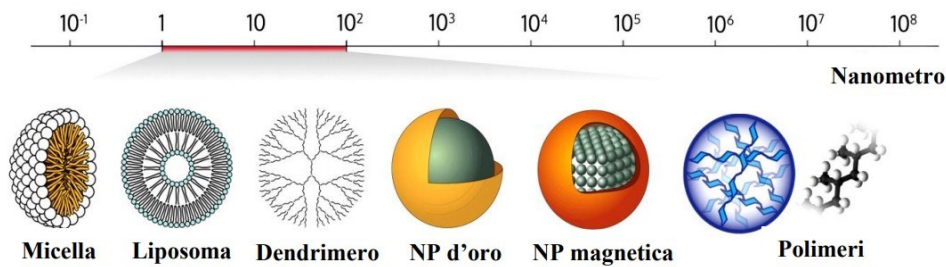


Figura 1.1 Nano sistemi di tipo organico ed inorganico utilizzati per il “drug delivery”.

Le *Micelle*, di dimensioni da 10 a 100 nm, sono composte tipicamente da tensioattivi (molecole dotate di una testa idrofila polare ed una o più code idrofobe apolari) che in ambiente acquoso si auto assemblano formando nanostrutture sferiche monostratificate in cui le teste polari sono orientate verso l’ambiente acquoso esterno e le code apolari verso l’interno, lontano dall’acqua, formando un nucleo idrofobo che prende il nome di “core” (micelle normali). Nelle strutture così ottenute è possibile inglobare sostanze lipofile che vanno a disporsi all’interno del nucleo, permettendone il trasporto anche in un ambiente acquoso in cui altrimenti tali sostanze non sarebbero solubili.

I *Liposomi*, che hanno dimensioni variabili da 50 nm ad alcuni micrometri, sono considerati insieme con le micelle gli aggregati a base lipidica più semplici, ma che differiscono da queste ultime per la loro struttura interna. Infatti, anche i liposomi si ottengono da molecole anfifiliche (fosfolipidi) che in acqua si auto-assemblano formando sistemi sferici a doppio strato lipidico con le code lipidiche rivolte verso l’interno del doppio strato e le teste polari esposte all’ambiente acquoso, sia interno che esterno alla nanoparticella. I liposomi hanno il vantaggio di poter incapsulare al loro interno molecole di natura sia lipofila (nel doppio strato lipidico) che idrofila (nella cavità acquosa) e attualmente rappresentano i nanosistemi più utilizzati nell’ambito del “drug delivery” per la loro buona biodegradabilità e biocompatibilità. [2]

I Dendrimeri, di dimensioni da 1 a 10 nm, sono macromolecole con una struttura tridimensionale ramificata, simile a quella di un albero. Vengono ottenuti per aggiunta iterativa a partire da una zona centrale, detta core, di unità monomeriche nelle tre direzioni spaziali. Sono altamente ordinati e data la loro struttura sono caratterizzati da cavità in cui è possibile collocare molecole di piccole dimensioni, sono perciò i gruppi chimici che compongono le unità monomeriche a determinare la solubilità e le eventuali interazioni con sostanze incapsulate.

Gli idrogel, che hanno dimensioni inferiori a 100 nm, sono sistemi tridimensionali composti da una rete di polimeri idrofili con la capacità di inglobare grandi quantità di acqua e fluidi biologici, mantenendo inalterata la propria struttura. Sono particolarmente interessanti perché sono in grado di mimare le funzioni biologiche dei tessuti dell'organismo umano. Come altri sistemi, inoltre, permettono di avere un rilascio controllato del farmaco in risposta ad uno stimolo esterno come può essere una variazione di pH, temperatura, pressione o idratazione.^[3]

Recentemente è molto attivo l'interesse verso l'utilizzo sia in ambito clinico, di diagnostica ed imaging, e di targeted delivery, di un particolare tipo di nanoparticelle ottenute da cristalli liquidi liotropici, le cosiddette LCNP (*lyotropic liquid crystalline lipid nanoparticles*). Anche in questo caso si tratta di nanoparticelle ottenute da molecole anfifiliche, come lipidi e acidi grassi, che garantiscono una maggiore biocompatibilità e biodegradabilità rispetto, ad esempio, a nanosistemi inorganici, che formano aggregati simili ai liposomi ma con strutture interne più complesse.

Per cristalli liquidi (LC)^[4] si intendono strutture mesofasiche auto assemblate, con proprietà intermedie tra quelle di un solido cristallino e di un liquido isotropo. Queste fasi liquido-cristalline mostrano infatti un ordine a lungo raggio tipico dei solidi cristallini, ma contemporaneamente anche un disordine

a corto raggio, tipico dei liquidi. Esistono sostanzialmente due tipi di LC, quelli termotropici le cui proprietà sono dipendenti dalla temperatura e quelli liotropici, il cui polimorfismo dipende dalla concentrazione e dalla temperatura, dai quali derivano le LCNP.

Le mesofasi liquido cristalline liotropiche si ottengono da molecole anfifiliche che, in un ambiente acquoso e ad opportune concentrazioni, formano nanostrutture ordinate bi- e tri-dimensionali, caratterizzate da una simmetria esagonale e cubica, rispettivamente in cui si distinguono domini acquosi e domini lipidici, tra loro non connessi. Se si trovano sottoforma di nanoparticelle, queste strutture prendono il nome di "hexosomi" e cubosomi; rispetto ai liposomi essi hanno una frazione lipidica per particella maggiore ciò permette di avere un incapsulamento maggiore nel caso di farmaci lipofili. Solitamente i lipidi utilizzati e di conseguenza anche i cubosomi e gli "hexosomi" ottenuti sono non tossici, biodegradabili e con un elevato livello di biocompatibilità, anche considerando che strutture cubosomiche sono presenti anche a livello cellulare nelle membrane ed in altri sistemi naturali. I cubosomi ed "hexosomi" possono quindi essere considerati come valide alternative ai liposomi da utilizzare nel "drug delivery" e hanno il vantaggio di ^[5]:

- Essere strutture più robuste rispetto a quelle liposomiche che permettono un rilascio più controllato e sostenuto del farmaco veicolato;
- Incapsulare molecole di diverse dimensioni e polarità, con le molecole idrofiliche che si vanno ad inserire nei canali acquosi o vicino alle teste polari, le molecole lipofile che invece si posizionano all'interno del doppio strato lipidico mentre le molecole anfifiliche all'interfaccia polare-apolare;
- Avere metodi di preparazione più semplici soprattutto se confrontati con quelli di preparazione di altri sistemi come i dendrimeri;

- Proteggere le molecole incapsulate dalla degradazione enzimatica, ossidazione ed idrolisi, aumentandone quindi la stabilità e l'efficacia;
- Controllare il rilascio farmaceutico migliorando l'efficacia del farmaco e riducendone gli effetti collaterali;
- Poter essere funzionalizzati utilizzando molecole target al fine di ridurre gli effetti collaterali della somministrazione ed ottenere un trasporto specifico solo verso alcuni tipi di cellule, tessuti e organi

In questa tesi saranno descritti dei sistemi liquido cristallini liotropici funzionalizzati con degli zuccheri che possono funzionare da target dal momento che numerosi processi biologici sono regolati da interazioni tra zuccheri e proteine e sono modulati da glicani o glicolipidi che si trovano sulla superficie cellulare. Ad esempio, nei processi infiammatori sono presenti cellule immunitarie come i macrofagi che sovra esprimono dei recettori per il mannosio e per questo motivo, in questo lavoro di tesi, i sistemi liquido cristallini funzionalizzati con derivati del mannosio verranno utilizzati per l'incapsulamento e il trasporto di desametasone, farmaco con proprietà infiammatorie con l'obiettivo di ottenere sistemi che favoriscono il trasporto del farmaco incapsulato verso siti in cui il processo infiammatorio è in atto.

1.2 CRISTALLI LIQUIDI LIOTROPICI

I cristalli liquidi liotropici (LLC) formano mesofasi di particolare interesse da utilizzare nella preparazione di sistemi per il “drug delivery” grazie alle loro proprietà strutturali e alla loro capacità di solubilizzare farmaci e biomolecole di diversa polarità e dimensione.

Sono composti da almeno due componenti, un surfactante (molecola anfifilica tipicamente di natura lipidica) ed il solvente, generalmente acqua.

I lipidi sono macromolecole di natura anfifilica costituite da due porzioni (Figura 2.1):

- una regione polare (idrofilica) che può essere di natura anionica, cationica o zwitterionica;
- una regione apolare (idrofobica) formata da catene idrocarburiche alifatiche contenenti legami semplici ma anche legami doppi o tripli.

