

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901896191A1

Publication Date

20120603

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI MAGNA GRAECIA DI CATANZARO

Title

NANOVETTORE CONIUGATO CON TSH PER IL TRATTAMENTO DEL
CANCRO DELLA TIROIDE

Descrizione dell'invenzione avente per titolo: "Nanovettore coniugato con TSH per il trattamento del cancro della tiroide"

A nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI MAGNA GRAECIA DI CATANZARO

Di nazionalità italiana

5 **Con domicilio in: Campus Universitario "Salvatore Venuta", Viale Europa - Località Germaneto - CATANZARO (CZ)**

Inventori: Massimo FRESTA

Diego RUSSO

Donatella PAOLINO

10 **Donato COSCO**

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda il settore farmaceutico, in particolare per somministrazione di farmaci specifici, più in particolare per la somministrazione specifica di farmaci alla tiroide, più in particolare per il trattamento del cancro della tiroide.

15 La presente invenzione fornisce un coniugato nanocarrier (nanovettore)-TSH come sistema di somministrazione di farmaci direzionato contro le cellule di cancro alla tiroide che esprimono il recettore per il TSH (TSHR).

Stato dell'arte dell'invenzione

I carcinomi tiroidei rappresentano circa l'1,5% delle neoplasie maligne e sono il tumore endocrino più frequente. La mortalità è stimata approssimativamente tra l'8 e il 10%, ma può essere più alta se si considerano delle sottoclassi di tumori più aggressivi (Schlumberger M, N. Engl. J. Med. 338: 297-306 (1998)). Il più importante fattore prognostico è rappresentato dalla capacità del tumore, primitivo o metastatico, di captare lo ioduro. Questa proprietà permette l'uso della scintigrafia con Iodio131 di identificare recidive o metastasi e di trattarle con successo (Schlumberger M, Lacroix L, Russo D, et al. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 3:260-269 (2007)). Diversi studi hanno dimostrato che la maggioranza dei tumori tiroidei presenta una riduzione o perdita dell'espressione del cotrasportatore di sodio e ioduro, responsabile della ridotta captazione di radioiodio e della cattiva prognosi in questi pazienti (Schlumberger M, Lacroix L, Russo D, et al, Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 3:260-269 (2007); Filetti S, Bidart JM, Arturi F et al, Eur. J. Endocrinol. 141, 443 (1999)). Viceversa, l'espressione di altri marcatori di differenziazione tiroide-specifici, in particolare il recettore

del TSH è di solito conservata anche se a bassi livelli (Brabant G, Maenhaut C, Kohrle J et al, Mol. Cell. Endocrinol. 82, R7-R12 (1991); Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H et al, Eur. J. Endocrinol. 142, 340-346 (2000); Lazar V et al, J. Clin. Endocrinol. Metab. 84, 3228-3234 (1999); Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, et al, J. Clin. Endocrinol. Metab. 92, 2840-2843, 5 (2007)). L'approccio terapeutico per quei tumori tiroidei non trattabili con radioiodio rappresenta un problema ancora oggi non risolto. Infatti, l'uso di farmaci antitumorali capaci di distruggere le cellule tumorali in vitro o in modelli sperimentali di animali in vivo è fortemente limitato da effetti tossici dose-dipendenti (Ain KB, Egorin MJ, DeSimone PA, Thyroid 10, 587 (2000)). Diversi studi sono in corso per identificare nuovi farmaci attivi 10 contro bersagli molecolari espressi nelle cellule tumorali tiroidee (es. inibitori di Tyr-kinasi), ma anche tali nuovi farmaci 'mirati', quando somministrati 'in vivo', presentano importanti effetti (Woyach JA, Shah MH, Endocr. Rel. Cancer 16, 715-731 (2009)).

L'approccio terapeutico per tali tumori rappresenta un problema ancora oggi non risolto. Infatti, l'uso di farmaci antitumorali capaci di distruggere le cellule tumorali *in vitro* o in 15 modelli sperimentali di animali in vivo è fortemente limitato da effetti tossici dose-dipendenti (Ain KB, Egorin MJ, DeSimone PA, Thyroid 10, 587 (2000)). Diversi studi sono in corso per identificare nuovi farmaci attivi contro bersagli molecolari espressi nelle cellule tumorali tiroidee (es. inibitori di Tirosina-kinasi), ma anche tali nuovi farmaci 'mirati', quando somministrati *in vivo*, presentano importanti effetti collaterali (Woyach JA, Shah MH, 20 Endocr. Rel. Cancer 16, 715-731 (2009)).

Una strategia terapeutica complementare promettente attualmente studiata nella ricerca sul cancro è il tentativo di migliorare il trasporto del farmaco all'interno della cellula tumorale. Un incremento dell'ingresso intracellulare potrebbe permettere una riduzione della dose totale del farmaco e riduzione dell'esposizione dell'intero organismo al farmaco. Inoltre, 25 un'ulteriore riduzione della tossicità di un antitumorale è raggiungibile attraverso la veicolazione mirata del farmaco verso le cellule neoplastiche, ottenibile utilizzando un anticorpo diretto specificamente contro un antigene espresso sulla superficie del tumore.

Negli ultimi anni sono stati studiati e preparati dei 'drug delivery system' capaci di ridurre il volume di distribuzione degli agenti antitumorali e di assicurare una distribuzione selettiva del 30 principio attivo con una concentrazione minima nei siti che non sono attivi.

Tra i vari sistemi di trasporto dei farmaci, i liposomi sembrano essere i più promettenti come potenziali carrier biologici di farmaci antitumorali (Grant S, Dent P, Clin. Cancer Res. 16,

2305 (2004)). Il carrier liposomiale rappresenta un sistema di trasporto per molecole biologicamente attive noto e molto versatile. Inoltre, i sistemi liposomiali caricati con un farmaco antitumorale possono conferire un targeting di tipo attivo verso le cellule tumorali, mediante la coniugazione del carrier colloidale con un certo anticorpo, in modo da formare il
5 cosiddetto ‘immunoliposoma’ (Breitenlechner BC, et al, J. Mol. Biol. 353, 222 (2005)).

E’ ben noto che l’espressione del recettore del TSH è mantenuta nella maggioranza dei carcinomi differenziati della tiroide così come la possibilità di aumentare la sua espressione anche nei tumori meno differenziati, come dimostrato da sperimentazioni ‘in vitro’ (Wolber G., Langer T J, Chem. Inf. Model 45, 160 (2005); Aiello A, Pandini G, Frasca F et al,
10 Endocrinology 147, 4463 (2006)).

E’ stato anche dimostrato che l’incapsulamento della gemcitabina in liposomi aumenta l’azione antiproliferativa di questo farmaco, grazie ad un migliore trasporto all’interno delle cellule tumorali, determinando un effetto citotossico anche a dosaggi più bassi, a bassa tossicità (Celano M, Calvagno MG, Bulotta S et al, BMC Cancer 4, 63 (2004); Vono M, et al
15 TODDJ (2010)). Tale incremento dell’efficienza di trasporto è stato ulteriormente confermato anche in modelli sperimentali *in vivo* (Celia C, Calvagno MG, Paolino D et al, J. Nanosci. Nanotechnol. 8, 2102-2113 (2008); Celano M, Schenone S, Cosco D, et al, Endocr. Rel. Cancer 15, 499-510 (2008)).

US2009/0186364, della Mie University, descrive dei proteoliposomi ricombinanti preparati
20 mediante fusione di particelle virali di un baculovirus ricombinante che esprime un recettore di membrana come bersaglio, quale potrebbe essere il recettore del TSH, con liposomi. Questi proteoliposomi hanno migliorato la capacità di legame a un autoanticorpo e sono usati in kit diagnostici, come per esempio nel morbo di Graves.

