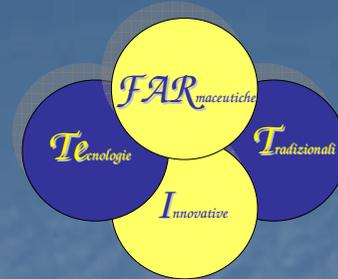




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MODENA E REGGIO EMILIA



Te.Far.T.I.

CENTRO DI RICERCA
SULLE TECNOLOGIE
FARMACEUTICHE
TRADIZIONALI ED
INNOVATIVE

NANOPARTICELLE PER IL DIREZIONAMENTO CEREBRALE DI FARMACI

G. Tosi*, L. Costantino*, F. Gandolfi*, B. Ruozi*, F. Rivasi**, F. Forni*, M.A. Vandelli*

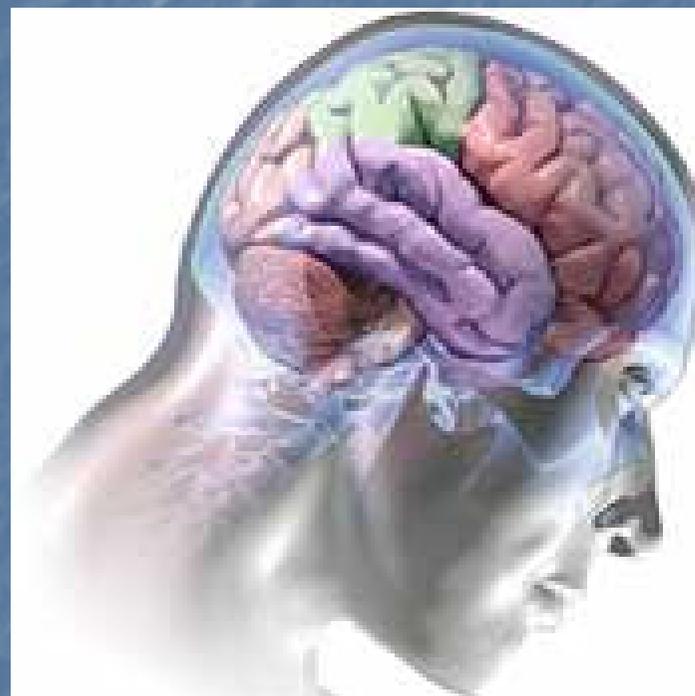
* Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Modena e Reggio Emilia, Via Campi 183, 41100 Modena

**Dipartimento Integrato Servizi Diagnostici e di Laboratorio e di Medicina Legale, Università di Modena e Reggio Emilia, Via del Pozzo 71, 41100 Modena.

tosgi.giovanni@unimore.it

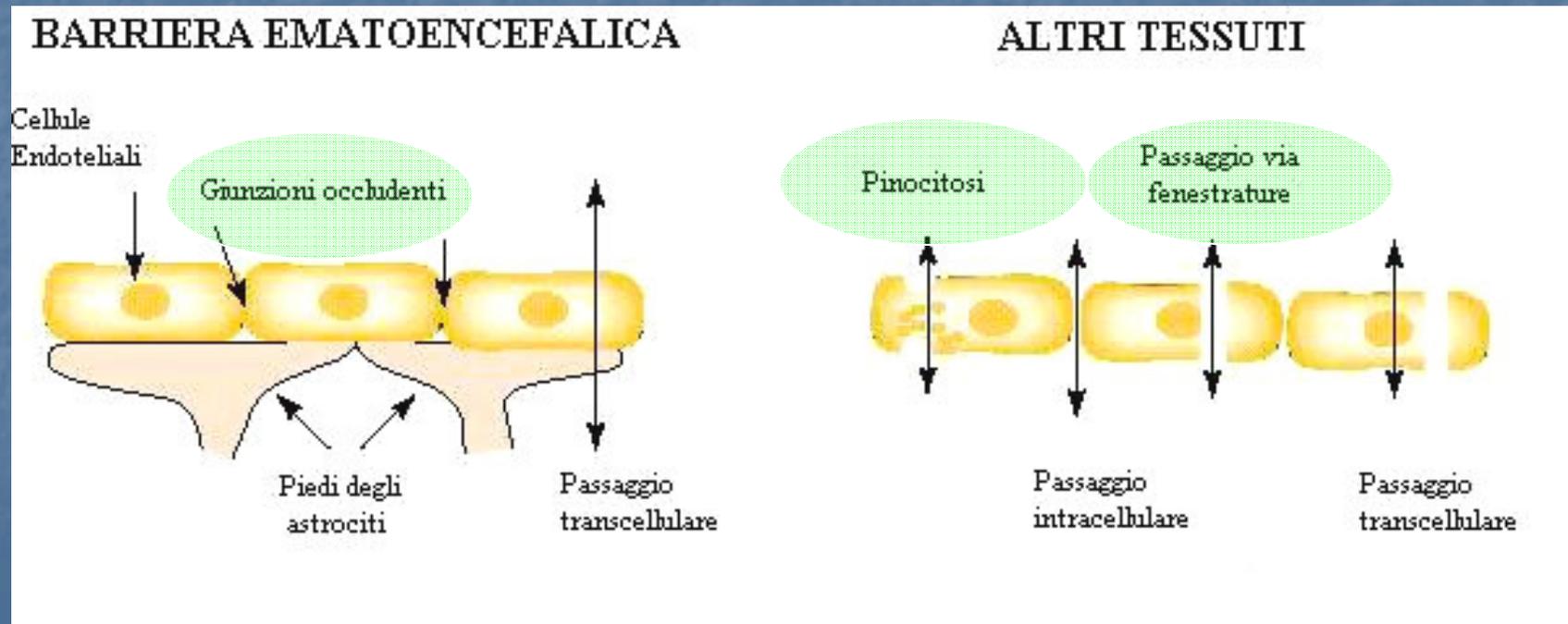
DIREZIONAMENTO DI FARMACI al Sistema Nervoso Centrale

- **Patologie cerebrali come tumori, demenza da HIV, ischemie**
- **Difficoltà di raggiungere concentrazioni sufficienti nei distretti cerebrali**
- **Barriera Ematoencefalica (BEE)**
- **Superamento della BEE**

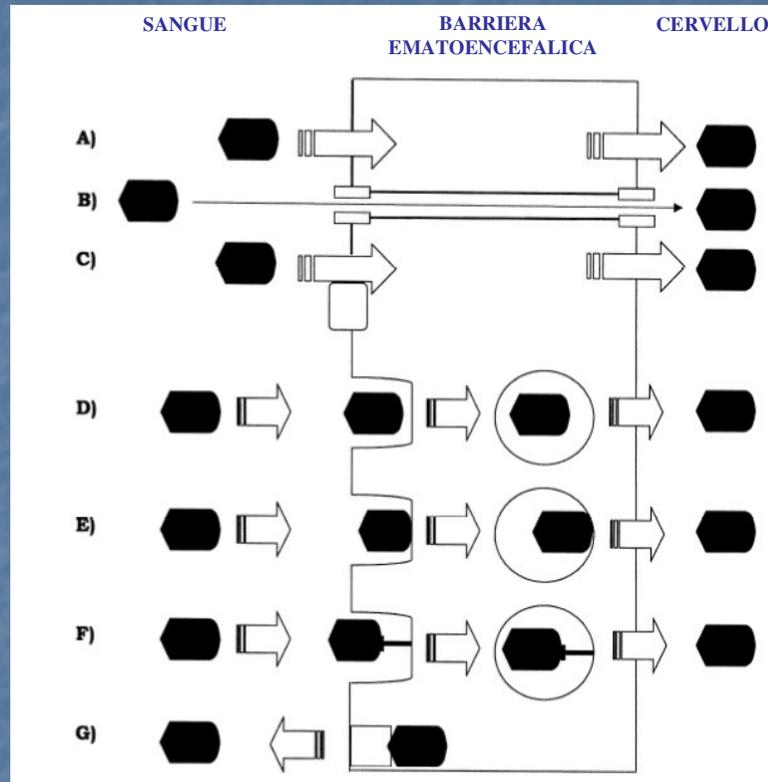


Barriera Ematoencefalica

- Mancanza di fenestrature nelle cellule endoteliali di vasi
- Giunzioni occludenti fra le cellule delle pareti vascolari
 - Alto numero di tight-junction
- Basso numero di vescicole pinocitiche
 - Processi metabolici alterati