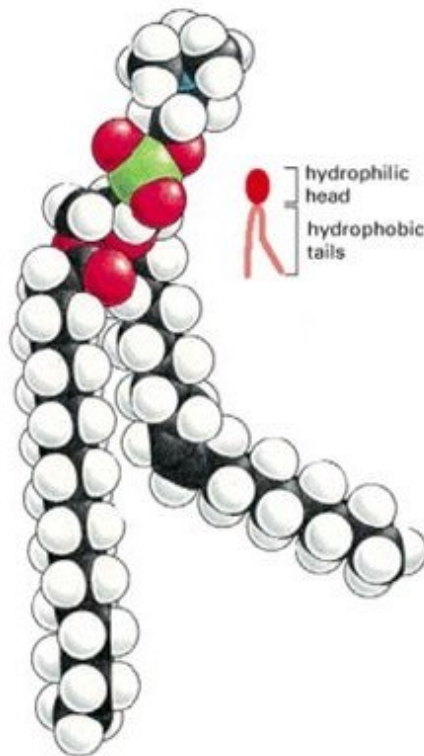


Figura 1.2 Struttura di un lipide.

In un ambiente acquoso, questi lipidi si organizzano in modo che tra le teste polari si esercitino interazioni elettrostatiche e legami idrogeno, mentre tra le code alifatiche interazioni di Van Der Waals così da minimizzare le interazioni sfavorevoli. Si formano così degli aggregati in cui le porzioni idrofobiche sono orientate tra loro a formare un doppio strato mentre quelle idrofiliche sono a contatto con il solvente.

In funzione della molecola utilizzata, dell'indice di impacchettamento e delle condizioni esterne, come temperature, idratazione, pressione, i cristalli liquidi liotropici possono organizzarsi in strutture (mesofasi) diverse, classificabili in base al loro ordine spaziale e alle simmetrie assunte. Questo processo di organizzazione delle molecole lipidiche prende il nome di polimorfismo lipidico^[6].

Possiamo quindi avere:

1) **Mesofasi lamellari (L_α)**

Sono composte da doppi strati lipidici sovrapposti e separati da strati acquosi; hanno un ordine a lungo raggio e lungo una sola dimensione. I doppi strati sono caratterizzati da molecole anfifiliche disposte parallelamente con le code apolari rivolte verso l'interno del doppio strato e le teste polari sono orientate verso l'esterno (Figura 1.3).

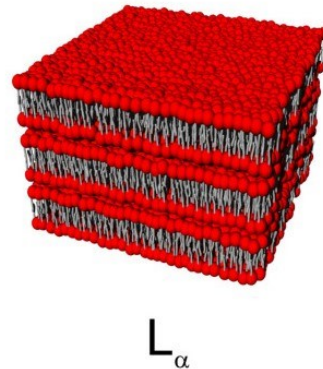


Figura 1.3 Fase lamellare.

2) Mesofasi esagonali (H_I , H_{II})

Sono formate da micelle cilindriche di lunghezza indefinita organizzate secondo un reticolo esagonale, con periodicità in due dimensioni.

Questa mesofase presenta due configurazioni (Figura 1.4):

- Diretta, “oil in water” (tipo 1, H_I), in cui le code alchiliche si dispongono all’interno del cilindro con le teste polari rivolte verso la fase acquosa;
- Inversa, “water in oil” (tipo 2, H_{II}), in cui si hanno canali acquosi disposti ai vertici di un esagono ciascuno circondato dalla molecola lipidica con la testa polare verso il canale acquoso e con le code idrofobe che puntano verso l’esterno.

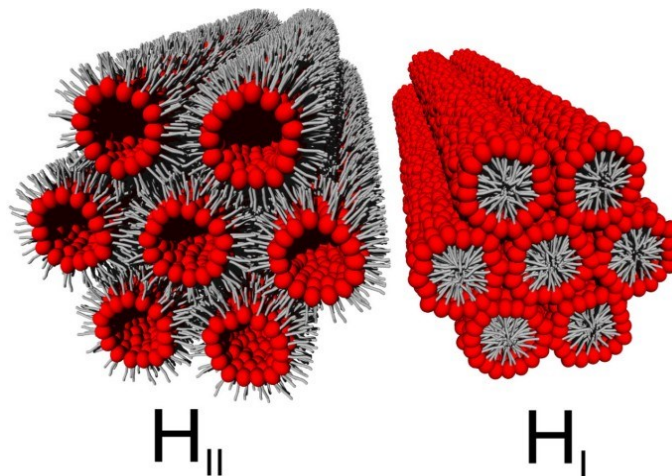


Figura 1.4 Faes esagonale inversa (H_{II}) e diretta (H_I).

3) Mesofasi cubiche (Q)

Sono strutture in cui i lipidi si organizzano secondo reticoli con periodicità tridimensionale, otticamente isotropici, che presentando una simmetria cubica. Anche in questo caso si possono avere strutture

cubiche sia di tipo normale (“oil in water”) che inverso (“water in oil”).
Le più comuni sono (Figura 1.5):

- Struttura giroide ($Ia3d$, Q^{230} , G-type), consiste di due network di cilindri di acqua e lipide interconnessi tra loro tre a tre nel piano;
- Struttura a diamante ($Pn3m$, Q^{224} , D-type), consiste in un doppio strato lipidico che separa due network tetraedrici interconnessi di canali acquosi disposti secondo un reticolo a doppio diamante;
- Struttura primitiva ($Im3m$, Q^{229} , P-type), consiste di due network di canali acquosi collegati sei a sei.



Figura 1.5 Fasi cubiche.

Quando una molecola anfifilica auto assembla in acqua dando una mesofase esagonale o cubica forma dei gel piuttosto viscosi che sono difficilmente utilizzabili. Al fine di renderle più maneggevoli, ampliandone il campo di applicazione, alcune di esse, in particolare quelle derivanti da molecole anfifiliche a bassa solubilità in acqua, possono essere disperse in nanoparticelle che mantengono una struttura interna identica alla struttura cristallina della mesofase di partenza. Partendo da mesofasi termodinamicamente stabili in eccesso di acqua, esattamente come quelle sopra menzionate, si ottengono dispersioni di nanoparticelle chiamate cubosomi, derivanti da mesofasi cubiche, ed “hexosomi”, derivanti da mesofasi esagonali.

1.3 POLIMORFISMO LIPIDICO

Come precedentemente introdotto, le molecole anfifiliche, quali i lipidi, sono in grado di auto assemblarsi in ambiente acquoso formando specifiche mesofasi, caratterizzate da un elevato ordine strutturale con periodicità a lungo raggio di una struttura elementare e disordine a corto raggio a livello delle catene alifatiche. Questo processo è determinato da effetti idrofobici e repulsivi propri della molecola che tende, in ambiente acquoso a formare aggregati in cui i gruppi polari vanno ad orientarsi verso la fase acquosa, mentre le catene apolari si dispongono in modo da minimizzarne le interazioni sfavorevoli con l'acqua. La complessità delle strutture e la loro geometria sono determinate da parametri esterni come temperatura, pH, pressione ed idratazione, oltre che dalle caratteristiche chimico-fisiche del lipide utilizzato. Se consideriamo una molecola lipidica all'interno di uno strato lipidico, essa è soggetta a tre forze (Figura 1.6):

- Forza di idratazione (F_h) che si instaura tra regioni polari;
- Forza idrofobica (F_f) che porta a minimizzare le interazioni con l'acqua della porzione idrofobica della molecola;
- Forza di repulsione sterica (F_c) che deriva dall'ingombro sterico delle catene alifatiche.

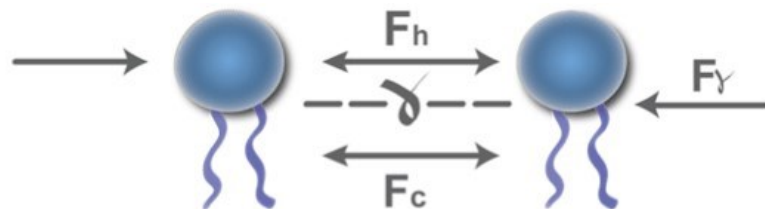


Figura 1.6 Interazioni tra molecole lipidiche in ambiente acquoso.

Se le forze di idratazione contribuiscono maggiormente di quelle di repulsione sterica, si ha la formazione di mesofasi dirette con lo strato lipidico che si ripiega verso la regione delle code. Viceversa, se è maggiore il contributo delle forze di repulsione sterica rispetto quelle di idratazione, si ha un ripiegamento del monostrato verso le teste polari determinando la formazione di fasi inverse. Infine, nel caso in cui i due valori si equivalgano, si ha la formazione di una struttura a doppio strato.

Un ulteriore fattore che determina la predisposizione da parte delle molecole lipidiche a formare specifiche mesofasi in ambiente acquoso è il CPP (critical packing parameter) che permette di prevedere la geometria assunta dalla mesofase lipidica considerando la forma geometrica del lipide stesso.