Comunque, un efficace sistema per indirizzare farmaci a cellule che esprimono il recettore del
25 TSH non è ancora disponibile.

Riassunto dell’invenzione

È stato ora trovato che un sistema liposomiale comprendente un componente PEG-PDP-TSH risolve il problema tecnico di veicolare in modo specifico ed efficiente una grande varietà di farmaci all’interno delle cellule che esprimono il recettore del TSH. A tal fine, la presente
30 invenzione fornisce un coniugato TSH-nanocarrier.

Nel contesto della presente invenzione, vengono usate le seguenti sigle: polietilene glicole (PEG), (piridilditio) propinato (PDP) e ormone tireostimolante (TSH).

Un primo oggetto della presente invenzione è un sistema liposomiale (liposoma) comprendente un componente PEG-PDP-TSH.

Un secondo oggetto della presente invenzione è il summenzionato sistema liposomiale caricato con un farmaco in grado di arrivare a livello intracellulare delle cellule che esprimono il recettore TSH.

Un altro oggetto della presente invenzione è un procedimento per la preparazione dei liposomi di cui sopra.

Ancora un altro oggetto della presente invenzione è il summenzionato sistema liposomiale come sistema di veicolazione di farmaci.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è il summenzionato sistema liposomiale caricato con un farmaco in grado di arrivare a livello intracellulare delle cellule che esprimono il recettore TSH per utilizzo come medicamento.

L'invenzione presenta molti vantaggi rispetto allo stato dell'arte. Fra questi vantaggi, i liposomi della presente invenzione, consentono di veicolare un farmaco specificatamente alle cellule che esprimono recettori TSH in modo efficiente. Nella presente invenzione per "modo efficiente" si intende la consegna del farmaco ad un target specifico a dosaggi terapeuticamente efficaci e con una ridotta, o anche assenza, di effetti collaterali. Questo è anche inteso dagli esperti nel settore farmaceutico come un buon indice terapeutico.

Questi e altri oggetti della presente invenzione saranno descritti in dettaglio nelle successive sezioni anche per mezzo di Figure ed Esempi.

Nelle Figure:

Figura 1 mostra la citotossicità in vitro di gemcitabina, liposomi pegilatipegilati contenenti gemcitabina e TSH-liposomi pegilatipegilati contenenti gemcitabina su cellule CHO wild type (CHO-W) e cellule CHO trasfettate per il recettore del TSH (CHO-T) in funzione della concentrazione del farmaco e del tempo di esposizione. I dati sono espressi come percentuale di vitalità cellulare valutata mediante il test MTT. I risultati sono la media di sei diversi esperimenti $\pm$ deviazione standard. Le barre della deviazione standard, se non visibili, sono dentro i simboli.

Figura 2: mostra l'interazione in vitro tra TSH-liposomi pegilati radiomarcati con [3 H]CHE e TSH-liposomi pegilati con cellule CHO-W (pannello a) e CHO-T (pannello b) in funzione del tempo di incubazione in presenza o in assenza di TSH libero. Gli esperimenti sono stati

condotti a 37°C. Ogni barra rappresenta il valore medio di cinque diversi esperimenti $\pm$ deviazione standard.

Figura 3: mostra la cattura intracellulare dei liposomi pegilati contenenti gemcitabina (Lip) e dei TSH-liposomi pegilati all'interno di cellule CHO-W e CHO-T in funzione del tempo di esposizione. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C ad una concentrazione finale di farmaco 1 μ M. Ogni barra rappresenta la media dei valori risultanti da cinque differenti esperimenti $\pm$ deviazione standard.

Figura 4: mostra la biodistribuzione del TSH-liposomi unilamellari radiomarcati con [3 H]CHE e liposomi pegilati in ratti Wistar dopo 3 h dalla somministrazione. Ogni barra rappresenta il valore medio di cinque esperimenti $\pm$ deviazione standard.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione fornisce una formulazione liposomiale utile come vettore selettivo di farmaci per la veicolazione intracellulare in cellule che esprimono il recettore del TSH.

Il sistema liposomiale della presente invenzione è caratterizzato da una componente di PEG-PDP-TSH.

I liposomi della presente invenzione sono utili per la veicolazione di farmaci specifici per la tiroide.

Non c'è limite virtuale per il tipo di formulazione liposomiale per la messa in atto della presente invenzione. L'idonea formulazione liposomiale sarà progettata da persone di normale esperienza dello stato dell'arte, tenendo conto della natura e del tipo di farmaco da veicolare a livello delle cellule che esprimono recettore THS, in particolare le cellule tiroidee.

I liposomi sono vescicole chiuse delimitate da un doppio strato lipidico comprendente fosfolipidi e contenenti un ambiente acquoso interno. Il loro uso è noto da tempo come sistemi per la veicolazione di ingredienti attivi.

I liposomi sono classificati in vescicole multilamellari (MLV), in cui sono presenti diversi doppi strati lipidici concentrici e vescicole unilamellari (UV) contenenti un solo doppio strato lipidico. I liposomi UV sono classificati come piccole vescicole unilamellari (SUV) e grandi vescicole unilamellari (LUV). In questa invenzione sono utilizzate le SUV.

I fosfolipidi sono esteri dell'acido fosforico con lipidi. Tra gli altri, ci sono i glicerofosfolipidi e gli sfingolipidi. Esempi non limitativi di componenti adatti per la formulazione dei liposomi dell'invenzione in oggetto sono la fosfatidilcolina (PC), la fosfodietanolamina,

(PE), la fosfatidilserina (PS), il fosfatidilinositolo (PI); glicerofosfolipidi come il fosfatidilglicerolo, il difosfatidilglicerolo (cardiolipina), l'acido fosfatidico (PA), le sfingomieline, la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), la distearoilfosfatidilcolina (DSPC), la palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC), dioleil-
5 fosfatidiletanolamina (DOPE), dimiristoil-fosfatidiletanoammina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanoammina (DPPE), colesterolemisuccinato (CHEMS), colesterol-(3-imidazol-1-il-propil)carbammati (CHIM), dimetilottadecilammonio bromuro (DDAB), sale di (1,2-dioleossipropil)-N,N,N-trimetilammonio (DOTAP), dioleil-fosfatidilserina (DOPS), dioleil-fosfatidilglicerolo (DOPG), colesterolo solfato (Chol-SO₄), 4-(2-amminoetil)-morfolino-
10 colesterol-emisuccinato (MoChol), istaminil-colesterol-emisuccinato (HisChol), 1,2-dipalmitoil-glicerol-3-emisuccinato (DGSucc), 1,2-distearoil-glicerol-3-emisuccinato, 1,2-dimiristoil-glicerol-3-emisuccinato, 1,2-dioleil-glicerol-3-emisuccinato, palmitoil-oleil-glicerol-3-emisuccinato. Tali componenti possono essere utilizzati in qualsiasi combinazione disponibile agli esperti.

15 Componenti preferiti inclusi nella lista precedente sono: la 1,2-dipalmitoilfosfatidiletanolamina-sn-glicerol-3-fosfocolina monoidrato (DPPC), 1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DSPE).

Secondo la presente invenzione, il liposoma deve comprendere un componente di PEG-PDP-TSH.

20 Un componente essenziale preferito è 1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[PDP (metossipolioleneglicol-2000)] (DSPE-mPEG 2000-PDP).

I rapporti molari dei vari componenti dei liposomi sono determinati di volta in volta dall'esperto nella formulazione di liposomi.

25 Possono essere presenti nella formulazione altri componenti, come i lipidi di supporto o altri ingredienti convenzionali. Il colesterolo (Chol) è un lipide di supporto preferito.

Una prima realizzazione preferita della presente invenzione è il liposoma DPPC/Chol/DSPE-mPEG2000/DSPE-mPEG2000-PDP (rapporto molare 6:3:0,6:0,4), coniugato con TSH. Detto liposoma è un ulteriore oggetto della presente invenzione.