Passaggio attraverso BEE di sostanze

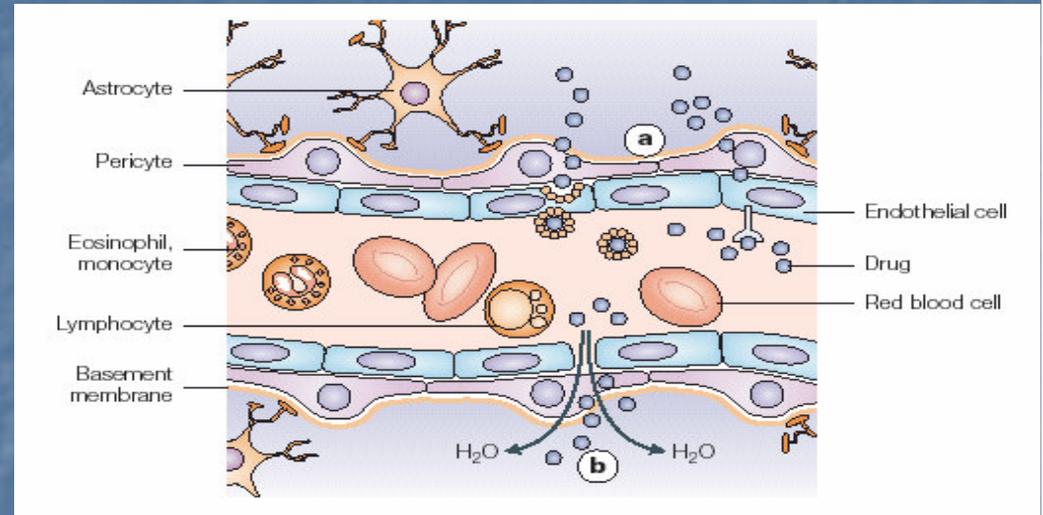


- A.** Diffusione transcellulare;
- B.** Diffusione paracellulare;
- C.** Trasporto mediato da Carrier;
- D.** Endocitosi in fase fluida;
- E.** Endocitosi per assorbimento;
- F.** Endocitosi mediata da recettore;
- G.** Efflusso.

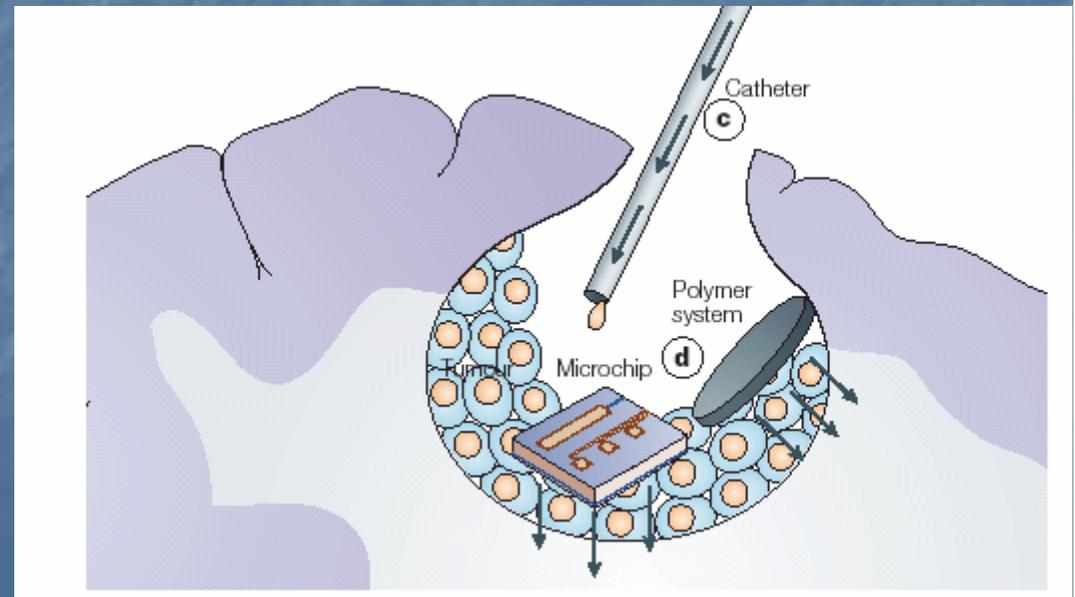
98% dei farmaci utilizzabili in patologie cerebrali non supera la BEE (peso molecolare, polarità)

Approcci invasivi

Rottura temporanea delle *tight-junction*

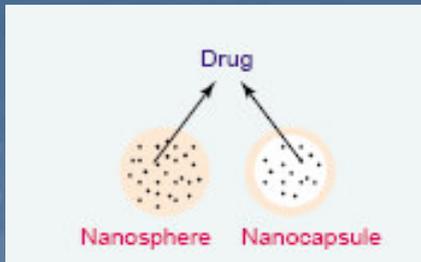


**Infusione intracerebrale,
o impianti intracerebrali**
(Cateteri, microchip,
sistemi polimerici)



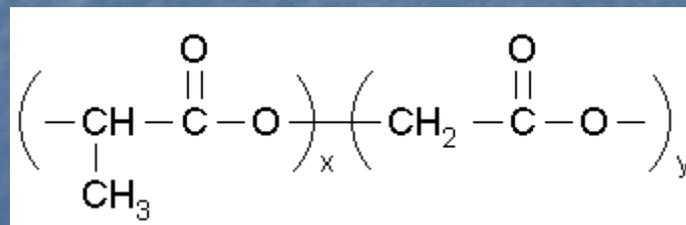
Approcci non invasivi

- Pro-drug
- Coniugazione dei farmaci con un vettore di trasporto quali proteine modificate, anticorpi monoclonali, recettori di barriera
- ***Nanoparticelle e liposomi***



Nanoparticelle

- Sistemi polimerici di dimensioni nanometriche di forma sferica
 - Polimeri biodegradabili e biocompatibili
 - Non tossici ed immunogenici
- **Copolimero acido lattico e glicolico (PLGA)**



Modificazioni del polimero

- Limitata permeabilità della BEE da parte di Np di PLGA
- Modificazioni con molecole "ligando-specifiche"

- Internalizzazione mediata da recettore
- Peptidi oppioidi
- MMP-2200 (H₂N-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Ser-O-β-D-lactose-CONH₂) *

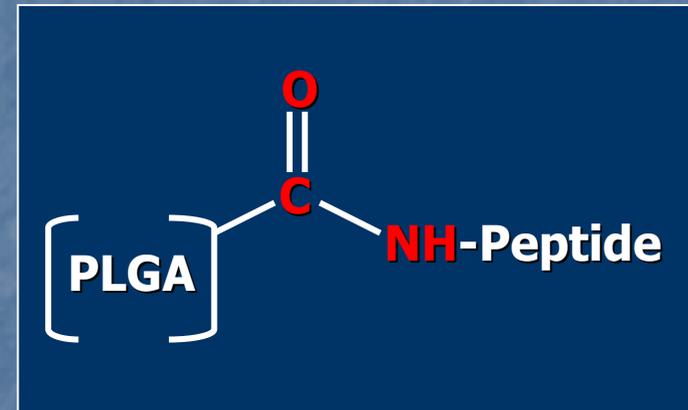
*R. Polt, M.M. Palian Glycopeptide analgesics, Drugs Fut. 26 (6) (2001) 561-576.

Modificazione del polimero

- Sintesi di analogo peptidico* (H_2N -Gly-Phe-D-Thr-Gly-Phe-Leu-**X**-CONH₂)
- Sostituzione della molecole di **Tyr** con **Phe** per evitare l'effetto oppioide**
- Coniugazione col polimero (PLGA) tramite legame ammidico
- Caratterizzazione tramite NMR 200/400, Spettrometria di Massa

X

- Ser-OH
- Ser-O-β-D-glucose
- Ser-O-β-D-galactose
- Ser-O-β-D-xylose
- Ser-O-β-D-lactose



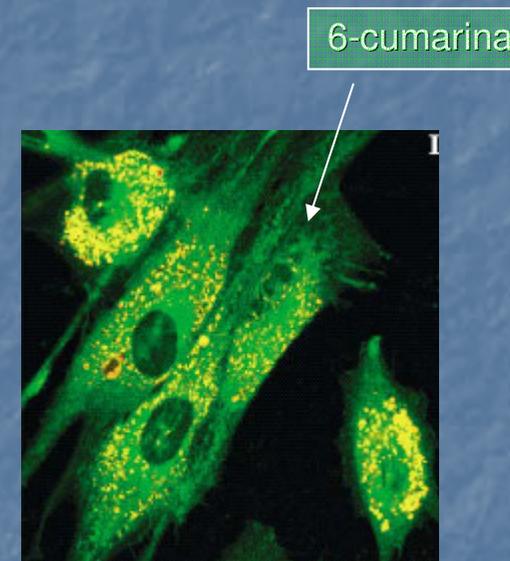
* Costantino L., Vandelli M.A., Forni F., Peptidi per la veicolazione di farmaci., Italian Patent n° MI2004A002353, 2004