Il CPP è dato dal rapporto ^[6,5]:

$$CPP = \frac{V}{Al}$$

dove V è il volume occupato dalla catena apolare, l è la lunghezza della catena idrofobica ed A l'area occupata dalle teste polari. Tramite il CPP è possibile collegare struttura e proprietà della molecola utilizzata alla curvatura assunta dall'interfaccia polare-apolare, e quindi predire la sua disposizione spaziale e la forma dell'aggregato. Se CPP=1, i lipidi tendono ad assumere una struttura liquido-cristallina lamellare dove si ha la totale assenza di curvatura. Con CPP>1 la struttura che si forma ha una geometria a cono inverso dovuto ad un maggiore ingombro delle code idrofobiche rispetto alla testa polare della molecola lipidica, si ha quindi la formazione di strutture inverse come le esagonali e cubiche inverse (tipo II). Viceversa, nel caso in cui il CPP<1 sono privilegiate strutture definite "dirette" in cui la porzione idrofilica della molecola è maggiore rispetto a quella delle code e si ottengono così le cosiddette strutture "oil in water".

CAPITOLO 2

TARGETED DRUG DELIVERY

Nonostante i successi ottenuti nella ricerca su “drug delivery systems” da utilizzare per il trattamento di diverse malattie, restano però da risolvere alcune questioni che riguardano l’individuazione di materiali ad alto livello di biocompatibilità, in grado di individuare il sito di interesse e rilasciarvi specificatamente il farmaco in modo da minimizzare gli effetti collaterali. Infatti, molti sistemi di somministrazione non sono in grado di accumularsi selettivamente in uno specifico tessuto o organo malato ma vanno a distribuirsi in modo quasi omogeneo all’interno dell’organismo dando talvolta problemi di tossicità non specifica ed effetti collaterali anche in tessuti sani. Inoltre, per poter raggiungere il sito bersaglio devono oltrepassare barriere biologiche con il rischio che il farmaco possa degradarsi e diventare inattivo e quindi, per avere comunque concentrazioni di farmaco che possano dare attività terapeutica è necessario somministrarne dosi maggiori e con maggiore frequenza, in determinate parti dell’organismo. Una possibile soluzione a queste problematiche potrebbe essere quella di ricorrere al “drug targeting” così da permettere al farmaco di accumularsi in un organo, tessuto o cellula bersaglio in modo selettivo ed in quantità ideali, indipendentemente dal metodo di somministrazione.

In pratica, nella costruzione di un opportuno “targeted drug delivery system” si devono considerare tre componenti^[7]:

- *Farmaco*, quindi la molecola attiva o inattiva con potenziale capacità terapeutica;
- *Molecola target*, in genere rappresenta un anticorpo, un peptide o uno zucchero, in grado di legarsi in modo specifico al sito d’azione del farmaco, da includere nel particolare sistema di drug delivery utilizzato,

modificandone le caratteristiche superficiali come la biocompatibilità e la capacità di interagire con sistemi di riconoscimento cellulari (es. cellule intere od antigeni);

- *Carrier* (vettore), che deve essere in grado di proteggere il farmaco dalla degradazione e di “liberarlo” solo in corrispondenza del sito destinatario. Tra i vettori più utilizzati troviamo particelle polimeriche, liposomi o micelle e strutture colloidali.

Il passo successivo è quello di definire il metodo di direzionamento per i vettori, che può essere passiva oppure attiva (Figura 2.1). Nel primo caso la molecola carrier, contenente il farmaco, ma senza molecola target, tende ad accumularsi negli spazi interstiziali di regioni in cui si ha un aumento non normale della permeabilità dei vasi, come accade ad esempio in zone tumorali od infiammatorie, dove viene poi degradata rilasciando la molecola attiva. Nel targeting definito attivo, invece, si utilizzano nanostrutture funzionalizzate con ligandi specifici per riconoscere particolari recettori espressi in alcuni siti patologici. Questo tipo di “targeted drug delivery” si basa sul concetto secondo il quale ogni organo o tessuto ha sulla sua superficie determinate proteine, che prendono il nome di antigeni, sono destinate ad interagire con specifici ligandi. In particolare, in condizioni patologiche, tessuti e organi subiscono alterazioni fisiologiche, che comportano alterazioni a livello di recettori di membrana, i quali possono essere inattivati, non espressi od in altri casi sovraespressi. Un tipico esempio di riconoscimento carboidrati-proteine è quello che si verifica nel riconoscimento antigene-anticorpo alla base di numerosi processi infiammatori e che ha il compito di innescare il sistema immunitario.

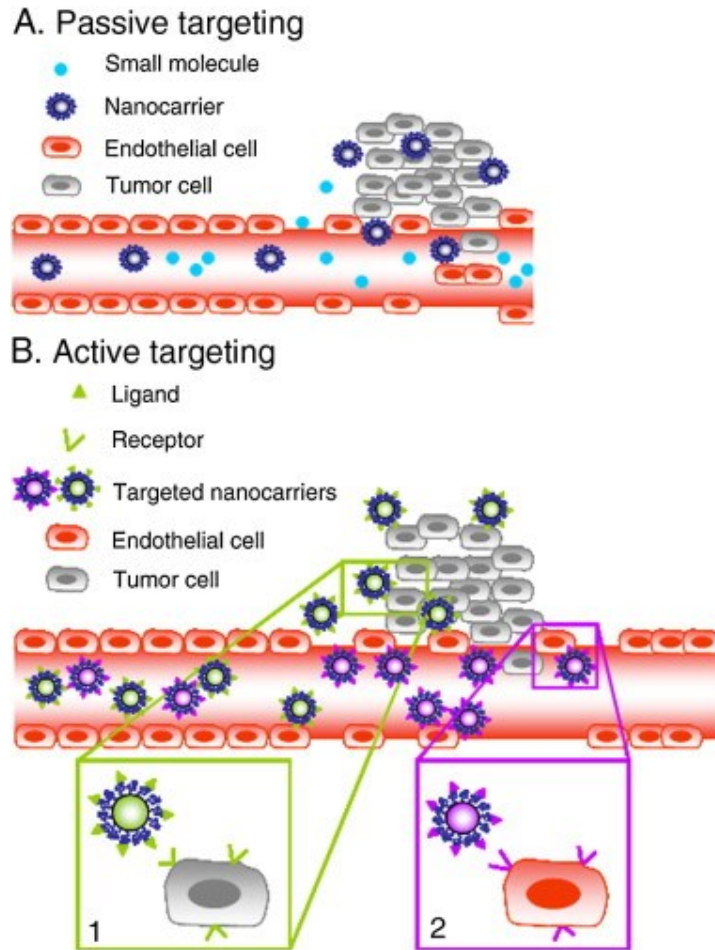


Figura 2.1 Schema di azione del targeting passivo (A) e attivo (B).

Nel caso specifico trattato in questo lavoro di tesi, è stata incapsulata una molecola antinfiammatoria, il desametasone, in nanostrutture liotropiche funzionalizzate con una molecola target glucidica, il mannosio, i cui recettori sono sovraespressi in stati infiammatori o dove viene coinvolto il sistema immunitario e le cellule che lo caratterizzano, in particolare i macrofagi.^[8,9] L'utilizzo di nanoparticelle funzionalizzate con mannosio dovrebbe favorire il trasporto del desametasone direttamente verso il sito in cui è in corso l'infiammazione, riducendone notevolmente gli effetti collaterali. In realtà nelle nanostrutture utilizzate, non è stato semplicemente inglobato il mannosio bensì un glicolipide, molecola non ionica e anfifilica in cui una o più

catene di acidi grassi di diverse lunghezze, sia sature che insature, si legano attraverso il loro gruppo carbossilico (-COOH) ai gruppi ossidrilici (-OH) di uno zucchero o carboidrato, più o meno complesso, come il mannosio in questo caso particolare (Figura 2.2).

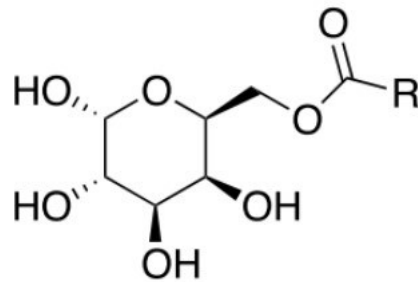


Figura 2.2 Estere del mannosio con catena laterale R di diverse lunghezze (R=C10, R=C14, R=C18).

I glicolipidi sono materiali naturali e di semplice reperibilità che possono avere numerose applicazioni sia in campo alimentare che farmaceutico, facilmente coniugati a farmaci e a molecole carrier. Infatti, la presenza delle catene lipofile degli acidi grassi permette ai glicolipidi di inserirsi all'interno della porzione idrofobica della nanostruttura mentre le teste polari (zuccheri) sono coinvolte nel riconoscimento cellulare e nella risposta anticorpale ^[10].

CAPITOLO 3

3.1 MONOLEINA (GMO)

Tra le molecole anfifiliche maggiormente utilizzate per la preparazione di cristalli liquidi troviamo il fitantriolo (PHY) o monogliceridi insaturi come la monooleina (GMO) entrambi insolubili in acqua. Per la preparazione dei nostri campioni viene utilizzare la monooleina, conosciuta anche con il nome di glicerolo monoleato, utilizzato per la prima volta come emulsionante ^[11].