30 Un altro oggetto della presente invenzione è il processo per la preparazione dei suddetti liposomi.

Il processo è condotto secondo le conoscenze generali in questo campo.

Una miscela di componenti lipidici è disciolta in un solvente adatto. In generale, il solvente è un solvento organico lipofilo, per esempio un idrocarburo alogenato, come il diclorometano o il cloroformio. Per comodità, la dissoluzione della miscela lipidica può essere effettuata in una miscela di solventi organici, per esempio una miscela cloroformio/metanolo. Un sistema
5 solvente preferito è cloroformio/metanolo 3:1 v/v.

La soluzione lipidica è successivamente trattata per favorire la formazione di un film lipidico. Qualsiasi tecnica per la formazione di film lipidico può essere utilizzata. L'evaporazione sotto vuoto del solvente è un metodo conveniente, per esempio, per mezzo di un evaporatore rotante sotto vuoto o altri mezzi equivalenti.

10 Il film lipidico è successivamente trattato secondo le tecniche tradizionali per la preparazione dei liposomi. Ad esempio, il film lipidico, è ripreso in un mezzo idoneo, (es. soluzione fisiologica) ed ulteriormente trattato per formare un MLV. Un modo per ottenere gli MLV consiste nel riscaldare al vortex ripetutamente. Ad esempio può essere utilizzato un certo numero di cicli, ad esempio 3 (in genere di 3 min) di riscaldamento (circa 58 °C) e vortex
15 (tipicamente 700 giri/ in).

Secondo la presente invenzione, la riduzione dei ponti disolfuro può essere effettuata per mezzo di un idonea reazione chimica. Una forma di realizzazione della presente invenzione può essere condotta facendo incubare con un ditiotreitolo (DTT). Una concentrazione appropriata di DTT (per esempio una soluzione 50 mM di DTT, rispettivamente 1:2 v/v) è
20 utilizzata per l'incubazione. Un tempo di incubazione tipico è di 30 min.

Il liposoma è quindi separato dal mezzo di incubazione. Una tecnica di separazione conveniente è la centrifugazione (ad esempio 20.000 g per 60 minuti a 4 °C), ma qualsiasi altra tecnica conosciuta, che non alteri l'integrità delle vescicole può essere utilizzata.

I liposomi privi di qualsiasi eccesso di agente riducente dei ponti disolfuro sono
25 successivamente risospesi in un mezzo adatto.

In una realizzazione preferita della presente invenzione, i liposomi vengono risospesi in una soluzione di ammonio solfato, tipicamente alla concentrazione di 250 mM.

La sospensione viene poi sottoposta a un alternanza (solitamente dieci) di cicli di congelamento (per esempio con azoto liquido) e di scongelamento (per esempio con un bagno
30 d'acqua a 40 °C), ottenendo così un gradiente di pH con un ambiente acido omogeneo nei compartimenti acquosi intraliposomiali.

Le vescicole multilamellari sono poi sottoposte ad un processo per l'ottenimento di piccole vescicole unilamellari. Le piccole vescicole colloidali unilamellari sono ottenute con tecniche convenzionali, ed è essenziale che vescicole unilamellari abbiano un diametro inferiore a 1 micron.

- 5 Preferibilmente, le vescicole unilamellari piccole hanno un diametro inferiore a 500 nm, più preferibilmente inferiore a 400 nm, ancora più preferibilmente inferiore a 200 nm, e ancor più preferibilmente inferiore a 150 nm, e massimamente preferito è un diametro inferiore a 100 nm. La somministrazione sistemica, in particolare la via endovenosa, di una somministrazione liposomiale necessita che la dimensione media delle vescicole colloidale sia ≤ 150 nm, al fine
- 10 di ridurre l'assorbimento da parte dei macrofagi del sistema del reticolo endoteliale, permettendo le vescicole di rimanere più a lungo nel torrente circolatorio e di arrivare in dosi massicce agli organi bersaglio. La realizzazione massimamente preferita della presente invenzione utilizza liposomi di dimensioni nanometriche (nanoliposomi), tipicamente inferiori a 100 nm.
- 15 La dimensione media e la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle può essere determinata con adeguate strumentazioni. Ad esempio, la dimensione idrodinamica può essere misurata con tecniche di dispersione (scattering) di luce, un esempio disponibile in commercio è il Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Regno Unito), uno spettrofotometro a scattering dinamico di luce, che applica una funzione di
- 20 correlazione dei cumulanti del terzo ordine. Un diodo laser di 4,5 mW a 670 nm è stato utilizzato come fonte di luce per l'analisi dimensionale e i fotoni retro dispersi (backscattered) sono stati rilevati a 173° . Gli indici di rifrazione reale ed immaginario sono stati fissati a 1,59 e 0,0, rispettivamente. L'indice di rifrazione del mezzo (1,330), la viscosità del mezzo ($1,0 \text{ mPa} \times \text{s}$), e la costante dielettrica (80,4) sono stati fissati prima degli esperimenti. Le analisi
- 25 sono state condotte in cuvette di quarzo.

In genere, vescicole submicrometriche o preferibilmente nanometriche sono ottenute per estrusione mediante un convenzionale estrusore.

- La soluzione di solfato di ammonio libero viene rimossa, per esempio per centrifugazione. Altri metodi di preparazione dei liposomi sono ben noti in letteratura e l'invenzione non è
- 30 limita al processo precedentemente descritto. Qualsiasi processo noto può essere utilizzato. Esempi possono essere trovati in US2009/186364 e US2007/104775.

A questo punto, i liposomi della presente invenzione possono essere caricati con il farmaco di interesse e successivamente derivatizzati con TSH o viceversa.

Tecniche di incapsulazione del farmaco sono assolutamente convenzionali e non richiedono una particolare descrizione in questa sede.

- 5 La tecnica di incapsulazione dipende dal tipo e dalla natura del farmaco, e le istruzioni sono riportate in letteratura, vedi per esempio Crosasso P, Ceruti M., Brusa P et al, J. Control Release 63: 19-30(2000); Calvagno MG, Celia C, Paolino D et al, Curr. Drug Delivery, 4:89-101 (2007).

10 Uno stadio essenziale del processo secondo la presente invenzione è la coniugazione dei liposomi (eventualmente pre-caricato con il farmaco desiderato) con il TSH. Una semplice incubazione delle vescicole liposomiali con TSH è sufficiente. Ad esempio, l'incubazione per una notte per consentire al bioconiugazione con le catene di PDP ridotto è sufficiente. La temperatura di incubazione è generalmente la temperatura ambiente.

15 Come detto in precedenza, potenzialmente non vi è alcuna limitazione al tipo di farmaco che può essere veicolato a livello intracellulare di cellule che esprimono recettori TSH.

In una realizzazione preferita della presente invenzione, interessa utilizzare i liposomi per la veicolazione e il direccionamento di farmaci utilizzati per il trattamento delle patologie tiroidee. Tutti i farmaci chemioterapici possono essere utilizzati. Un elenco non limitativo comprende gemcitabina, doxorubicina, cisplatino, paclitaxel, capecitabina, gli inibitori della
20 tirosin-chinasi quali axitinib, vandetanib, motesanib, sunitinib e sorafenib, altri farmaci come romidepsin, decitabina, bortezomib e lenalidomide.

I liposomi della presente invenzione possono essere utilizzati anche per la co-somministrazione di più farmaci contemporaneamente.

Una realizzazione preferita della presente invenzione è il liposoma caricato con gemcitabina.