** A. F. Casy, R.T. Parfitt, Opioid analgesics. Chemistry and receptors, Plenum, New York, 1986, pp. 342-353.

- Studi in vivo
- Determinazione posizione delle Np

Approcci di letteratura **Superamento BEE**

1. Farmaci radiomarcanti (^3H)
incapsulati in
nanoparticelle
2. Farmaci fluorescenti
incapsulati in
nanoparticelle (6-
cumarina¹, fluorescenza
verde)
3. Polimero radiomarcato
(^{14}C)



¹Panyam J, et al. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake. Int J Phar 2003;262:1-11

Limiti

- Sperimentazioni *in vitro* su colture cellulari
- Utilizzo di sostanze radioattive
- Valutazione quantitativa della radioattività in omogenati di tessuti (microcircolazione e parenchima) dopo sperimentazioni *in vivo*



Nessuna informazione sulla **POSIZIONE** delle nanoparticelle nei tessuti *in vivo*

- **Modificazione del PLGA**

Fluoresceina

Rodamina

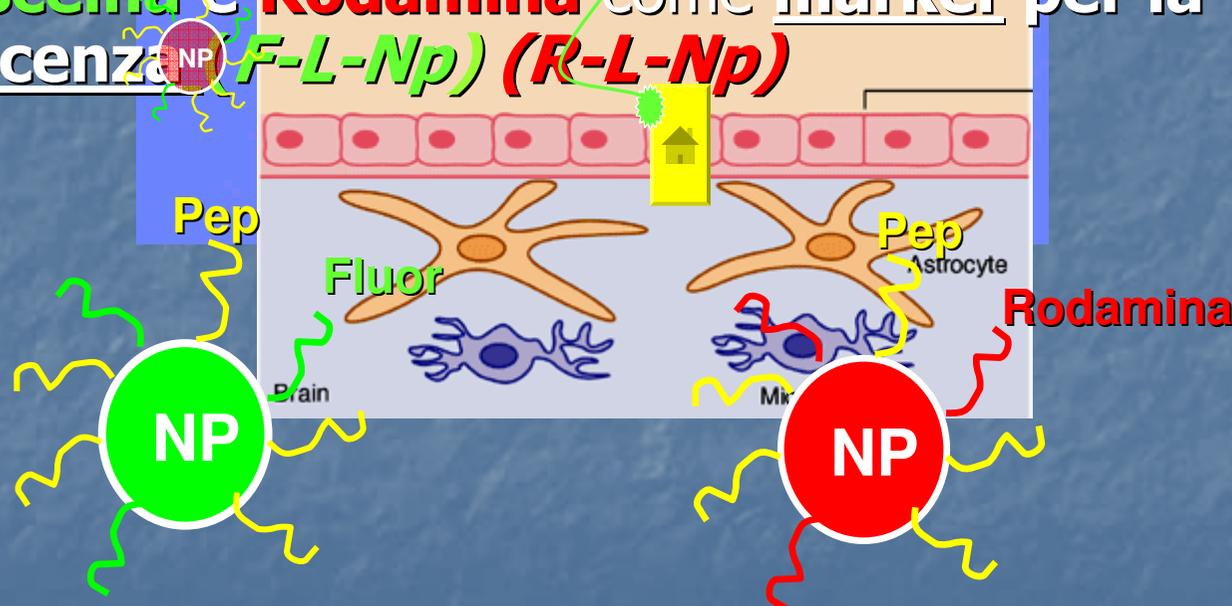
- **Utilizzo della microscopia a fluorescenza**

Np costituite da PLGA modificato con Fluoresceina (F-Np)

Np costituite da PLGA modificato con Rodamina (R-Np)

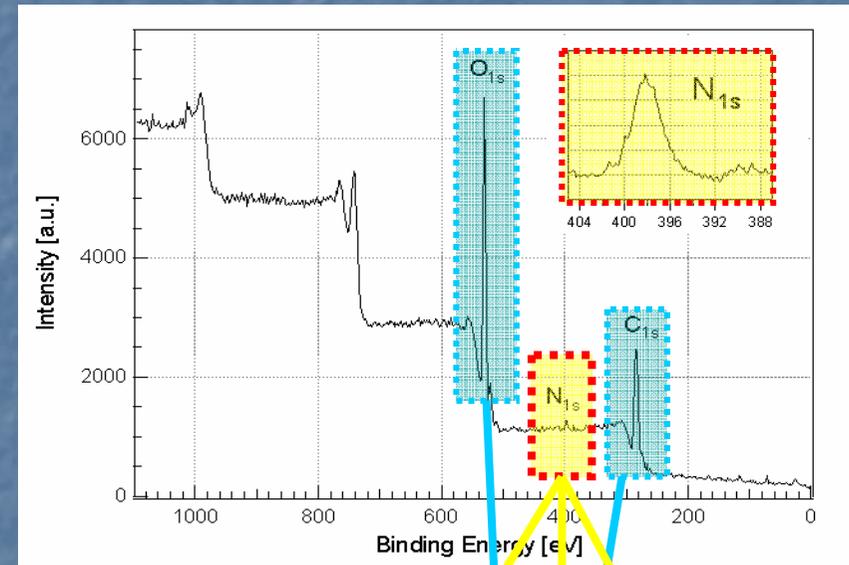
Preparazione delle Np

- Sequenza *glicopeptidica*, molecola direzionante verso la BEE (P-PLGA)
- PLGA modificato con marker fluorescenti **F-PLGA** **R-PLGA**
- Np costituite da 80% P-PLGA e da 20% F-PLGA o R-PLGA
- Np con una molecola **ligando-specifica per BEE** e con **Fluoresceina e Rodamina** come marker per la fluorescenza (**F-L-Np**) (**R-L-Np**)



Caratterizzazione della superficie delle Np modificate

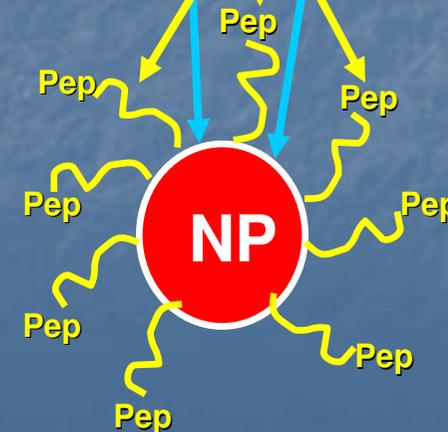
- *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA)* per valutare la posizione dei peptidi sulla superficie delle Np