La sua struttura (Figura 3.1) consiste in una molecola di glicerolo legata tramite un legame estereo ad una catena alchilica in cui in posizione C9 si ha un doppio legame di tipo cis. I due restanti atomi di carbonio del glicerolo legano gruppi ossidrilici, fornendo proprietà polari a questa porzione della molecola. Per tale motivo la molecola di GMO sarà caratterizzata da una zona idrofila, polare, in grado di formare legami idrogeno in ambiente acquoso, ed una idrofoba che la rendono anfifilica.

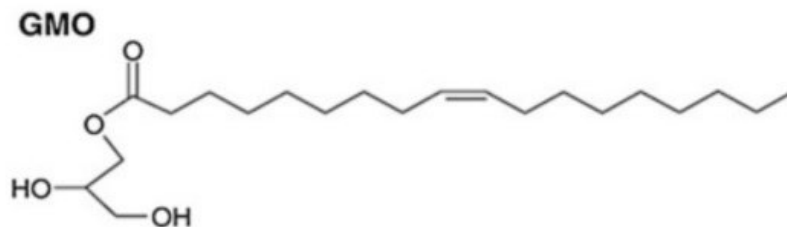


Figura 3.1 Struttura del glicerol monoleato (GMO).

Inoltre, tale molecola è biodegradabile, biocompatibile e classificata come GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro). ^[11]

In ambiente acquoso, la monooleina è in grado di auto assemblarsi in strutture diverse in funzione della concentrazione di acqua e della temperatura,

comportamento che viene rappresentato nel tipico diagramma di fase in Figura 3.2. Si può osservare che all'aumentare della concentrazione di acqua si ha il passaggio da una fase lamellare L_{α} ($c_W < 20\%$) a una fase cubica $Ia3d$ ($20\% < c_W < 40\%$) ed infine ad una cubica $Pn3m$ in eccesso di acqua ($c_W > 40\%$). A temperatura maggiore di 80 °C e in eccesso di acqua, la monooleina assume una fase esagonale inversa (H_{II}).

Nella preparazione dei campioni studiati in questa tesi è stata utilizzata una formulazione commerciale a base di monooleina (Monomuls®) contenente anche piccole percentuali di digliceridi, che dal punto di vista strutturale si comporta come la monooleina. Anche se non sono state preparate le dispersioni, nella preparazione dei campioni è stato aggiunto anche il polimero Pluronic F127 come stabilizzante.

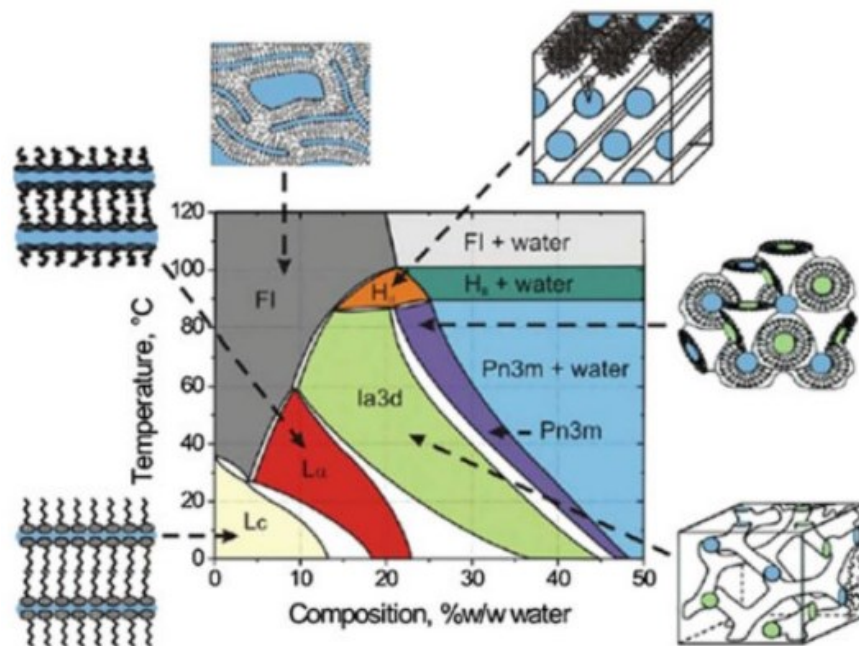


Figura 3.2 Diagramma delle fasi del GMO in funzione della concentrazione di acqua e della temperatura.

3.2 LIPIDI FUNZIONALIZZATI CON IL MANNOSIO

Il mannosio è uno monosaccaride aldeidico, esoso e destrogiro con formula bruta $C_6H_{12}O_6$ (Figura 3.3 A). Nello specifico si tratta di un epimero del glucosio a livello del carbonio C-2, in cui il gruppo -OH si posiziona in posizione α . In natura non si trova in forma libera ma all'interno polisaccaridi più o meno complessi, principalmente di natura vegetale. Il gruppo ossidrilico può essere esterificato o modificato per formare derivati in cui è coniugato con altre molecole. In questo studio, il mannosio è stato usato come glicoconiugato con acidi grassi saturi a diversa lunghezza, acido decanoico (MC10), acido miristico (MC14) e con l'acido oleico insaturo (MC18) (Figura 3.3 B). Questi glicolipidi sono stati aggiunti alla monooleina per la preparazione di miscele lipidiche utilizzate per l'incapsulamento del desametasone.

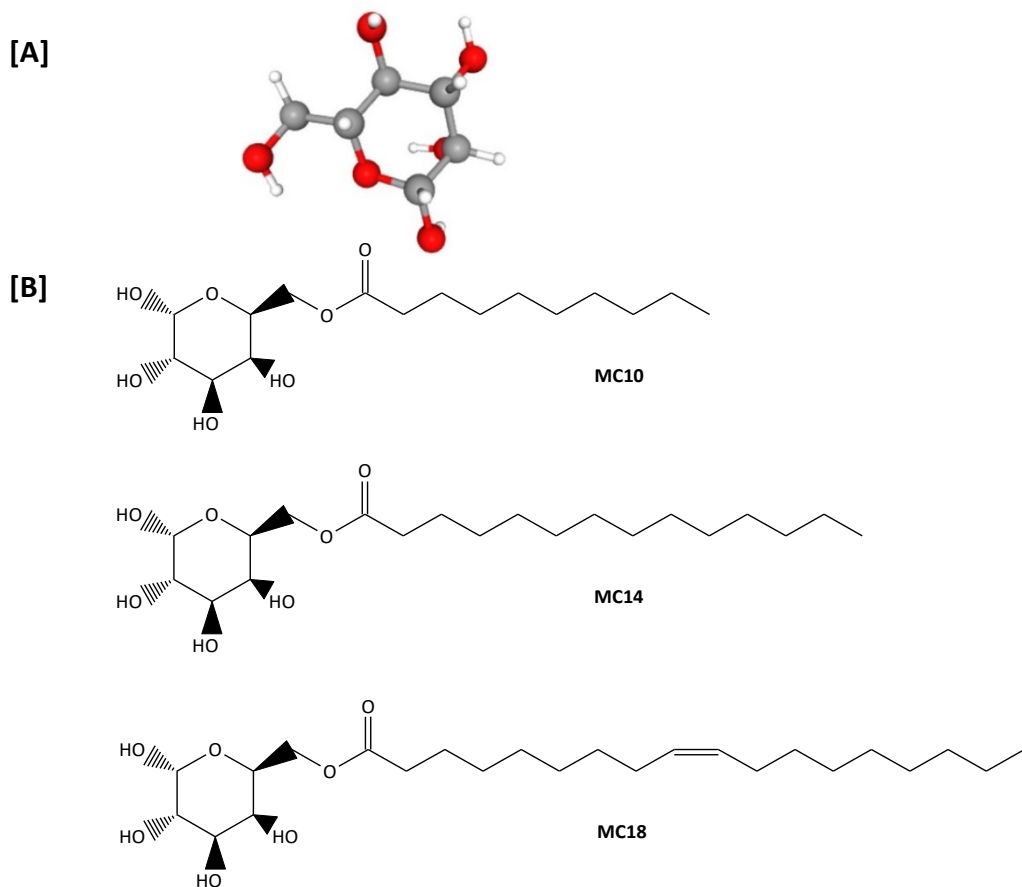


Figura 3.3 Struttura del mannosio (A) e dei glicolipidi utilizzati (B).

3.3 DESAMETASONE

Il desametasone (DEX) è uno steroide sintetico, di natura lipofila appartenente alla classe dei glucocorticoidi, simile agli ormoni steroidei (idrocortisone e prednisone) prodotti dalle ghiandole surrenali del nostro organismo.