- 25 In particolare, la sospensione liposomiale comprendente la seguente miscela fosfolipidica DPPC/Chol/DSPE-mPEG2000/DSPE-mPEG2000-PDP (6:3:0,6:0,4 rapporto molare), coniugata con TSH e caricata con gemcitabina (GEM) è un oggetto della presente invenzione particolarmente preferito. Secondo questa forma di realizzazione, le piccole colloidali vescicole unilamellari ottenute con il processo sopra descritto, sono state sospese in una
30 soluzione isotonica di GEM-cloridrato e mantenute a temperatura ambiente, ad esempio per 3 ore.

In un modo del tutto vantaggioso, la presente invenzione, e soprattutto questa realizzazione, fornisce un innovativo trattamento delle patologie tiroidee e in particolare delle neoplasie tiroidee che non rispondono alle attuali terapie. Infatti, il recettore del TSH rappresenta un bersaglio ideale per questo tipo di trattamento per due principali motivi: a) esso è sovra-
5 espresso in un gran numero di carcinomi differenziati della tiroide, (Brabant G, Maenhaut C, Kohrle J et al, Mol. Cell. Endocrinol. 82, R7-R12 (1991); Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H et al, Eur. J. Endocrinol. 142, 340-346 (2000); Lazar V et al, J. Clin. Endocrinol. Metab. 84, 3228-3234 (1999); Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, et al, J. Clin. Endocrinol. Metab. 92, 2840-2843, (2007), ed è stata anche ampiamente analizzata la possibilità di rafforzare la sua
10 espressione anche nelle cellule tumorali meno differenziate, così come risulta da esperimenti in vitro (Aiello A, Pandini G, Frasca F et al., Endocrinology 147, 4463 (2006); Landriscina M, Fabiano A, Altamura S et al, J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 5663 (2005); b) eventuali danni alle cellule tiroidee normali devono essere esclusi, in quanto, questa terapia innovativa sarà riservata ai pazienti con tumore recidivante o metastatico, che sono già stati sottoposti a
15 tiroidectomia totale, in accordo con le attuali linee guida per la gestione dei noduli maligni alla tiroide (Gharib H, Papini E, Paschke R. Eur. J. Endocrinol. 159, 493-505 (2008).

Secondo la presente invenzione, i liposomi coniugati con TSH sono utili come veicoli per farmaci che devono essere rilasciati in cellule che esprimono il recettore del TSH.

Una realizzazione preferita dell'invenzione prevede l'uso di liposomi caricati con almeno un
20 farmaco antitumorale per il trattamento di tumori della tiroide. Una realizzazione specifica dell'invenzione prevede l'utilizzo di detti liposomi caricati per il trattamento del carcinoma della tiroide, in particolare le sottoclassi aggressive di questo tumore. Secondo la presente invenzione, il tumore sia primario, sia metastatico possono essere trattati con i liposomi qui descritti. Secondo la presente invenzione, può essere trattata una neoplasia della tiroide non
25 rispondente alle terapie attualmente disponibili.

Secondo la presente invenzione, con i termini "trattamento" o "curare", si indica la somministrazione dei liposomi secondo la presente invenzione caricati con almeno un farmaco con l'obiettivo di indurre la regressione del tumore. I termini di cui sopra comprendono anche la riduzione del tumore o il blocco della crescita tumorale. I sopradetti
30 termini comprendono anche le terapie combinate con altri farmaci, anche antitumorali, in accordo ai protocolli terapeutici per il trattamento dei tumori tiroidei.

Secondo un altro oggetto della presente invenzione, i liposomi qui descritti sono somministrati sotto forma di una composizione farmaceutica. In genere, la composizione contiene una dose terapeuticamente efficace di liposomi caricati con almeno un farmaco in miscela con almeno un eccipiente accettabile per uso farmaceutico. Il dosaggio terapeutico viene determinato da persone con competenze ordinarie nel settore con normali procedure di determinazione del dosaggio usate nel settore della farmacologia, in particolare nel settore delle patologie tumorali. Elementi da prendere in considerazione sono, ad esempio: la gravità della malattia, le condizioni di salute generali del soggetto da trattare, altre terapie concomitanti. Linee guida generali possono essere tratte dal Remington's Pharmaceutical Handbook, ultima edizione. Ogni forma di somministrazione nota per i liposomi può essere usata nella pratica della presente invenzione. Una realizzazione particolarmente preferita dell'invenzione prevede la somministrazione endovenosa. A tal fine, le formulazioni iniettabili possono essere preparate secondo le tecniche ben note in letteratura. Esempi formulativi possono essere trovati nei seguenti brevetti: US 5.653.998, WO 2006/105155, US 5.626.832. Ad esempio sospensioni liposomiali veicolati in formulazioni farmaceuticamente accettabili sono note nel settore. Altra applicazione della presente invenzione è la somministrazione intranasale.

I seguenti esempi esemplificativi illustrano ulteriormente l'invenzione.

Materiali

1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfatidilcolina monoidrata (DPPC) e N-(carbonilmetossipoli-etilene glicole-2000)-1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina (DSPE-MPEG 2000), sono stati acquistati alla Genzyme (Suffolk, UK). 1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina-N-[PDP(metossipoli-etilene glicole-2000)] (DSPE-mPEG2000-PDP) sono state ottenute dall'Avanti Polar (Alabaster, Alabama, USA). L'ormone tireostimolante (TSH, da adenoipofisi umana), N-(fluorescein-5-tiocarbamoil)-1,2-diesadecanoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina, sale di trimetilammonio (Fluoresceina-DHPE), bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (sali di tetrazolio), DL-ditiotreitolo sono stati acquistati dalla Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). F12-medium, minimum essential medium (MEM) con glutamina, soluzione tripsina/EDTA (1×), il siero bovino fetale e la soluzione di penicillina-streptomina sono state acquistate dalla Gibco (Invitrogen Corporation, UK). [³H]colesteril esadecil etere ([³H]CHE, 40 Ci/mmol) è stato acquistato alla Perkin Elmer-Italia (Monza, Italy).

Esempio 1

Preparazione dei liposomi

I liposomi sono stati preparati con una miscela di DPPC/Chol/DSPE-mPEG2000/DSPE-mPEG2000-PDP (6:3:0,6:0,4 in rapporto molare). La miscela di lipidi (20 mg) è stata sciolta
5 in un palloncino utilizzando una miscela di solvente cloroformio/metanolo (3:1 v / v), che è stata successivamente rimossa per mezzo di un evaporatore rotante (Büchi R-210 in Svizzera), il film è stato mantenuto tutta la notte a temperatura ambiente in un fornetto di essiccazione in vetro (Büchi T51) collegato ad una pompa a vuoto per eliminare ogni traccia di solvente, consentendo così la formazione di una pellicola lipidica a strato sottile. Quando
10 necessario, i liposomi marcati con sonda fluorescente sono stati preparati per co-dissoluzione della fluoresceina-DHPE (0,1% M) con i lipidi. Il film lipidico è stato idratato con 1 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9% w/v).

Liposomi multilamellari (MLV) sono stati ottenuti sottoponendo la miscela lipidi/fase acquosa a tre cicli alternati (3 minuti ciascuno) di riscaldamento a 58 °C (baghetto
15 termostato) e vortex a 700 giri/min. Per ridurre il legame disolfuro, la formulazione è stata incubata con una soluzione 50 mM DTT (1:2 v/v rispettivamente) per 30 min. Poi, è stata centrifugata a 20.000 g per 60 minuti a 4 °C (Beckman Coulter Allegra 64R) con l'obiettivo di rimuovere l'eccesso di DDT. Successivamente, il pellet è stato risospeso con una soluzione di solfato di ammonio 250 mM (1 ml) e poi sottoposto a dieci cicli di congelamento (con azoto
20 liquido) e scongelamento (con un bagno d'acqua a 40 °C), ottenendo così un gradiente di pH, con un ambiente acido omogeneo nel compartimento acquoso intraliposomale. Le vescicole multilamellari sono state sottoposte a estrusione attraverso due filtri di policarbonato disposti in pila con pori di 400, 200 e 100 nm (Costar, Corning Incorporated, NY, USA) mediante un estrusore in acciaio inox (Lipex Biomembranes, Vancouver, BC, USA) e la soluzione di
25 ammonio solfato libero è stata rimossa per centrifugazione. Le vescicole colloidali unilamellari piccole sono state sospese in una soluzione isotonica (1 ml) di GEM-cloridrato (1 mM) e conservate a temperatura ambiente per 3 ore. Infine, 2,5 microgrammi di TSH sono stati incubati tutta la notte con la formulazione per consentire la bioconiugazione con le catene di PDP ridotto.