Presenza dell'Azoto sulla superficie delle Np

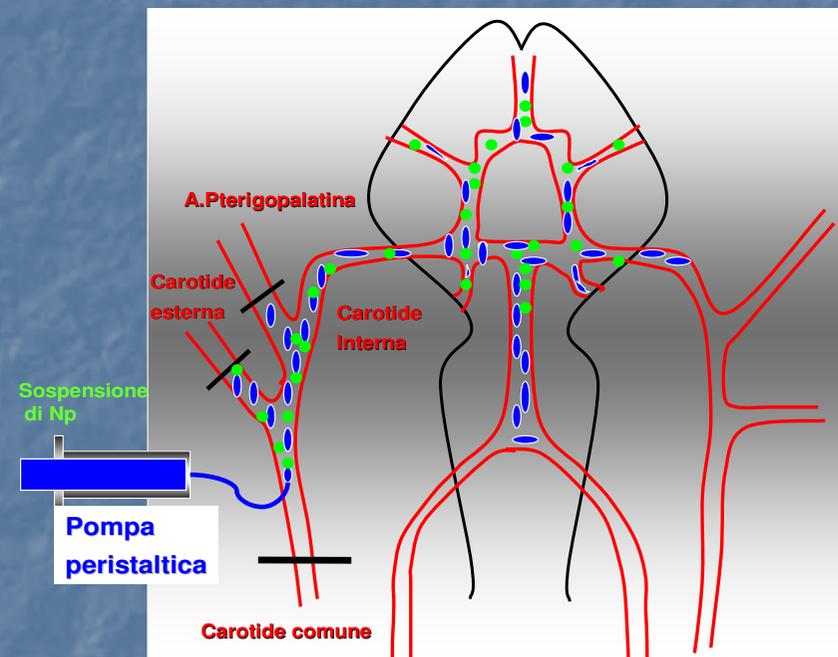


Dislocazione del Peptide verso l'esterno della NP



Sperimentazione in vivo

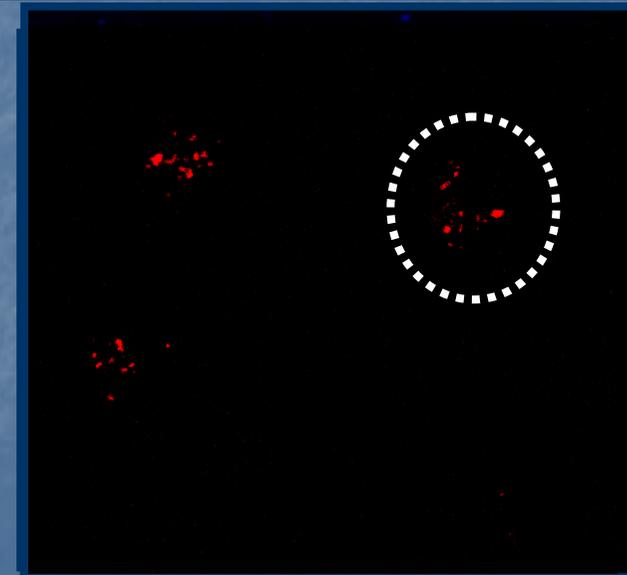
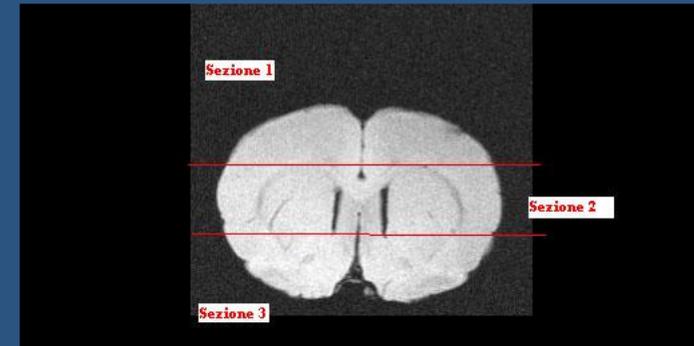
- **Perfusione cerebrale (*In situ brain perfusion technique*)**
- **Infusione in vena femorale.**
- **Ratti maschi Wistar Hannover (n° 50), 300 g.**



Fluorescenza

- **Trattamento degli organi (cervello, fegato, reni, milza): azoto liquido**
- **Cervello suddiviso in tre aree: anteriore, mediana, posteriore**
- **Taglio con criotomo di campioni di 5 μm**
- **DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindolo)***
- **Interazione con le catene del DNA e colorazione Blu dei complessi**
- **Microscopio a fluorescenza con filtro FITC, TRITC e DAPI**
- **Trattamento con Ematossilina eosina per struttura morfologica**

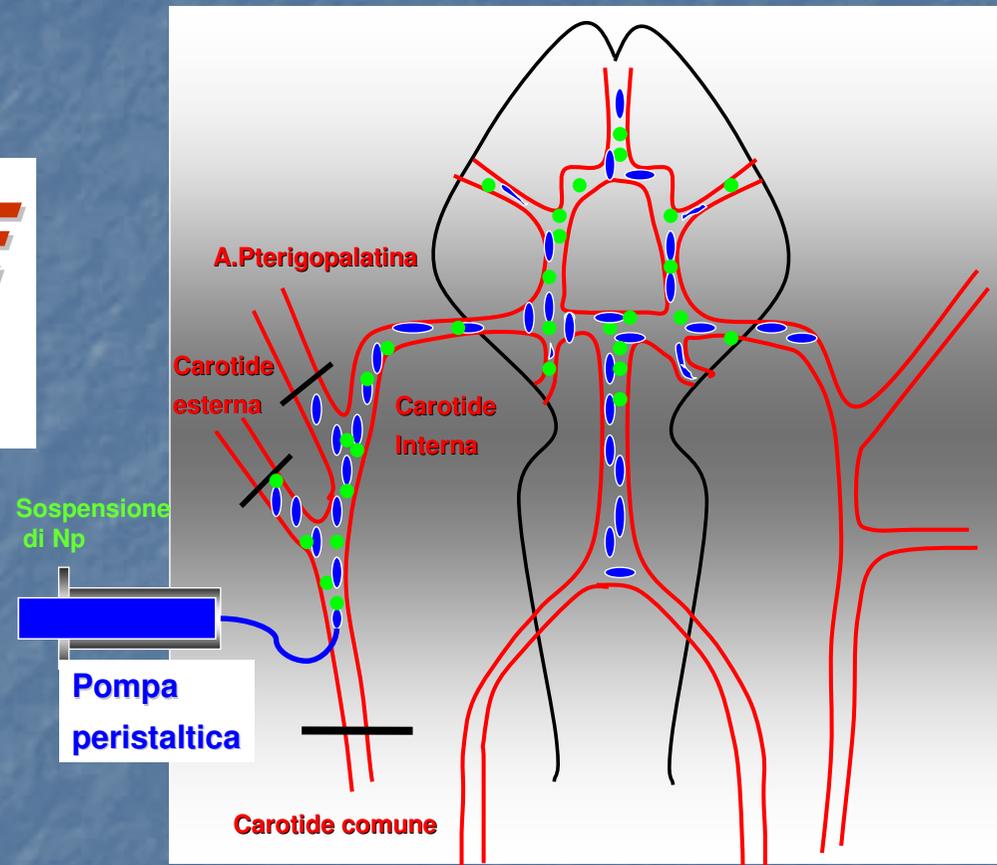
SUDDIVISIONE DELL'ENCEFALO DEL RATTO



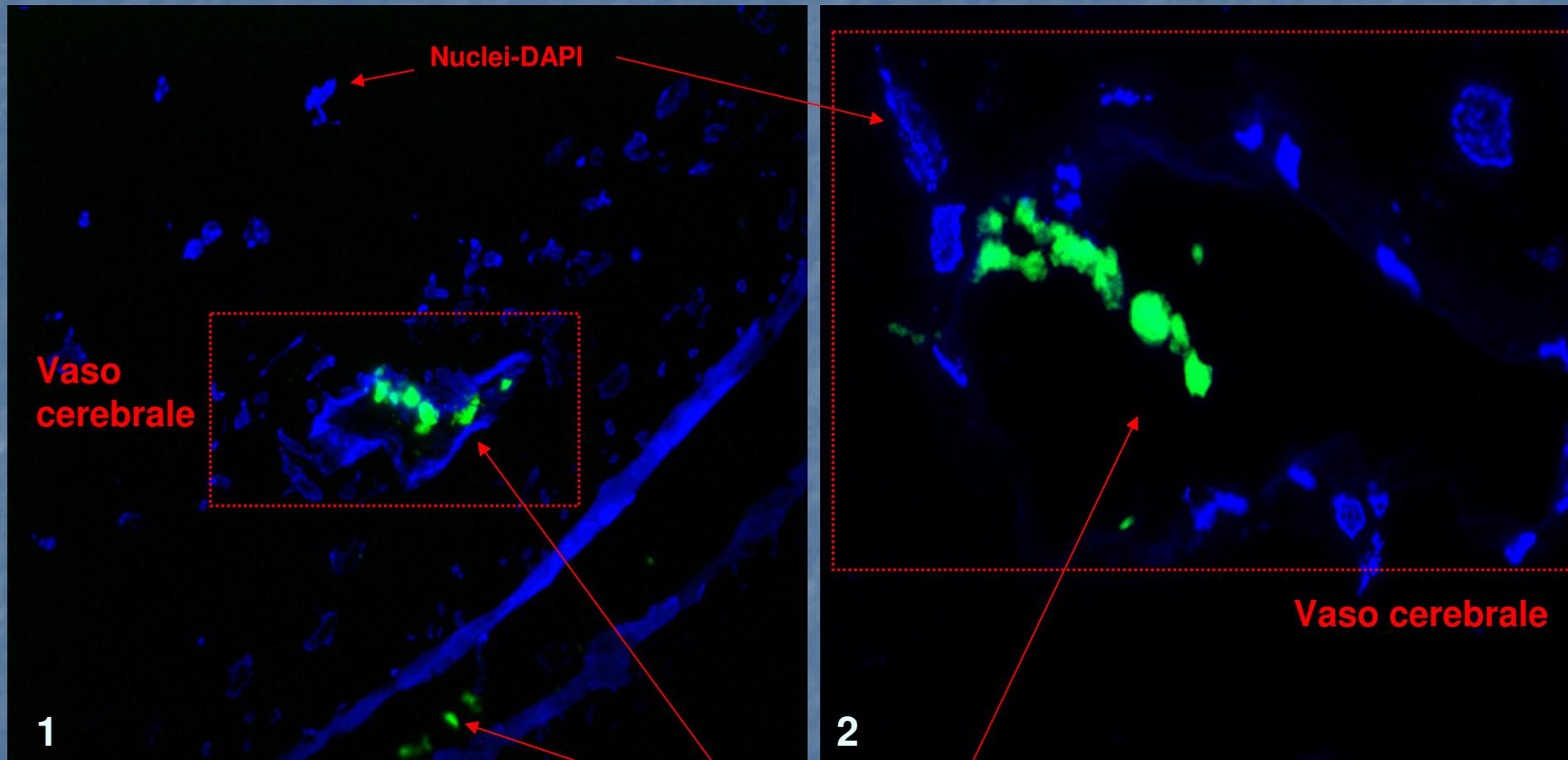
COLORAZIONE CON EMATOSSILINA EOSINA PER MORFOLOGIA
DAPI-Nuclei

*Xu Z, et al. Modulation of nucleic acid structure by ligand binding: induction of a DNA·RNA·DNA hybrid triplex by DAPI intercalation. Bioorg & Med Chem 1997;5(6):1137-1147.