Il desametasone ha formula molecolare $C_{22}H_{29}FO_5$ ed è caratterizzato, come tutti gli steroidi, dalla presenza di quattro anelli condensati di cui tre a 6 atomi di carbonio e uno a 5 atomi di carbonio. È uno steroide fluorurato con 1 atomo di Fluoro sul C-9 con gruppi ossidrilici (-OH) in posizione C-11, C-17 e C-21, gruppi metilici in posizione C-16, C-18, C-19 e gruppi carbonilici (C=O) in posizione C-3 e C-20. ^[12]

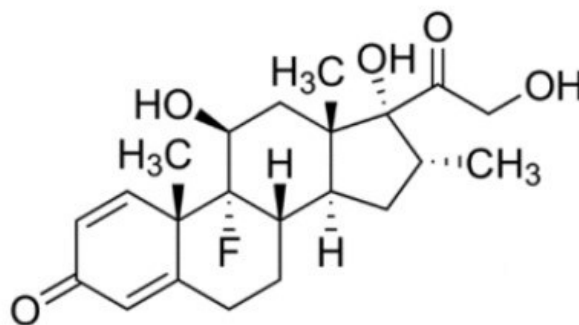


Figura 3.4 Struttura del desametasone (DEX).

Il desametasone è noto per le sue proprietà antinfiammatorie e viene impiegato nel trattamento di tutte quelle patologie che richiedono l'utilizzo di corticosteroidi. Il DEX viene utilizzato in particolare per il trattamento di malattie acute e croniche localizzate nel segmento posteriore dell'occhio, come può essere l'uveite, somministrato attraverso delle gocce oculari. ^[13] Il suo utilizzo può provocare effetti collaterali dovuti alla forma salificata in cui è presente nelle gocce oculari di difficile assorbimento. Per questo motivo

occorre un maggior numero di somministrazioni che, se protrate nel tempo, portano a lesioni della cornea e del nervo ottico. ^[13]

I corticosteroidi possono essere inoltre utilizzati in pazienti con lesioni intracraniche per ridurre gli edemi cerebrali. Sono inoltre le prime linee di difesa nei confronti di tutti quegli effetti avversi immuno-correlati che possono svilupparsi durante o dopo l'immunoterapia, anche se ad oggi non è chiaro come gli steroidi influenzino l'immunità e se i loro effetti dipendano da quando il farmaco viene somministrato. ^[14]

L'uso prolungato di DEX induce farmaco-resistenza, ipertensione, osteoporosi e un alto rischio di infezione. ^[15] Questi effetti collaterali sono dovuti a non-specifiche interazioni del farmaco con tessuti e cellule; pertanto, una strategia possibile per ridurre la somministrazione, e quindi gli effetti collaterali, è quella di veicolarlo in un opportuno vettore.

3.4 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

In questo paragrafo viene riportata la procedura seguita per la preparazione dei campioni in fase gel.

In pratica, la monooleina viene miscelata con l'opportuna quantità di glicolipide (10 e 30 mol%) e sciolti in cloroformio. A questa soluzione, viene aggiunto un 8% in peso (rispetto ai lipidi totali) di Pluronic F127. Il solvente viene evaporato sotto flusso di azoto, e per seccare meglio il campione, viene lasciato per 4 ore sottovuoto. Al residuo ottenuto si aggiunge acqua in eccesso (per 30 mg di lipide, ca 200 μ L di acqua) e si lascia equilibrare per 24 ore.

Nel caso dei sistemi contenenti DEX, il farmaco sciolto in metanolo viene miscelato (8% in peso rispetto al lipide) con la soluzione cloroformica di lipidi prima dell'evaporazione del solvente e dell'idratazione.

3.5 DIFFRAZIONE DEI RAGGI-X: TECNICA DI CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE

I raggi-X sono un tipo di onde elettromagnetiche caratterizzate da una lunghezza d'onda (λ) compresa tra i 10^{-8} m ed i 10^{-12} m e sono in grado di trasferire una grande quantità di energia per cui vengono definite radiazioni ionizzanti. Facendo riferimento allo spettro elettromagnetico riportato in figura (Figure 3.5) queste si collocano tra i raggi gamma e gli ultravioletti.

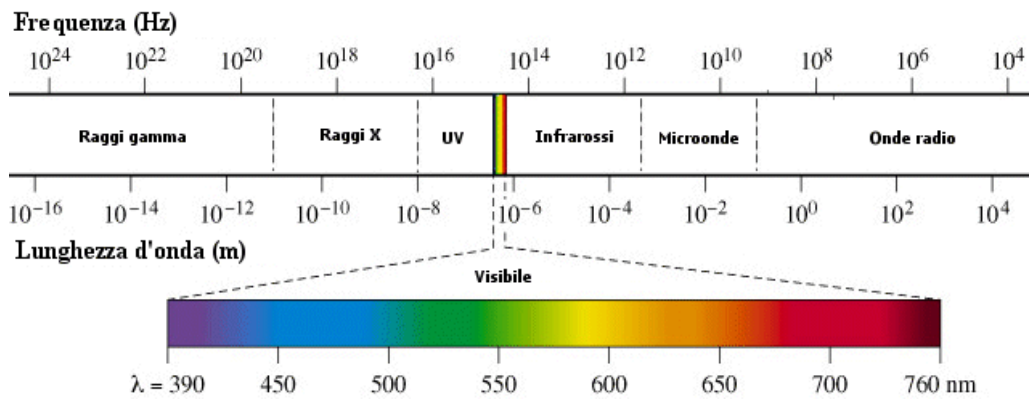


Figura 3.5 Spettro elettromagnetico.

La diffrattometria dei raggi X viene utilizzata per l'indagine strutturale di sistemi inorganici, solidi cristallini, biologici e sistemi liquido cristallini. Tale classe di radiazione ha una lunghezza d'onda confrontabile con le distanze reticolari, condizione necessaria affinché si verifichi il fenomeno fisico della diffrazione. La diffrazione dei raggi X da parte di un reticolo cristallino può essere spiegata tramite la legge di Bragg. Supponiamo di avere un certo numero di piani reticolari di un cristallo tutti equidistanti tra loro: se un fascio di raggi X incide sul cristallo in modo da formare un angolo di incidenza ϑ e una parte di questi viene diffusa in modo elastico dal cristallo, così che la lunghezza d'onda del fotone non vari con la riflessione, si avrà un fascio diffratto solo quando la

riflessione dei piani paralleli interferiscono costruttivamente secondo la relazione

$$n\lambda = 2d \sin \vartheta$$

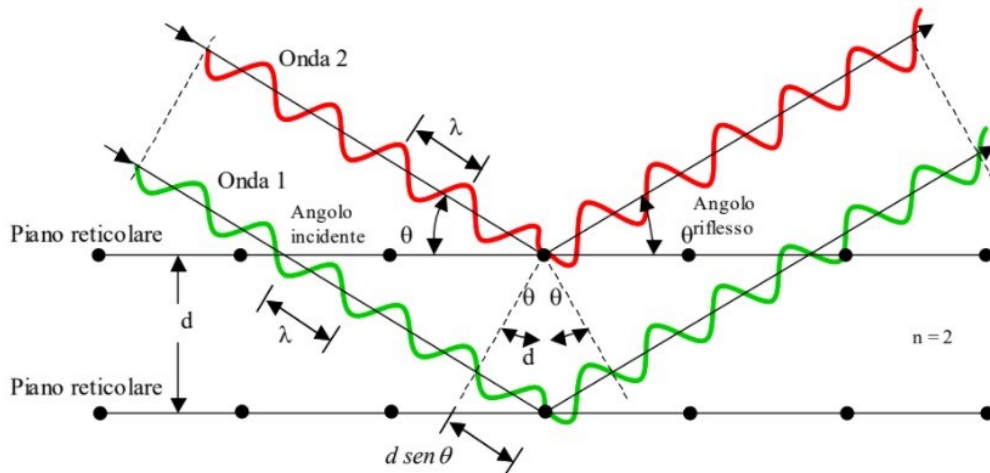


Figure 3.6 Diffrazione dei raggi X.

dove λ è la lunghezza d'onda del fascio incidente, d è la distanza reticolare tra i piani paralleli, ϑ è l'angolo di incidenza tra il fascio e il piano cristallini, n è un numero intero positivo (Figura 3.6). Dall'analisi di uno spettro di diffrazione possiamo ottenere informazioni riguardo la simmetria dal rapporto delle posizioni dei picchi di Bragg e le dimensioni del reticolo cristallino della legge di Bragg.

I sistemi riportati in questa tesi sono stati studiati utilizzando la sorgente di luce di sincrotrone di Elettra (Trieste) presso la linea SAXS (Small Angle X-ray Scattering). L'elevata intensità e concentrazione del fascio di luce generato da un sincrotrone rende tale fascio circa un milione di volte più brillante di un fascio di raggi X generato da una semplice apparecchiatura da laboratorio. La radiazione di sincrotrone viene prodotta quando gli elettroni, percorrendo un

anello di accumulazione di 260 m di diametro a velocità relativistiche, vengono deviati da campi magnetici forzandoli a percorrere una traiettoria circolare. La radiazione così generata viene fatta passare attraverso una serie di specchi e monocromatori al fine di selezionare la lunghezza d'onda necessaria desiderata e convogliata alla stazione sperimentale (Beamline) presso la quale viene svolto l'esperimento. Attualmente ad Elettra ci sono 28 linee di luce nelle quali è possibile utilizzare tecniche basate sui raggi X nei settori della spettroscopia, diffrazione, scattering e litografia¹⁶. In particolare, il SAXS è una tecnica di rilevazione standard, non distruttiva ed altamente versatile, che trova impiego in diversi campi, permettendo la caratterizzazione strutturale di diversi materiali a partire da nanosistemi fino a macromolecole biologiche. Tale tecnica è stata impiegata per lo studio di caratterizzazione dei nanosistemi riportati in questa tesi.