Esempio 2

Attività citotossica

Gli effetti citotossici della gemcitabina libera o incapsulata nei sistemi liposomiali sono stati valutati mediante test MTT (vitalità cellulare). Le cellule in coltura sono state piastrate in capsule di Petri da 96 pozzetti (5×10^3 cellule/0,2 ml) e incubate per 24 ore a 37 °C per promuovere l'adesione alla piastra. Il terreno di coltura è stato quindi rimosso, sostituito con formulazioni diverse (prive di GEM, con GEM caricata in liposomi pegilati e con GEM caricata in liposomi TSH-pegilato) e incubate per 24, 48 o 72 h.

Ogni piastra aveva 8 pozzetti contenenti cellule non trattate (come controllo) e 8 pozzetti con cellule trattate con liposomi vuoti (come bianco). Dopo ogni periodo di incubazione, 10 µl di sale di tetrazolio solubilizzato in una soluzione di PBS (5 mg/ml) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e le piastre sono state nuovamente incubate per 3 ore. Alla fine di questo periodo il mezzo è stato rimosso e i sali di formazano (precipitati sul fondo del pozzetto dopo l'ossidazione) sono stati solubilizzati con 200 µl di una miscela di DMSO/etanolo (1:1, v/v), agitando le piastre per 20 minuti a 230 giri/min (IKA® KS 130 Control, IKA® WERKE GMBH & Co., Staufen, Germania). Il formazano solubilizzato è stato quantificato con uno spettrofotometro per micropiastre (Multiskan SM 6.0, Labsystems) ad una lunghezza d'onda di 540 nm, con riferimento alla lunghezza d'onda di 690 nm. La percentuale di vitalità cellulare è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\text{Vitalità cellulare (\%)} = \text{Abs}_T / \text{Abs}_C \times 100$$

dove Abs_T è l'assorbanza delle cellule trattate e Abs_C è l'assorbanza delle cellule controllo (non trattate). La concentrazione di formazano è direttamente proporzionale alla vitalità cellulare che è stata riportata come media di sei differenti esperimenti $\pm$ deviazione standard.

Esempio 3

Interazione Liposomi-cellule

Al fine di correlare l'interazione tra le diverse formulazioni liposomiali e le diverse linee cellulari (CHO-W e CHO-T) in funzione del tempo, sono state utilizzate vescicole marcate ($[^3\text{H}]$ CHE (0,003% p/p corrispondenti a 3 nmol di $[^3\text{H}]$ CHE). In particolare, le cellule sono state piastrate in piastre a 6-pozzetti (5×10^5 cellule/ml) e successivamente trattati con 100 µl di formulazione triziata. TSH libero (0,1-1.000 µU/ml) è stato utilizzato al fine di valutare la possibile competizione con i recettori ormonali. Dopo 3 h di incubazione, le cellule sono state centrifugate (1200 gpm a temperatura ambiente per 10 min), al fine di eliminare il terreno di coltura, lavate due volte con PBS e trasferite in fiale di scintillazione in liquido in polipropilene (20 ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germania) e disciolte in

una soluzione di idrossido di ammonio quaternario (2 ml) (BTS-450, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Paesi Bassi) sotto costante agitazione per 1 ora a 60 °C utilizzando un agitatore incubatore (Innova TM 4300, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Alla fine del tempo di incubazione, il cocktail di scintillazione liquida (7 ml) (Ready OrganicTM,
5 Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) è stato aggiunto, e i campioni sono stati miscelati con vigore e analizzati utilizzando un contatore a scintillazione liquida Wallac Win SpectralTM 1414 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. Waltham, MA, USA). Per l'analisi dei dati è stato usato il software 1414 Win Spectral Wallac LCS.

Analisi mediante microscopia confocale (CLSM)

10 L'interazione tra le cellule CHO e liposomi marcati con fluoresceina (con o senza TSH) è stata valutata da studi CLSM. Per questi esperimenti, le cellule (4×10^5 cellule/ml) sono state poste in cultura in piastre da 6 pozzetti con terreno di coltura e un vetrino sterile è stato posizionato in ogni pozzetto. Le piastre sono state incubate per 24 ore e poi le cellule sono state trattate con vescicole marcate con fluoresceina per tempi di incubazione diversi (3 e 6
15 ore). Dopo l'incubazione, ogni pozzetto è stato lavato con PBS (3 volte) per rimuovere l'eccesso di colloidali e le cellule sono state fissate sul vetrino sterile utilizzando 1 ml di una soluzione di etanolo (70% v/v). Ogni vetrino è stato lavato di nuovo con PBS per tre volte ed è stato aggiunto PBS (2 ml) a ciascun pozzetto. Le piastre sono state conservate a 4 °C fino all'analisi CLSM. Prima dell'analisi, sono stati posizionati dei copri vetrino sui vetrini usando
20 una soluzione di glicerolo (70% v / v) per eliminare l'aria eventualmente presente, e, quindi, sono stati fissati con una colla trasparente. Le analisi sono state effettuate utilizzando un Leica TCS SP2 CLSM MP a $\lambda_{exc} = 496$ nm e $\lambda_{em} = 519$ nm. La risoluzione di scansione fino a 4096×4096 pixel con un raggio laser Ar/Kr di 75 mW, dotato di un filtro analizzatore di fluoresceina, è stato utilizzato durante le analisi.

25 I campioni sono stati registrati mediante un pacchetto software “macro developer” che utilizza una serie di acquisizioni multidimensionali a controllo digitale. L'obiettivo utilizzato è stato un obiettivo 100× ad immersione ad olio.

Esempio 4

Cattura intracellulare della gemcitabina

30 Cellule CHO W e CHO-T sono state seminate (3×10^4 cellule/ml) in capsule di Petri in plastica da 12 pozzetti e poste ad incubare con gemcitabina libera o incapsulata in liposomi (1 ml) ad una concentrazione finale di 1 μ M. A diversi tempi di incubazione, le cellule sono state

raschiate dai pozzetti, raccolte insieme e il campione è stato centrifugato (1200 gpm) a 22 °C per 10 minuti. I pellets cellulari sono stati separati dal surnatante, risospesi in soluzione tampone PBS (1 ml), e distrutti da sonicazione (SONOPOLUS GM 70, Bandelin Electronic, Berlino, Germania) a 50 cicli al secondo per 3 min. La quantità intracellulare di gemcitabina è stata determinata mediante HPLC. Ogni valore rappresenta la media di cinque diversi esperimenti.

Ogni campione è stato preparato per l'analisi HPLC con l'aggiunta di una soluzione 2% (p/v) di solfato di zinco (1,4 ml) in una miscela metanolo/acqua (30:70 v/v). La miscela risultante è stata vortexata per 5 minuti e poi centrifugata a 6000 giri al minuto con una centrifuga Megafuge Eppendorf (BJB Labcare Ltd., Buckinghamshire, UK). Il surnatante è stato filtrato con una membrana di nylon (dimensione dei pori 0,22-µm) (Whatman Inc.), liofilizzato, solubilizzato in 100 µL di fase mobile e sottoposto ad analisi HPLC.