PERFUSIONE CEREBRALE



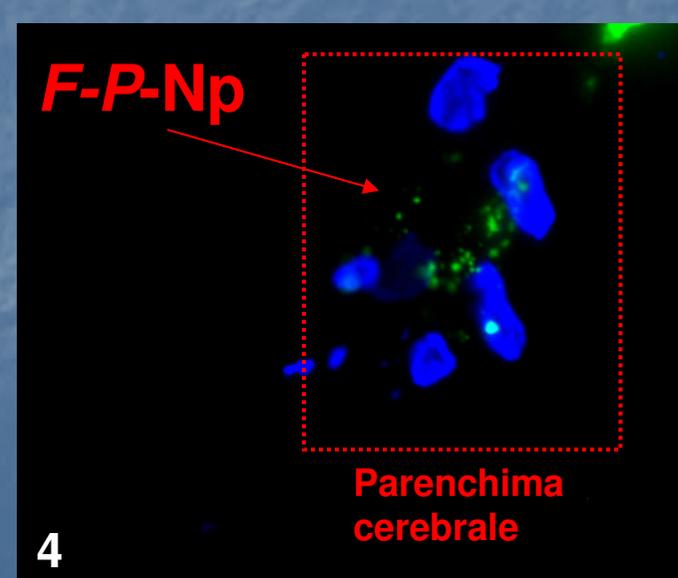
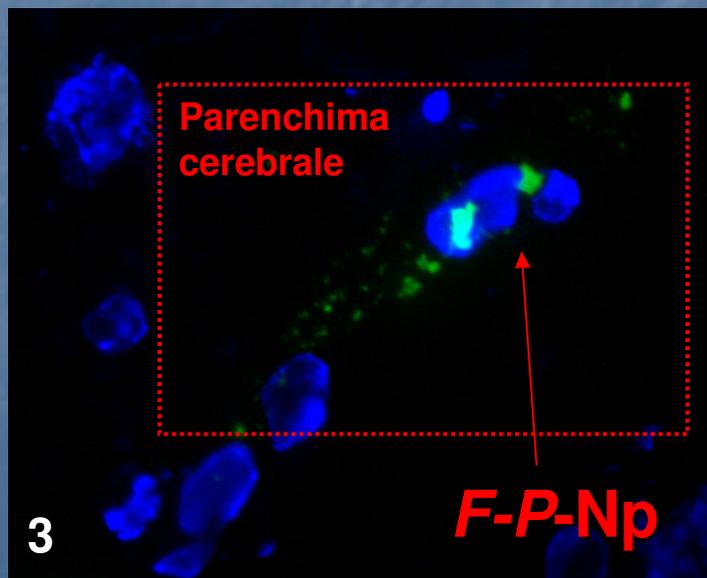
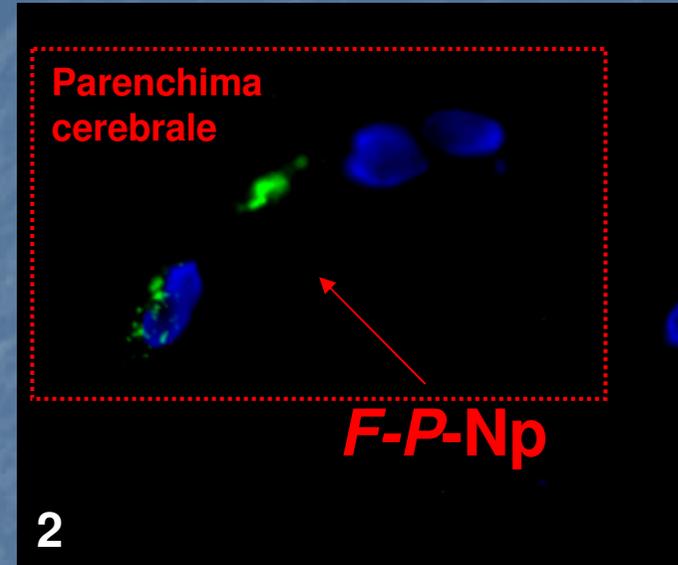
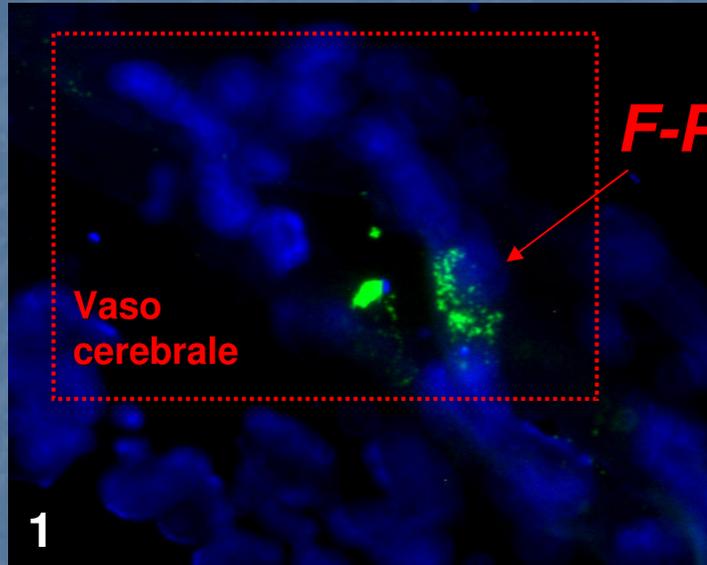
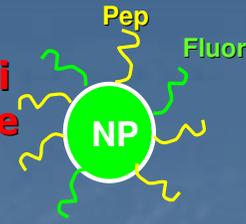
Perfusione **cerebrale** di Np fluorescenti NON modificate (100% F-PLGA)



- Localizzazione nei vasi cerebrali
- Integrità della BEE

Perfusione cerebrale di Np fluorescenti modificate (F-P-Np)

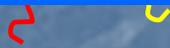
Localizzazione alla parete dei vasi
Localizzazione cellulare delle nanoparticelle