Identificazione delle fasi

Per identificare la struttura di un sistema si deve per prima cosa trovare la simmetria del reticolo andando ad individuare quale equazione teorica, tra quelle che stabiliscono la posizione dei picchi di diffrazione, sia il più possibile conforme alla sequenza di picchi ottenuti sperimentalmente. La simmetria, infatti, si riflette in una serie di riflessioni di Bragg che nello spazio reciproco hanno specifici rapporti di posizione. Di seguito nella Tabella 3.1 vengono riportate le equazioni che descrivono le posizioni dei picchi osservati in sistemi liotropici mentre nella Tabella 3.2 le sequenze dei picchi di riflessione osservabili per ciascuna fase.

Fase lamellare monodimensionale	$S_{hk} = \frac{h}{d}$
Fase esagonale bidimensionale	$S_{hk} = \frac{(\frac{2}{\sqrt{3}})\sqrt{h^2+k^2+l^2}}{a}$
Fase cubica tridimensionale	$S_{hkl} = \frac{\sqrt{h^2+k^2+l^2}}{a}$

Tabella 3.1 Equazioni relative a differenti tipi di simmetria. S_{hk} è lo spazio reciproco della riflessione degli indici h, k, l ; d è la distanza di ripetizione della fase lamellare; a è la dimensione dell'unità di cella.

Q ²²³	Pm3m	√2, √4, √5, √6, √8, √10, √12...
Q ²²⁴	Pn3m	√2, √3, √4, √6, √8, √9, √10...
Q ²²⁷	Fd3m	√3, √8, √11, √12, √16, √19, √24...
Q ²²⁹	Im3m	√2, √4, √6, √8, √10, √12, √14...
Q ²³⁰	Ia3d	√6, √8, √14, √16, √20, √22, √24...
H _{II}		1, √3, √4, √7, √9, √12...

Tabella 3.2 Rapporti delle posizioni dei picchi osservati negli esperimenti di diffrazione dai raggi X per ogni fase.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo sono riportati una serie di esperimenti di diffrazione dei raggi X sia sulle matrici lipidiche vuote, al variare della natura e della concentrazione del glicolipide, che sui corrispondenti complessi con il farmaco incapsulato. Questo studio ci ha permesso di identificare le differenti strutture che si formano quando alla monooleina (GMO) vengono aggiunte differenti concentrazioni dei glicolipidi precedentemente descritti, ed eventuali transizioni di fase indotte dalla presenza del farmaco. Tutti i sistemi analizzati sono campioni in fase gel, in presenza del polimero F127 e in eccesso di acqua. Lo studio strutturale è stato eseguito sui seguenti sistemi:

Matrici lipiche vuote:

- 1) GMO
- 2) GMO/MC10 (10%, 30%)
- 3) GMO/MC14 (10%, 30%)
- 4) GMO/MC18 (10%, 30%)

Matrici lipiche contenenti Desametasone:

- 5) GMO +Dex
- 6) GMO/MC10 (10%, 30%) + Dex
- 7) GMO/MC14 (10%, 30%) + Dex
- 8) GMO/MC18 (10%, 30%) + Dex

Nelle figure 4.1 - 4.4 sono riportati i profili di diffrazione dei sistemi sopra elencati da cui sono state identificate le fasi e ricavati i parametri strutturali come la dimensione dell'unità di cella e le dimensioni dei canali acquosi come riportato in Tabella 4.1

Tabella 4.1 Parametri strutturali: dimensione dell'unità di cella (a) e raggio del canale acquoso (r_w) delle fasi cubiche; spaziatura della fase lamellare (d).

CAMPIONI	VUOTO	DEX
GMO	$Im3m$ $a=138 \text{ \AA}; r_w=25.1 \text{ \AA}$	$Im3m$ $a =148 \text{ \AA}; r_w=28.2 \text{ \AA}$
GMO/MC10 (10%)	$Im3m$ $a=200 \text{ \AA}; r_w=44.1 \text{ \AA}$	$Im3m$ $a=273 \text{ \AA}; r_w=66.4 \text{ \AA}$
GMO/MC10 (30%)	L_α $d=48 \text{ \AA}$	L_α $d =48 \text{ \AA}$
GMO/MC14 (10%)	$Im3m$ $a =175 \text{ \AA}; r_w=36.4 \text{ \AA}$	$Im3m$ $a = 204 \text{ \AA} + 214 \text{ \AA};$ $r_w=45.3\text{\AA}; r_w=48.4 \text{ \AA}$
GMO/MC14 (30%)	L_α $d=49,4 \text{ \AA}$	L_α $d=49,4 \text{ \AA}$
GMO/MC18 (10%)	$Im3m$ $a=171 \text{ \AA}; r_w=35.2 \text{ \AA}$	$Im3m$ $a=179,5 \text{ \AA}; r_w=37.7\text{\AA}$
GMO/MC18 (30%)	L_α $d=49,8 \text{ \AA}$	L_α $d=49,8 \text{ \AA}$

In Figura 4.1 vengono riportati gli spettri di diffrazione della matrice lipidica **GMO** vuota (A) e in presenza del farmaco, desametasone (B). Entrambi i profili mostrano la sequenza dei picchi di Bragg che corrisponde alla simmetria di una fase cubica di tipo $Im3m$ ($\sqrt{2}:\sqrt{4}:\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{10}:\sqrt{12}:\sqrt{14}$). Nella sola matrice lipidica il parametro della cella unitaria è $a= 138 \text{ \AA}$, l'incapsulamento del farmaco non induce variazioni nella simmetria della fase, che rimane una cubica $Im3m$, ma si osserva un aumento della dimensione di cella che diventa $a= 148 \text{ \AA}$. L'incremento dell'unità di cella (a) è probabilmente dovuto all'inserimento del desametasone nella porzione polare-apolare del bilayer lipidico che induce un aumento della porzione polare e di conseguenza una diminuzione della curvatura della fase cubica.

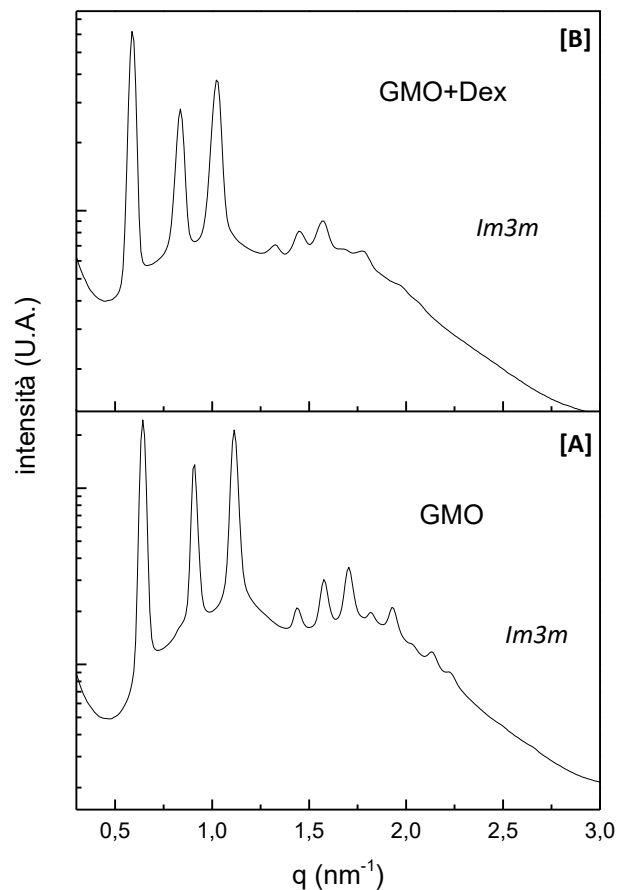


Figura 4.1 Spettri di diffrazione del campione con GMO (A), e del campione GMO+DEX (B).

Il secondo sistema analizzato è formato da una miscela lipidica costituita dalla GMO e dal lipide (MC10), funzionalizzato con mannosio. In Figura 4.2 vengono riportati gli spettri relativi ai sistemi **GMO/MC10** al **10%** e al **30%** di lipide funzionalizzato, rispettivamente vuoti (A) e (C) e con aggiunta di desametasone (B) e (D).