Determinazione HPLC

L'analisi è stata eseguita utilizzando un sistema HPLC (Varian Inc., Palo Alto, USA) dotato di un sistema on-line per degasare i solventi della fase mobile (200-2031 Metachem degasser); un sistema di pompe binarie (M210 binary pump), un autocampionatore (ProStar 410), un sistema integrato per la termostatazione della fase stazionaria (G1316A), un sistema d'iniezione da 25 µl (CSL20 Cheminert Sample Loop). I cromatogrammi sono stati acquisiti e processati utilizzando il software Galaxie[®] chromatography manager (Varian Inc.). La separazione cromatografica è stata condotta a temperatura ambiente usando una colonna GraceSmart RP C18 (4,6×250 mm, 5µm dimensioni particellari, Alltech Grom GmbH, Rottenburg-Hailfingen, Germania). La fase mobile era acqua/ acetonitrile (95:5 v/v). La velocità di flusso era di 1 mL/min, utilizzando un rivelatore a UV/Vis programmato alla lunghezza d'onda di 269 nm.

Il metodo cromatografico è stato in grado di fornire un'adeguata separazione dei picchi della gemcitabina e della 2¹,2¹-difluorodeossiuridina, che hanno mostrato rispettivamente dei tempi di ritenzione di 6,00 e 8,7 min. La quantificazione della gemcitabina è stata effettuata utilizzando una curva standard esterna, nell'intervallo di concentrazione lineare compreso tra 0,1 e 10 µg/ml. Per la costruzione della curva standard, è stata utilizzata una soluzione standard di GEM (1 mg/ml). Le quantità di GEM sono state determinate usando la curva standard utilizzando la seguente equazione:

$$AUC = 0,60112x + 0,02840$$

dove x rappresenta la concentrazione di farmaco ($\mu\text{g/ml}$) ed AUC l'area sotto la curva ($\text{mAu} \times \text{min}$). I quantitativi di GEM sono stati espressi come $\mu\text{g/ml}$. I dati sperimentali riportati sono la media di tre diversi esperimenti.

Esempio 5

5 **Saggi *in vivo***

Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con i principi e le procedure dettate dal Comitato Etico locale ed in accordo con le European Communities Council Directive del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni standard sia di temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) che di umidità (65%) con un ciclo di 12h luce/12h di buio (luce dalle 8:00), e gli è stato fornito cibo ed acqua *ad libitum*.

Biodistribuzione

Gli esperimenti di biodistribuzione sono stati condotti su ratti Wistar. Liposomi (200 μL) marcati con $[^3\text{H}]\text{CHE}$ (0,003% corrispondente a 3 mmol di $[^3\text{H}]\text{CHE}$), sono stati iniettati nei ratti attraverso la vena caudale. Dopo 3 h, i ratti sono stati sacrificati per dislocazione cervicale e sono state prelevate le tiroidi. Gli organi interi sono stati trasferiti in vials di polipropilene per scintillazione in liquido (delle dimensioni di 20 mL, Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Germania) e mescolati con una soluzione di idrossido d'ammonio (2mL, BTS-450, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Netherlands) sotto continua agitazione per 4 h a 60°C usando un incubatore shaker (Innova™ 4300, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) per permettere la completa dissoluzione. Alla fine del periodo di incubazione, vari campioni sono stati addizionati 2 ml di H_2O_2 al 24 % a temperatura ambiente per 5 min, successivamente è stato aggiunto il cocktail di scintillazione 7 mL (Ready Organic™, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) e le miscele sono state vigorosamente agitate ed analizzate usando un contatore di scintillazione liquida Wallac Win Spectral™ 1414 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. Waltham, MA, USA). I dati sono stati analizzati con un software 1414 Win Spectral Wallac LCS. Per eliminare la radioattività dovuta al sangue contenuta negli organi, derivata dal contributo dei liposomi nello spazio vascolare così come al parenchima tissutale (inclusi i macrofagi e le cellule endoteliali dei capillari) (X_{tessuto}), una correzione è stata effettuata secondo la seguente equazione:

$$X_{\text{tessuto}} = X_{\text{organo}} - (V_0 \times C(t))$$

dove X_{organo} rappresenta il livello di radioattività rilevata dai vari campioni di organi, V_0 rappresenta il volume totale dello spazio vascolare e dei fluidi interstiziali, determinato dal livello di radioattività negli organi interi diviso la concentrazione ematica 10 minuti dopo l'iniezione i.v. del $[^3\text{H}]\text{CHE}$ -liposoma e $C(t)$ è la concentrazione ematica al tempo indicato.

- 5 Un'ulteriore correzione del quenching è stata ottenuta misurando la radioattività dei tessuti "bianco" dai ratti non trattati, addizionati con quantità note di $[^3\text{H}]\text{CHE}$ ($0,030\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ di lipidi).

Esempio 6

Attività Antitumorale

- 10 L'attività antiproliferativa *in vitro* è stata valutata in termini di citotossicità, usando il test di vitalità cellulare MTT. L'effetto citotossico è stato valutato in funzione del tempo di incubazione (24, 48 o 72 h) e della concentrazione del farmaco (da $0,01$ a $10\mu\text{M}$) per definire rispettivamente gli effetti tempo-dipendente e dose-dipendente. Gli esperimenti sono stati condotti sia su cellule CHO native (CHO-W) che su cellule trasfettate per il recettore del TSH
- 15 (CHO-T), (Figura 1).

- Dopo 24 h di incubazione è possibile osservare che nel caso della gemcitabina libera non ci sono effetti citotossici notevoli alle concentrazioni da $0,01\mu\text{M}$ a $0,1\mu\text{M}$ sia nel caso delle cellule CHO-W sia nelle CHO-T. Un incremento della citotossicità della gemcitabina è stata osservata ad una concentrazione $1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$ di gemcitabina libera su entrambe le linee
- 20 cellulari (rispettivamente $\sim 10\%$ e 15% di riduzione della vitalità cellulare per entrambe le linee). Significative differenze non sono state evidenziate anche dopo 48 e 72 h di incubazione a tutte le concentrazioni di farmaco libero.

- I liposomi pegilati carichi di gemcitabina hanno causato un incremento della citotossicità rispetto al farmaco libero a tutte le concentrazioni, a tutti i tempi di esposizione ed in
- 25 entrambe le linee cellulari (CHO-W e CHO-T). La riduzione della vitalità cellulare cresceva al crescere della concentrazione di farmaco (dal $\sim 20\%$ per una concentrazione di farmaco $0,01\mu\text{M}$ e 24 h di esposizione, fino al 70% per una concentrazione di farmaco di $10\mu\text{M}$ e 72 h di trattamento per le CHO-W; dal 10% ad una concentrazione di $0,01\mu\text{M}$ e 24 h di incubazione fino al 60% nel caso della concentrazione $10\mu\text{M}$ e 72 h di trattamento). Non
- 30 sono state osservate significative differenze tra cellule native e le cellule trasfettate.

Differenze significative sono state osservate in termini di mortalità per i TSH-liposomi pegilati caricati con gemcitabina a tutte le concentrazioni e a tutti i tempi di esposizione.

Dopo 24 h di incubazione, per esempio ad una concentrazione 0,01 μ M, questa formulazione ha mostrato una diminuzione della vitalità cellulare di circa il 20% sulle cellule CHO-T, a differenza delle cellule CHO-W dove non si sono registrate significative variazioni sugli effetti citotossici rispetto alla formulazione senza il TSH. Questa tendenza si è mantenuta
5 dopo 48 e 72 h di incubazione, fornendo una riduzione del 90% della vitalità cellulare delle cellule CHO-T ad una concentrazione 10 μ M nel caso della formulazione TSH-liposomi.