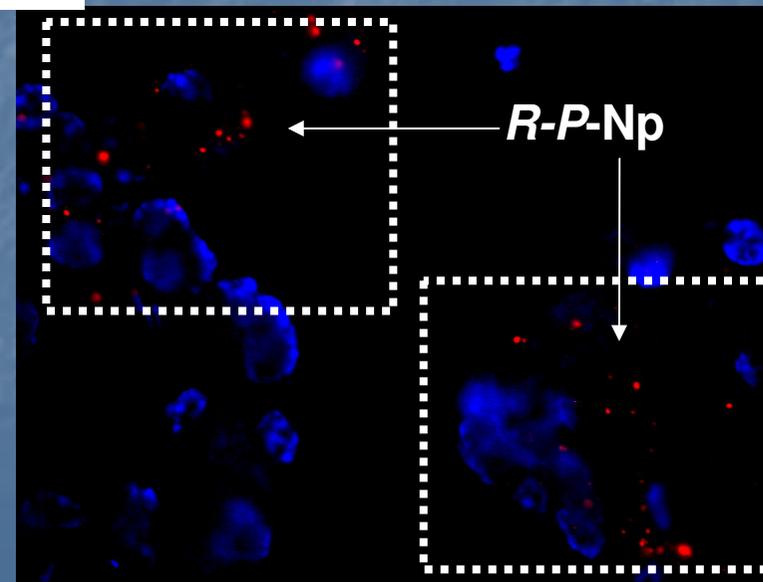
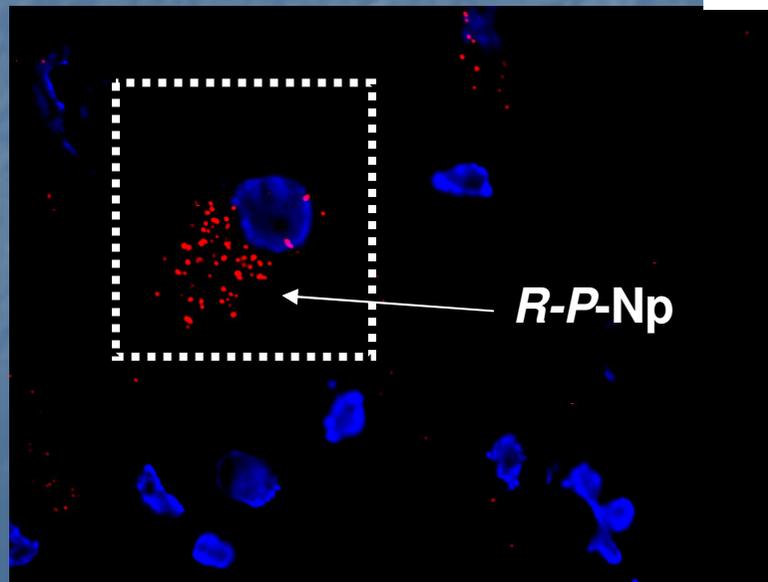
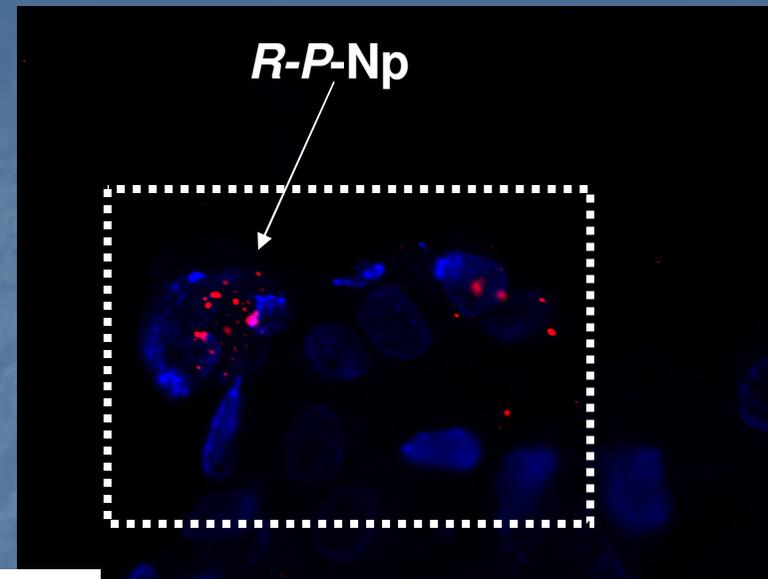
Perfusione **cerebrale** di Np fluorescenti modificate (**R-P-Np**)