L'aggiunta del 10% di glicolipide alla GMO comporta un aumento del parametro di cella che passa da $a = 138 \text{ \AA}$ ad $a = 200 \text{ \AA}$, senza variazioni della simmetria della fase cubica che rimane una $Im3m$ (Figura 4.2 (A)). Anche in questo caso l'incapsulamento del farmaco all'interno della struttura comporta un ulteriore aumento del parametro di cella che diventa $a = 273 \text{ \AA}$ (Figura 4.2 (B)). La presenza del glicolipide, caratterizzato da una testa polare (molecola di mannosio) più grande di quella della GMO, e successivamente l'incapsulamento del farmaco inducono un incremento della porzione polare-apolare portando alla formazione di strutture cubiche con unità di cella e con canali acquosi molto grandi (Tabella 4.1). La presenza del glicolipide al 30% provoca una transizione di fase da una $Im3m$ ad una fase lamellare L_α (il rapporto delle posizioni dei picchi corrisponde alla serie (1: 2: 3: 4) con una spaziatura dell'ordine di $d = 48 \text{ \AA}$ (Figura 4.2(C)). In questo sistema l'incapsulamento del farmaco non ha alcun effetto né sulla simmetria né sulle dimensioni della fase (Figura 4.2(D)).

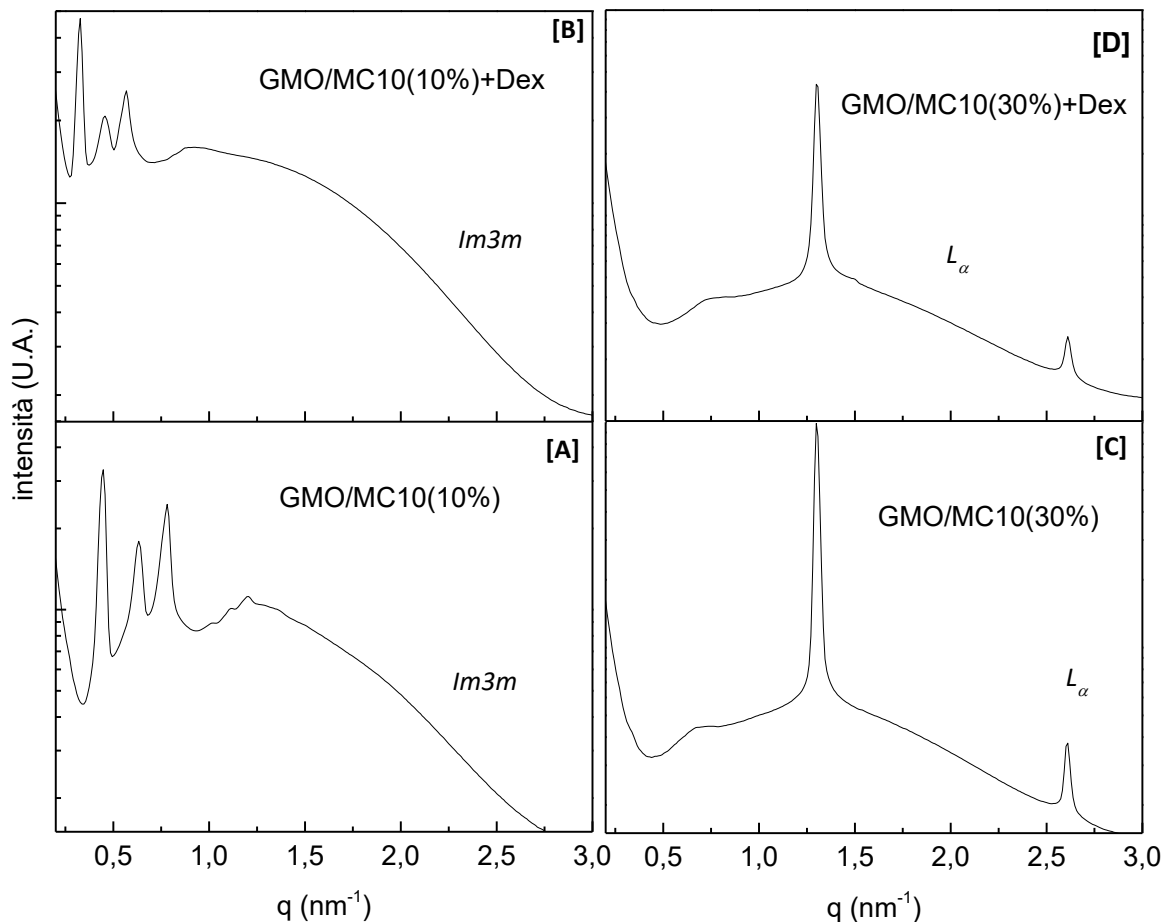


Figura 4.2 Spettri di diffrazione dei nanosistemi funzionalizzati con glicolipide MC10 al 10% sia vuoto (A) che con il desametasone (B) e con MC10 al 30% sia vuoto (C) che con il desametasone (D).

Il terzo sistema analizzato formato dalla miscela lipidica **GMO** e **MC14** viene riportato in Figura 4.3. Il profilo di diffrazione della matrice lipidica costituita da GMO e MC14 al **10%**, in Figura 4.3(A), corrisponde ad una struttura cubica con simmetria *Im3m* e con un'unità di cella pari ad $a = 178 \text{ \AA}$, dimensione più piccola rispetto al sistema GMO/MC10 al 10%. Infatti, la presenza di una catena alchilica saturata a 14 atomi di carbonio potrebbe determinare un incremento del disordine delle catene idrocarburiche e di conseguenza un aumento del volume

della porzione idrofobica in grado di bilanciare, in parte, l'aumento della porzione idrofila. L'aggiunta del farmaco determina, come nei casi precedenti, un aumento del parametro di cella pari ad $a=214 \text{ \AA}$ (Figura 4.3(B)). La presenza del glicolipide MC14 al **30%**, come osservato nel sistema MC10 al 30%, induce la transizione di fase dalla $Im3m$ alla fase lamellare L_α con una spaziatura di $d=49 \text{ \AA}$ (Figura 4.3(C)) che rimane inalterata anche all'aggiunta del desametasone.

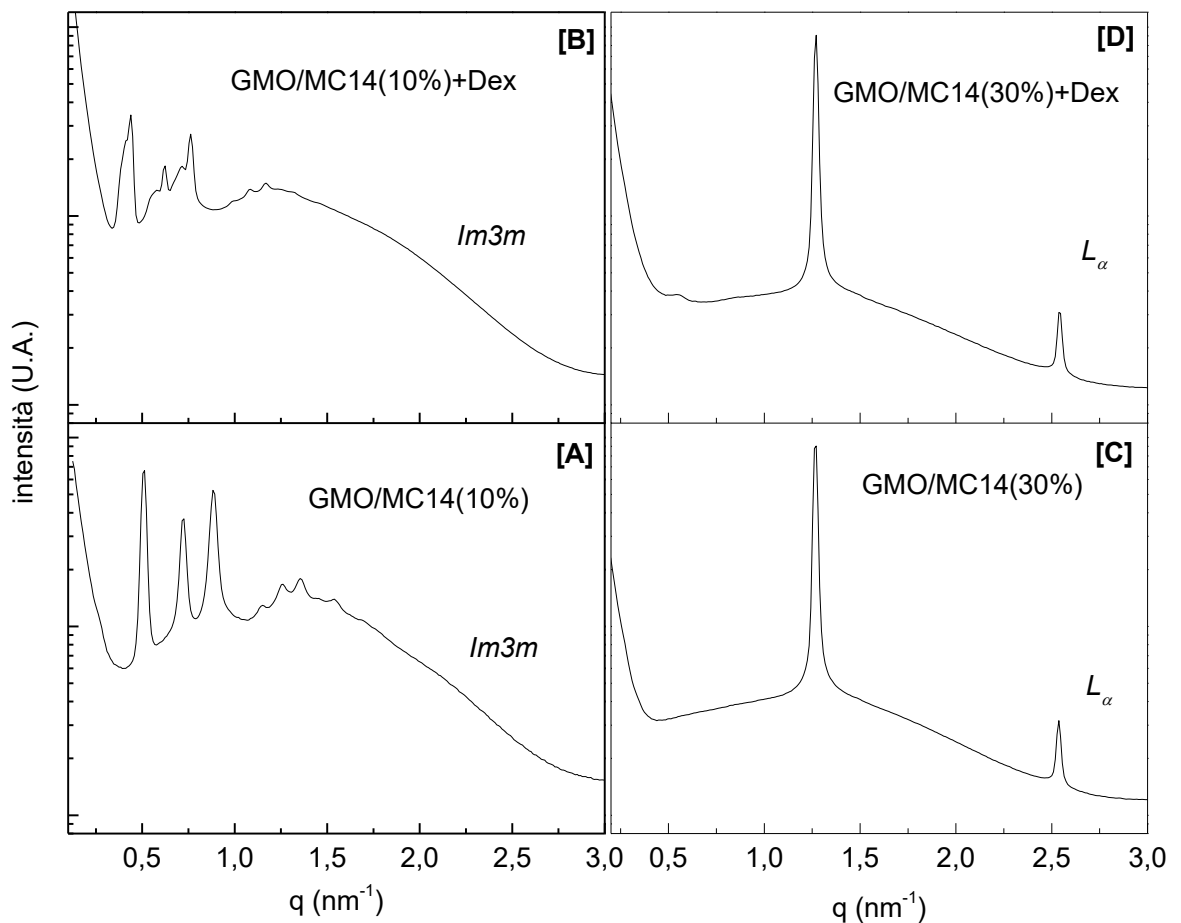


Figura 4.3 Spettri di diffrazione dei nanosistemi funzionalizzati con glicolipide MC14 al 10% sia vuoto (A) che con il desametasone (B) e con MC14 al 30% sia vuoto (C) che con il desametasone (D).