Esempio 7

Per correlare la velocità di interazione tra le diverse formulazioni liposomiali e le diverse linee cellulari in funzione del tempo, sono state usate vescicole marcate con [3 H]CHE, ed il
10 TSH libero è stato usato per valutare la possibile competizione per il recettore ormonale. I risultati sono riportati in Figura 2. L'interazione tra i liposomi pegilati con le cellule CHO-W e CHO-T non è significativamente diversa. L'uso dei TSH-liposomi pegilati dà una interazione doppia nel caso delle cellule CHO-T rispetto alle cellule CHO-W. Questo risultato è una chiara evidenza del targeting attivo del nostro nanotrasportatore. Inoltre, mentre nel
15 caso delle CHO-W la co-incubazione dei TSH-liposomi pegilati con il TSH dà una interazione non significativamente diversa (non si instaura competizione con l'ormone), nel caso delle cellule CHO-T l'interazione è influenzata in modo inversamente proporzionale alla presenza del TSH (aumentando la concentrazione di TSH diminuisce l'interazione tra i TSH liposomi pegilati e le cellule CHO-T). Questi risultati rappresentano una chiara evidenza che
20 il nostro carrier agisce con un targeting selettivo.

L'interazione tra le cellule CHO e i liposomi fluoresceinati (con o senza molecola TSH) è stata valutata mediante studi di CLSM. Gli esperimenti sono stati condotti per 3 e 6 h. Le micrografie chiaramente indicano una evidente fluorescenza verde in tutti i pannelli, ma significativamente maggiore nel caso delle cellule CHO-T trattate con TSH-liposomi pegilati
25 contenenti gemcitabina sia per 3 che per 6 h. Questi risultati sono un'ulteriore dimostrazione del targeting attivo dei nostri liposomi.

Noi abbiamo investigato l'abilità del nostro carrier di veicolare il farmaco selettivamente dentro le cellule bersaglio. La cattura intracellulare della gemcitabina promossa dai liposomi pegilati o dai TSH-liposomi pegilati caricati con gemcitabina è stata investigata in funzione
30 del tempo. Come riportato in Figura 3, l'uso dei TSH-liposomi pegilati contenenti gemcitabina ha causato un significativo incremento della cattura intracellulare nelle cellule CHO-T, ma non nelle cellule CHO-W, per tutti i tempi di esposizione.

Esempio 8

Per confermare i risultati *in vitro*, i profili di biodistribuzione dei liposomi radiomarcati con [³H]CHE su ratti sono stati investigati in seguito alla somministrazione i.v. In particolare, come è possibile osservare in Figura 4, la presenza della molecola di TSH sulla superficie liposomiale permette un incremento dell'accumulo di vescicole colloidali nel tessuto tiroideo. Più in dettaglio, dopo 3 h dalla somministrazione, i TSH-liposomi forniscono un accumulo nel tessuto tiroideo 3 volte superiore rispetto ad una formulazione colloidale non bioconiugata.

I nostri dati mostrano l'efficacia del nostro costrutto per incrementare il "targeting" specifico dei TSH-liposomi pegilati verso cellule che esprimono il recettore per il TSH. Infatti l'uso della gemcitabina caricata in TSH-liposomi pegilati è stata in grado di assicurare nelle cellule che recano il recettore per il TSH, un incremento della velocità d'interazione tra la formulazione liposomiale e le cellule garantendo un incremento della veicolazione del farmaco e dell'effetto citotossico a dosi più basse e a minori tempi di esposizione.

Inoltre, lo stesso comportamento è stato osservato *in vivo*: infatti, anche nel tessuto tiroideo del ratto, il legame dei TSH-liposomi pegilati è avvenuto in modo più efficace rispetto ai liposomi pegilati non funzionalizzati per il bersaglio (untargeted), anche grazie a una ridotta competizione con il TSH nativo, ottenuto dalla somministrazione degli ormoni tiroidei.

I nostri risultati dimostrano il vantaggio di utilizzare i nostri nanotrasportatori per veicolare selettivamente un farmaco antiproliferativo nelle cellule che esprimono il recettore per il TSH ottenendo effetti validi a più bassi dosaggi e quindi presumibilmente con una minore citotossicità sistemica.

Inoltre, avere a disposizione un trasportatore con la specifica attività di legare il recettore del TSH offre altre opportunità di utilizzo contro le cellule cancerose tiroidee. Per esempio, gli adenomi tiroidei iperfunzionanti richiedono, prima del trattamento chirurgico o della radioterapia con iodio, una terapia medica con farmaci antitiroide che non sono scevri da effetti collaterali. Esse sono lesioni benigne, ben differenziate che esprimono normali livelli di recettore per il TSH costitutivamente attivo. Inoltre, i livelli serici di TSH sono bassi o non determinabili per effetto di feedback negativo esercitato dagli alti livelli di ormone tiroideo prodotto dai noduli iperfunzionanti. Ancora, la disponibilità di un trasportatore selettivo anti-TSHR permette di arrivare più selettivamente alle cellule tiroidee riducendo la dose del farmaco antitiroideo da somministrare e conseguentemente la sua azione extra-tiroidea.

Concludendo, la strategia proposta offre un'importante possibilità non solo per la nostra molecola bersaglio, ma anche per altre molecole che possono essere coniugate alla superficie del trasportatore per veicolare il farmaco verso un particolare bersaglio. Inoltre, la nostra strategia può essere adattata anche ad altri trasportatori colloidali come micro e nano-particelle polimeriche, trasportatori lipidici colloidali, ed ogni trasportatore che può essere chimicamente funzionalizzato.

RIVENDICAZIONI

- 1) Un liposoma comprendente un componente PEG-PDP-TSH.
- 2) Il liposoma secondo la rivendicazione 1 che comprende:
 - a. 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina monoidrato;
 - b. colesterolo;
 - c. 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina e
 - d. 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[PDP(metossi-polietilen-glicole-2000)].
- 3) Il liposoma secondo la rivendicazione 2, in cui i componenti sono in rapporto molare: 6:3:0,6:0,4.
- 4) Il liposoma secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3 in forma di vescicole unilamellari piccole.
- 5) Il liposoma secondo la rivendicazione 4, dove le suddette vescicole unilamellari piccole hanno un diametro inferiore a 400 nm, preferibilmente inferiore a 200 nm, più preferibilmente inferiore a 150 nm, ancora più preferibilmente inferiore a 100 nm.
- 6) Il liposoma secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 caricato con almeno un farmaco adatto per il trattamento delle patologie tiroidee.
- 7) Il liposoma secondo la rivendicazione 6, dove il suddetto farmaco è scelto dal gruppo che consiste di gemcitabina, doxorubicina, cisplatino, paclitaxel, capecitabina, inibitori della tirosin chinasi come axitinib, vandetanib, motesanib, sunitib e sorafenib ed altri farmaci come la rodimepsina, decitabina, bortezomib e la lenalidomide.
- 8) Composizione farmaceutica comprendente i liposomi delle rivendicazioni 6 o 7 in miscela con almeno un veicolo e/o eccipiente.
- 9) Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8 per la somministrazione endovenosa.
- 10) Uso del liposoma di una delle rivendicazioni da 1 a 5 per la veicolazione intracellulare di una sostanza ad una cellula esprimente il recettore per il TSH.
- 11) Uso del liposoma di una delle rivendicazioni 6 o 7 per la preparazione di un farmaco per il trattamento di una malattia della ghiandola tiroidea.

- 12) Uso secondo la rivendicazione 11, in cui detta malattia è una neoplasia tiroidea.
- 13) Uso secondo la rivendicazione 12, dove detta neoplasia tiroidea non è rispondente alle correnti terapie.