- Np superano BEE in virtù della presenza della modificazione sul polimero

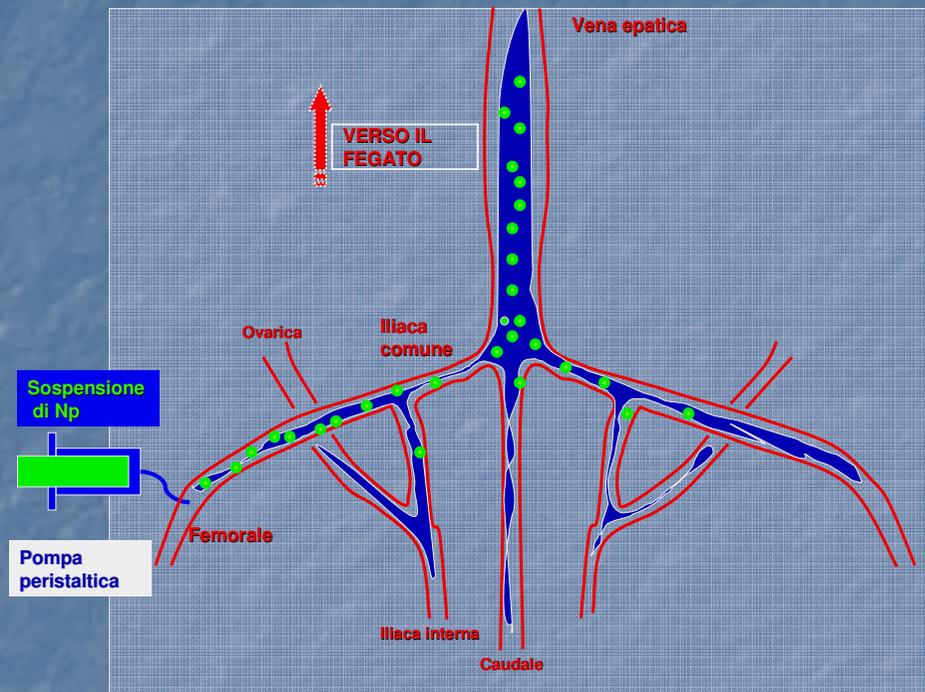
Pep



**Parenchima
cerebrale**

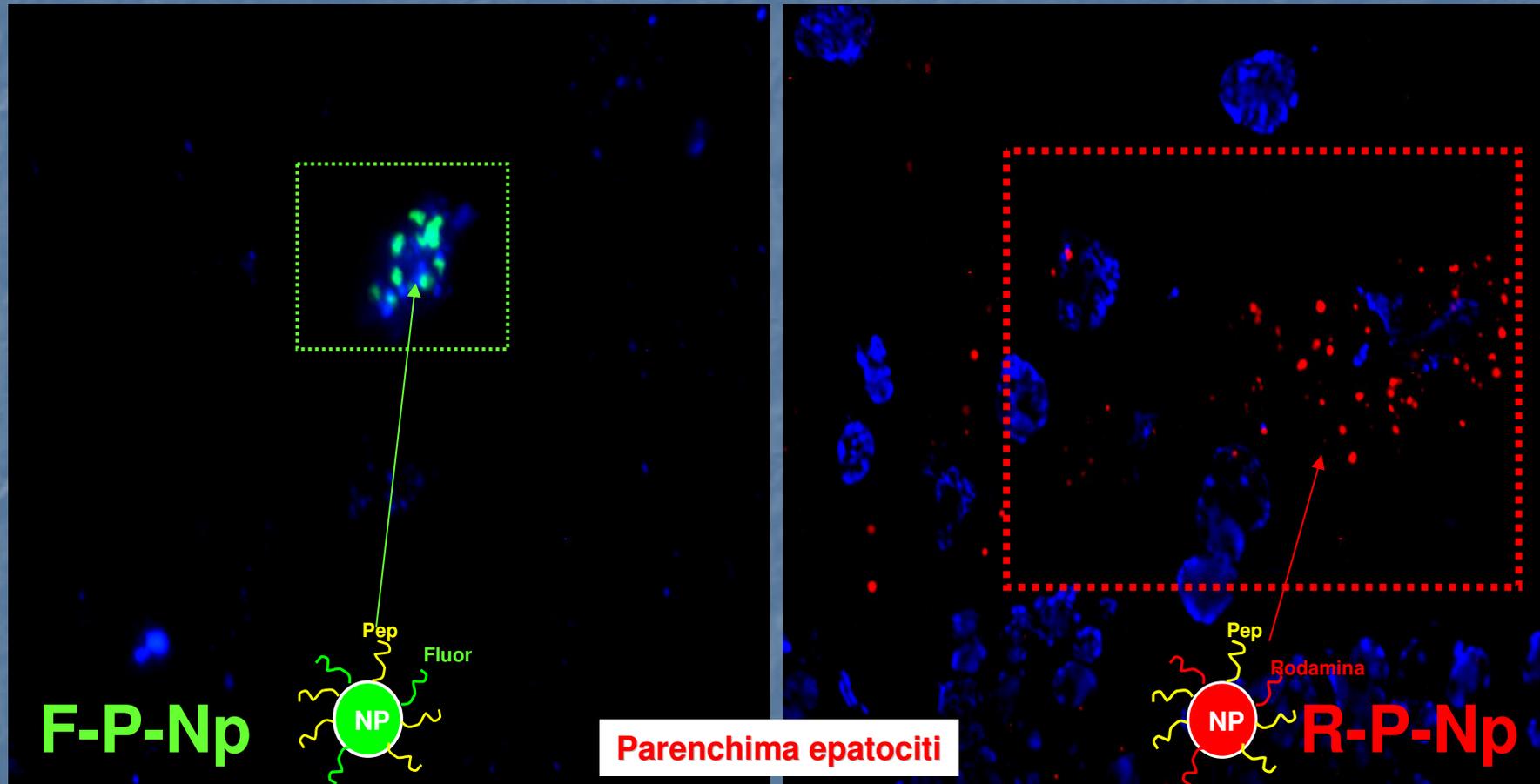


PERFUSIONE FEMORALE



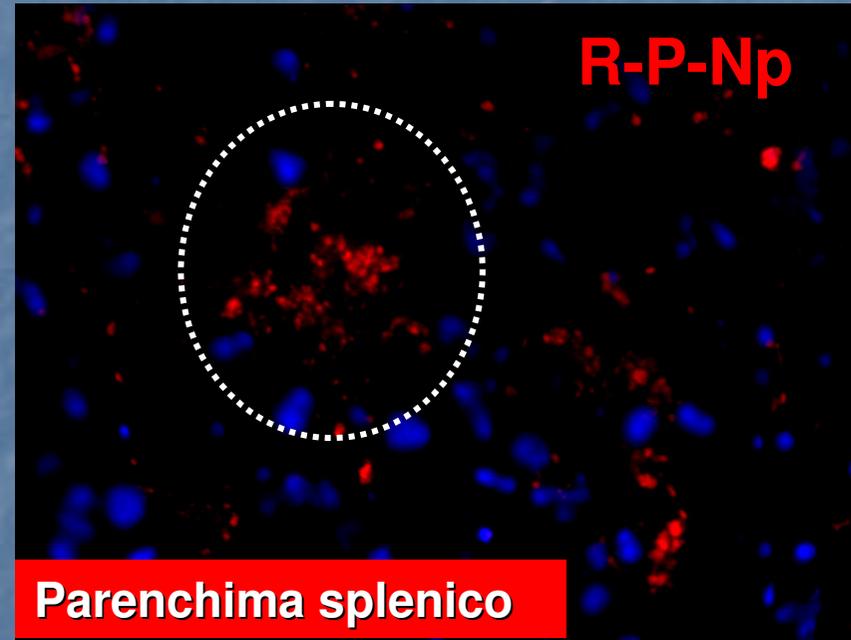
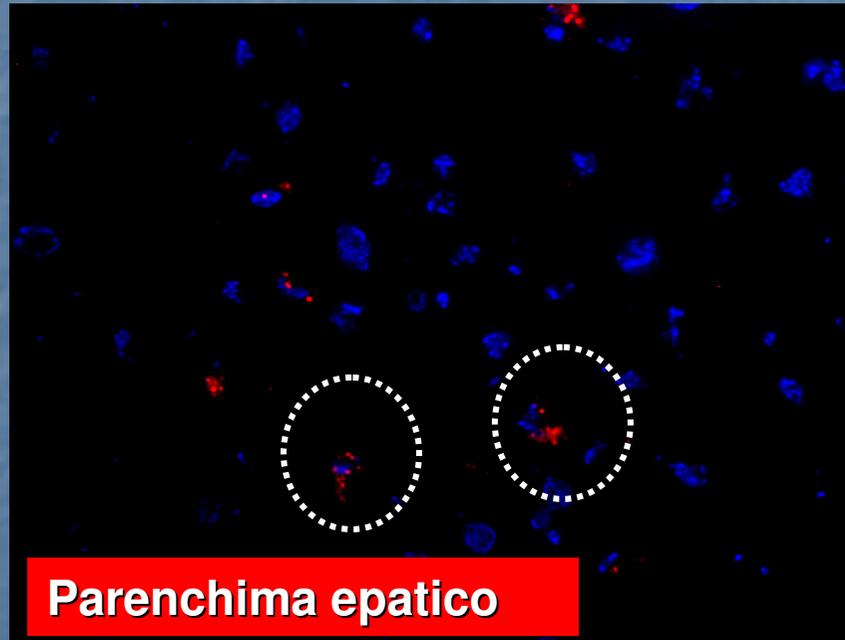
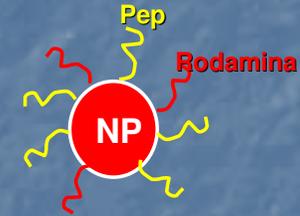
Perfusione femorale di
F-P-Np e R-P-Np

Tempo: 0-30 minuti



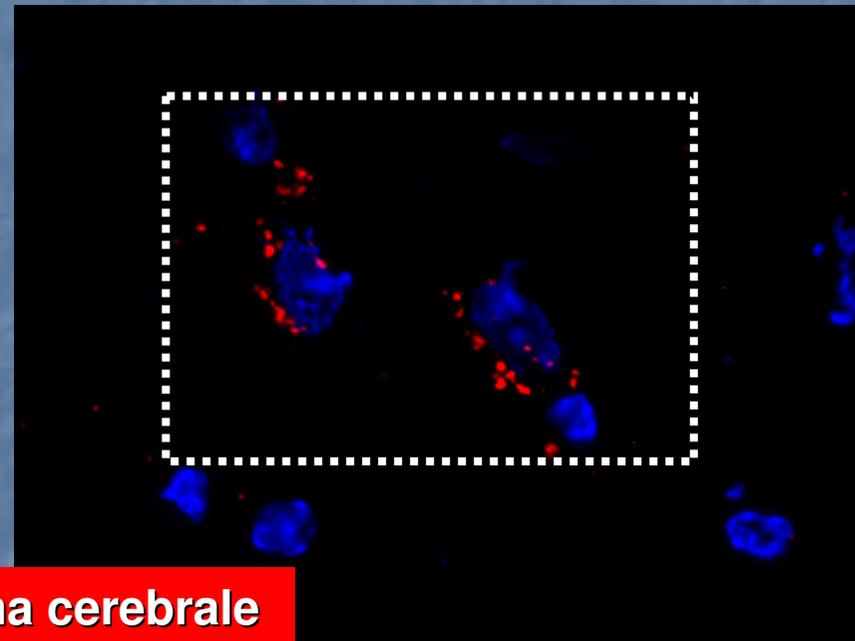
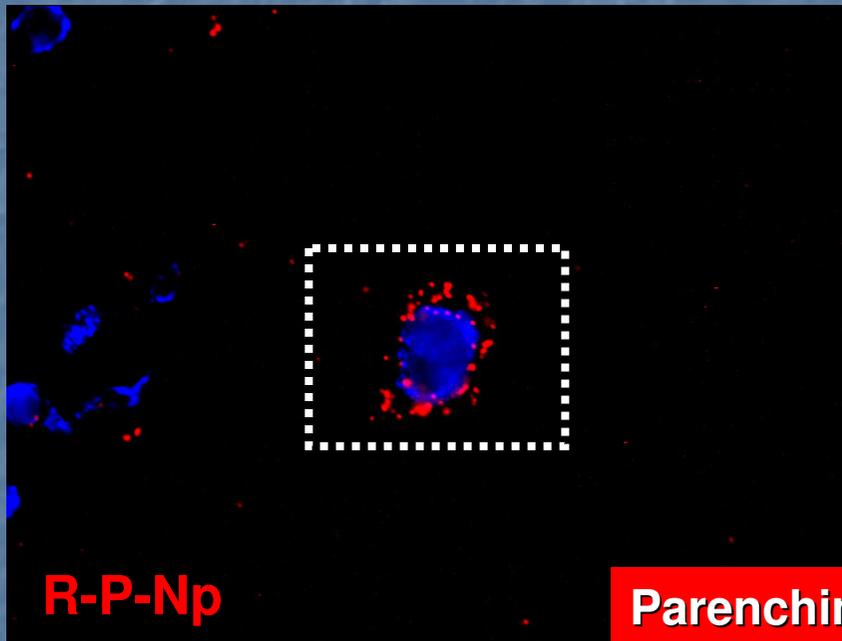
Perfusione **femorale** di Np fluorescenti modificate (*R-P-Np*)