Il quarto sistema analizzato è formato dalla miscela lipidica **GMO** e **MC18** (Figura 4.4). L'aggiunta del glicolipide MC18 al **10%** non determina transizioni di fase e come mostrato in Figura 4.4 (A) il sistema ha una simmetria $Im3m$ con unità di cella pari a $a=171 \text{ \AA}$ che aumenta leggermente quando viene incapsulato il desametasone a $a=179 \text{ \AA}$ (Figura 4.4(B)). Analogamente al sistema precedente l'aumento della concentrazione del lipide funzionalizzato al **30%** provoca la transizione alla fase lamellare $d=50 \text{ \AA}$ (Figura 4.4(C)) e la presenza del farmaco non influisce né sulla simmetria né sulla spaziatura (Figura 4.4(D)).

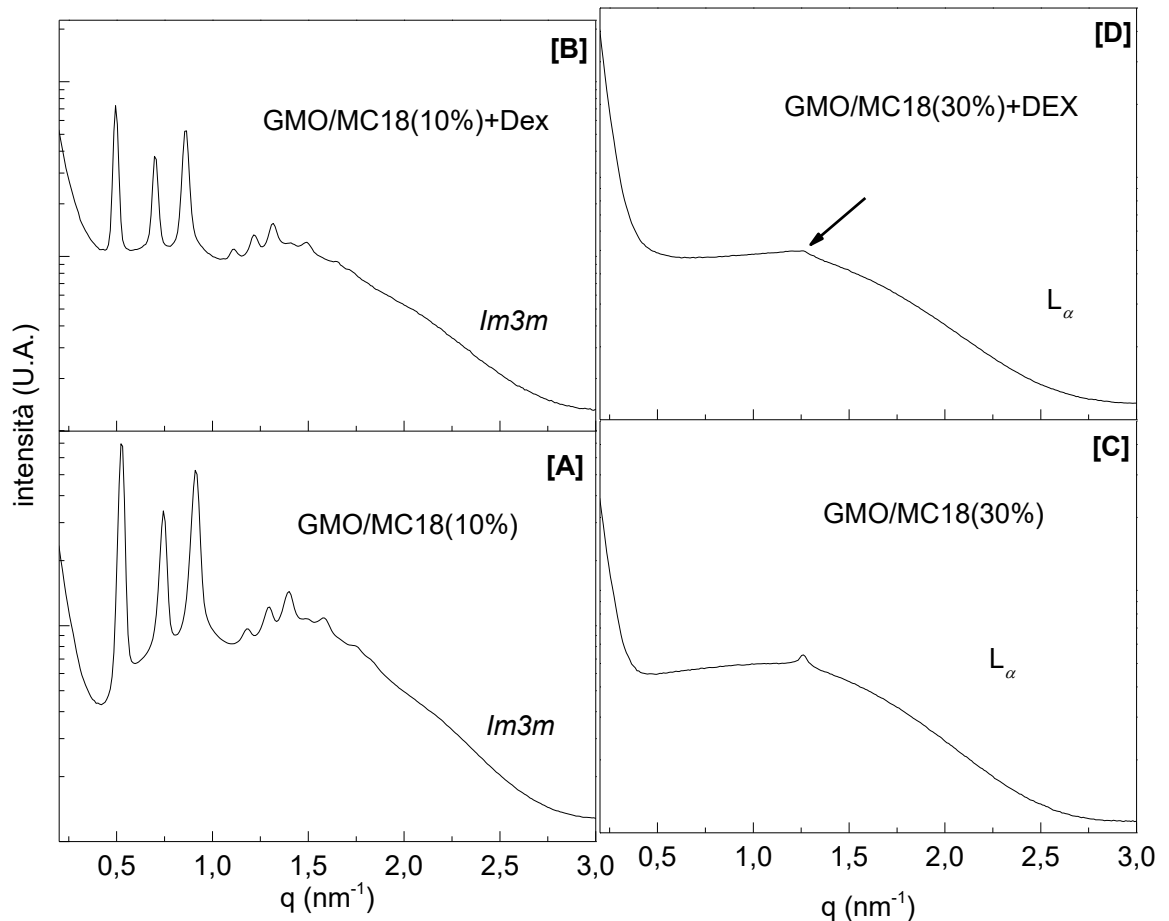


Figura 4.4 Spettri di diffrazione dei nanosistemi funzionalizzati con glicolipide MC18 al 10% sia vuoto (A) che con il desametasone (B) e con MC18 al 30% sia vuoto (C) che con il desametasone (D).

CONCLUSIONE

In questo lavoro di tesi sono stati caratterizzati, per mezzo della diffrazione dei raggi X, sistemi a matrice lipidica con diversa composizione, in assenza e in presenza di desametasone. Le strutture analizzate sono miscele lipidiche di GMO e lipidi diversi (MC10, MC14, MC18) legati ad una molecola di mannosio, in cui è stato incapsulato il farmaco desametasone. Tali sistemi sono stati studiati a temperatura ambiente (25 °C) e dall'analisi degli spettri di diffrazione ottenuti è stato possibile stabilire per ogni campione il tipo di fase assunta ed eventuali transizioni di fase dovute dalle differenti composizioni dei campioni e dalla presenza o meno del farmaco.

L'aggiunta del glicolipide alla GMO determina in genere una progressiva diminuzione della curvatura della fase cubica $Im3m$ (all'aumentare della concentrazione di glicolipide) fino a ottenere una struttura lamellare (L_α) a curvatura nulla. Nel caso del glicolipide MC18, che ha la catena idrocarburica identica a quella della GMO, le variazioni di curvatura sono minori e la transizione alla fase lamellare si osserva solo alla concentrazione più alta di MC18. L'incapsulamento del desametasone non induce transizioni di fase ma determina un aumento dell'unità di cella (a) e del raggio (r_w) dei canali acquosi nei sistemi in fase cubica in cui il farmaco si colloca all'interfaccia polare-apolare, mentre lascia invariata la spaziatura (d) nelle fasi di tipo lamellare.

A questa prima fase di caratterizzazione dei diversi nanosistemi contenenti desametasone, seguiranno ulteriori esperimenti volti a verificare la loro capacità di "targeted delivery" in sistemi cellulari con processo infiammatorio in atto nei quali si ha over-espressione dei recettori per il mannosio.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Zhai J., Fong C, Tran N, Drummond C. J., "Non-Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline Lipid Nanoparticles for the Next Generation of Nanomedicine", *Acs nano*, (2019), 13:6178-6206.
- [2] Akbarzadeh et al.: "Liposome:classification,preparation, and application.", *Nanoscale Research Letters* 8:1-2, (2013).
- [3] Lancelot A., Sierra T., "Nanostructured liquid-crystalline particles for drug delivery", *Expert Opin. Drug Deliv.*, (2014), 11:547-564.
- [4] J. Mo, G. Milleret & M. Nagaraj , "Liquid crystal nanoparticles for commercial drug delivery", *Liquid Crystal Reviews*, (2017), 5:2, 69-85.
- [5] Guo C., Wang J., Cao F., Lee R. J, Zhai G., "Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery", *Drug Discovery Today* (2010) 15: 1032-1040.
- [6] Garti N., Libster D., Aserin A., "Solubilization and Delivery of Drugs from GMO-Based Lyotropic Liquid Crystals", *NanoScience and Technology*, (2014), 12: 355-409.
- [7] Vladimir P. Torchilin, "Drug targeting", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11 Suppl. 2 ,(2000), S81-S91.
- [8] Bhattacharya S. & Aggarwal A., "M2 macrophages and their role in rheumatic diseases", *Rheumatology International* 39, 769-780, (2019).
- [9] Cai, L. et al. "Advances in glycosylation-mediated cancer-targeted drug delivery", *Drug Discovery Today* 23,1126-1138, (2018).
- [10] Faivre V.& Rosilio V., "Interest of glycolipis in drug delivery: from physicochemical properties to drug targeting" *Expert Opin. Drug Deliv.*, (2010), 7(9):1031-1048.
- [11] Milak S., Zimmer A., "Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems", *International journal of Pharmaceutics* (2014), 14511: 1-19.
- [12] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5743>.
- [13] L. Gan et al./ *International Journal of Pharmaceutics* 396,(2010), 179-187.

[14] Giles et al., "Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implication for immunotherapy", *Journal for immunotherapy of cancer*, (2018), 6:51.

[15] L. Xue, D. Wang, X. Zhang, S. Xu, N. Zhang, "Targeted and triple therapy-based liposomes for enhanced treatment of rheumatoid arthritis", *International Journal of Pharmaceutics* (2020).

[16] <https://www.elettra.eu>