Tempo 60-120 minuti



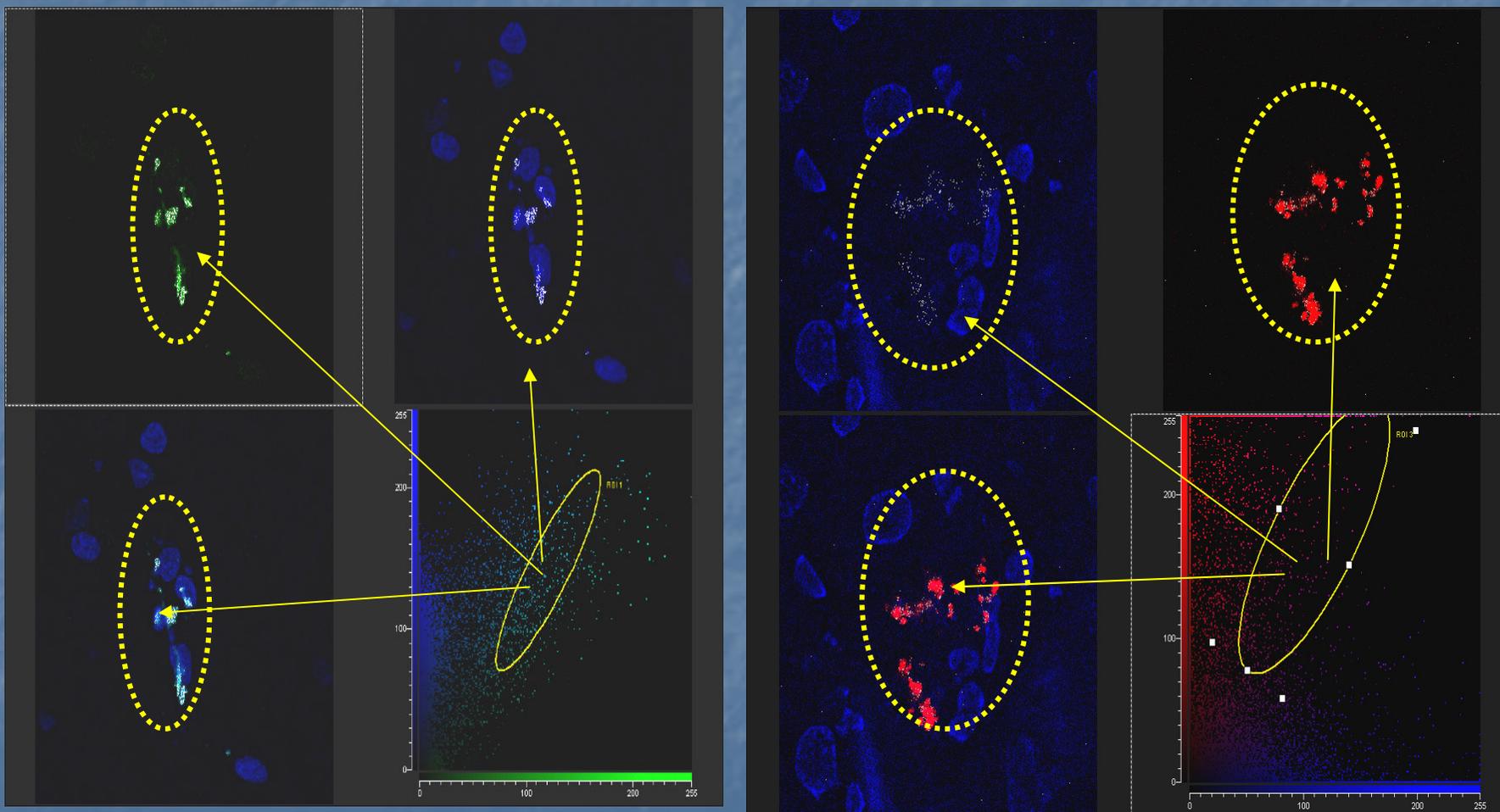
Perfusione **femorale** di Np fluorescenti modificate (*R-P-Np*)

Tempo 60-120 minuti

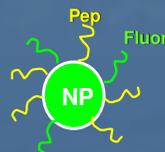


- **By pass del uptake epatico**
- **Selettività verso BEE**
- **Superamento della BEE**

- Singolo piano nello spessore del campione
- Np e Cellule Cerebrali sono co-localizzate e in stretto contatto



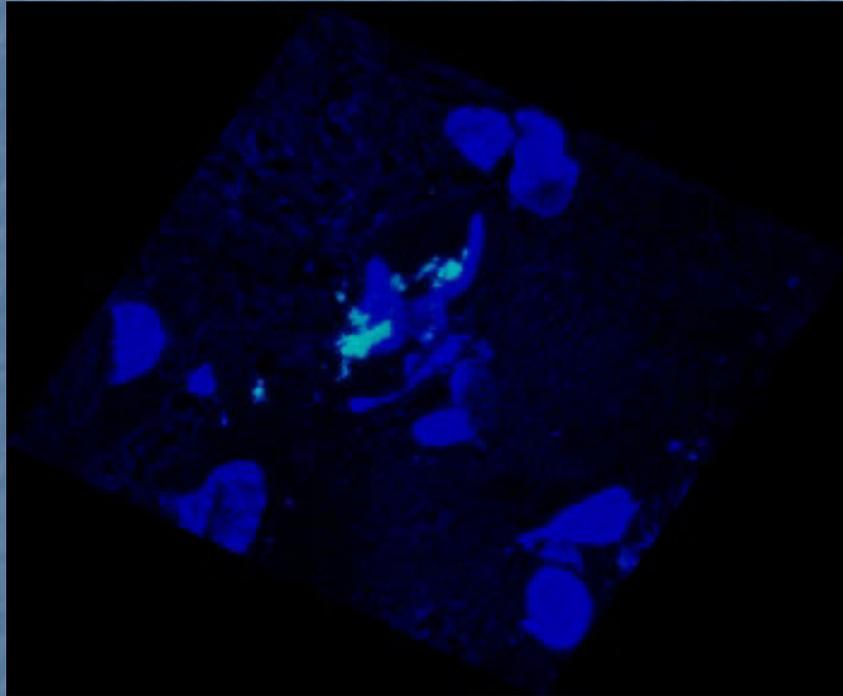
F-P-Np



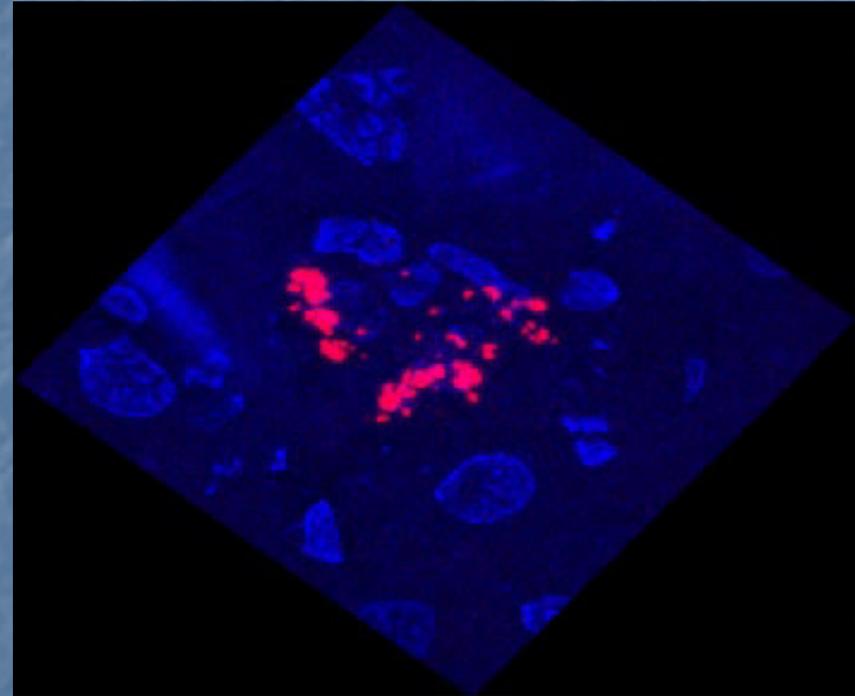
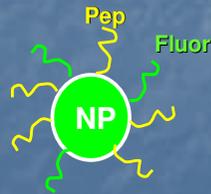
R-P-Np



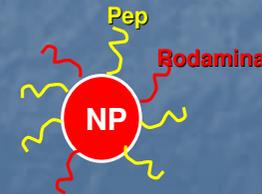
Microscopio confocale: Ricostruzione Tridimensionale Np e parenchima cerebrale



F-P-Np



R-P-Np



Conclusioni

- Sintesi di un **nuovo eptapeptide** simil-oppioide come **molecola ligando specifica** per il superamento della barriera ematoencefalica
- Coniugazione **PLGA** con **peptide** e marker **fluorescenti** (Fluoresceina e Rodamina)
- Test ***in vivo*** di perfusione cerebrale e femorale
- Studi di microscopia a **fluorescenza** e **confocale**

Conclusioni

■ *Perfusione Cerebrale*

- **Internalizzazione** delle Np modificate col ligando specifico (*F-P-Np* e *R-P-Np*)
- Evidenza di una **extravasazione** delle Np **modificate** rispetto alle analoghe **non modificate** la cui localizzazione è limitata ai vasi
- **Ipotizzabile passaggio della BEE** in conseguenza della modificazione della Np

■ *Perfusione Femorale*

- **Np modificate** bypassano **uptake epatico** per localizzarsi a **livello cerebrale**

Si ringrazia:

- ✓ **Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti (CIGS) dell'Università di Modena e Reggio Emilia**
- ✓ **Dipartimento integrato Servizi Diagnostici e di Laboratorio e di Medicina Legale, Sezione di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia**
- ✓ **Fondazione Cassa di Risparmio di Modena e Reggio Emilia**