CLAIMS

1. A liposome comprising a PEG-PDP-TSH component.
2. The liposome according to claim 1 comprising:
 - a. 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine monohydrate,
 - b. cholesterol,
 - c. 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine and
 - d. 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[PDP(methoxypolyethylene glycol-2000)].
3. The liposome according to claim 2, wherein the components a:b:c:d are in the 6:3:0.6:0.4 molar ratio.
4. The liposome according to any one of claims 1-3, in the form of small unilamellar vesicle.
5. The liposome according to claim 4, wherein said small unilamellar vesicle has a diameter lower than 400 nm, preferably lower than 200 nm, more preferably lower than 150 nm, even more preferably lower than 100 nm..
6. The liposome according to any one of claims 1-5, loaded with at least one drug suitable for the treatment of a thyroid disease.
7. The liposome according to claim 6, wherein said drug is selected from the group consisting of gemcitabine, doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, capecitabine, tyrosine-kinase inhibitors such as axitinib, vandetanib, motesanib, sunitinib and sorafenib, other drugs such as romidepsin, decitabine, bortezomib and lenalidomide.
8. Pharmaceutical composition comprising the liposome of claims 6 or 7 in admixture with at least one vehicle and/or excipient.
9. Pharmaceutical composition according to claim 8 for intravenous administration.
10. Use of the liposome of any one of claims 1-5 for the intracellular delivery of a substance to a cell expressing TSHR.
11. Use of the liposome of any one of claims 6 or 7 for the preparation of a medicament for the treatment of a disease of thyroid gland.
12. Use according to claim 11, wherein said disease is a thyroid neoplasia.

13. Use according to claim 12, wherein said thyroid neoplasia is not responsive to current therapies.

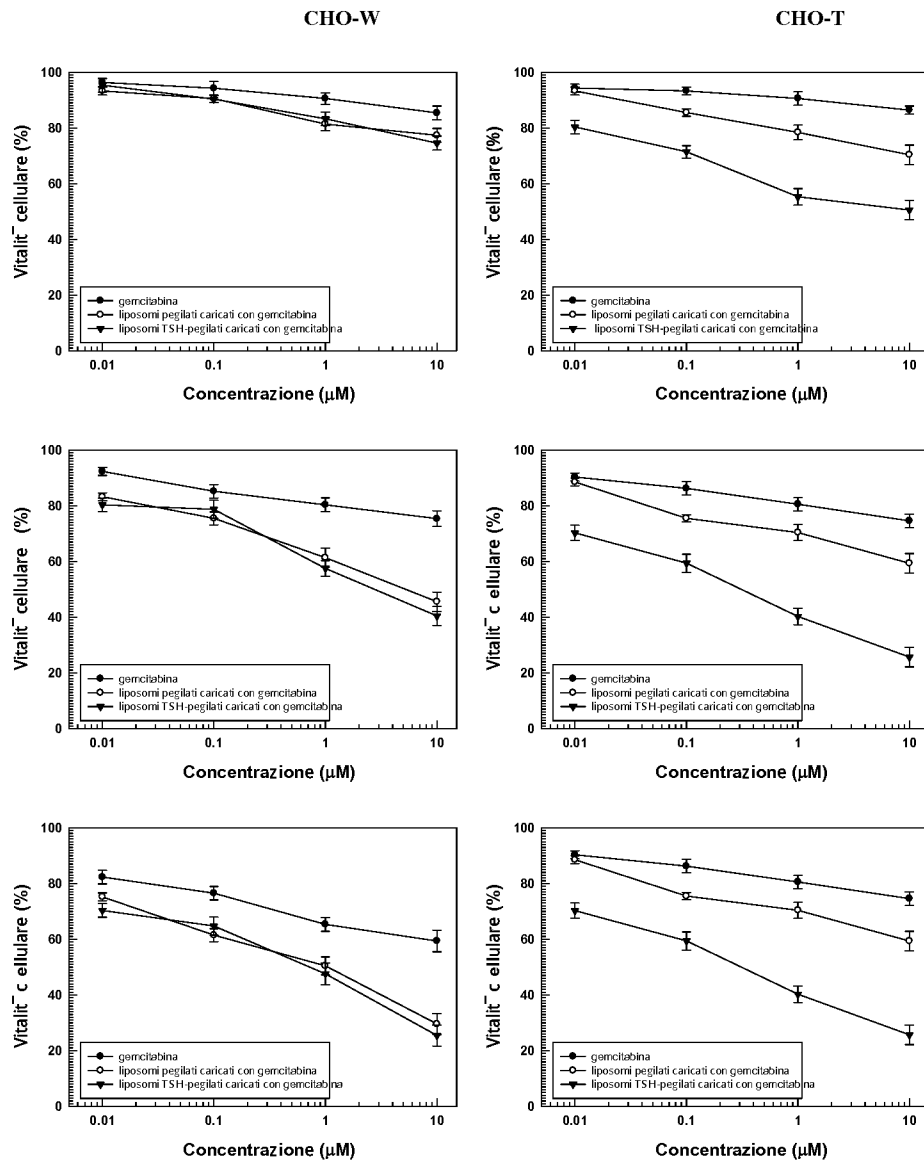


FIGURA 1

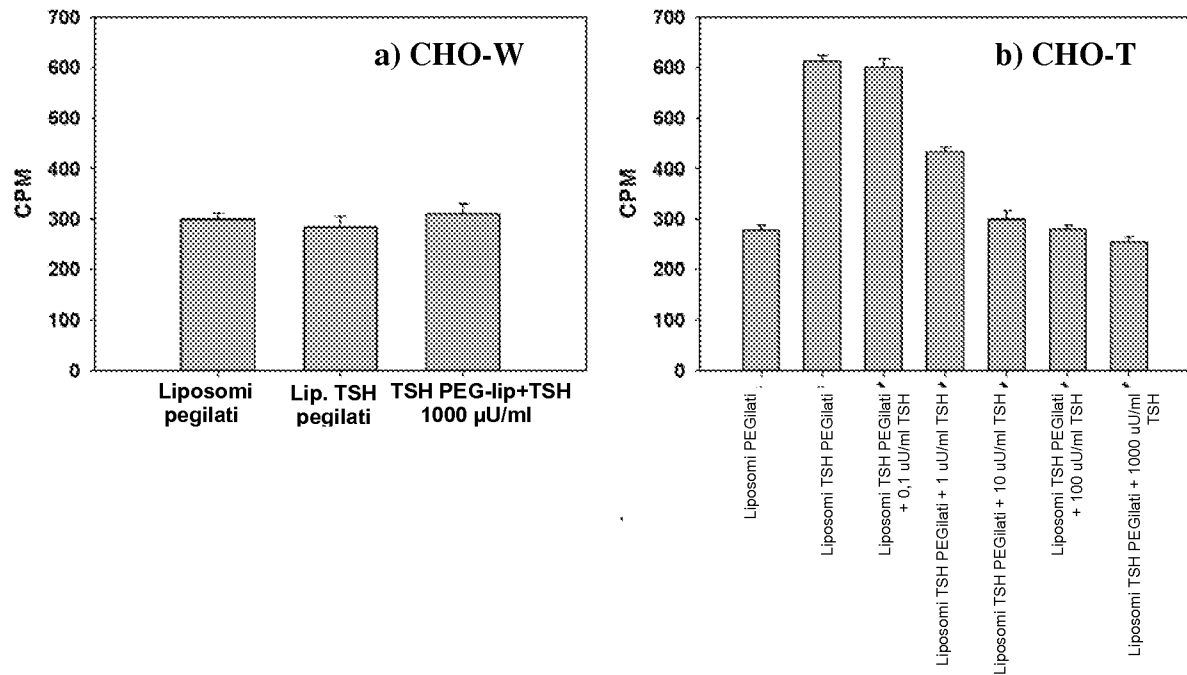


FIGURA 2

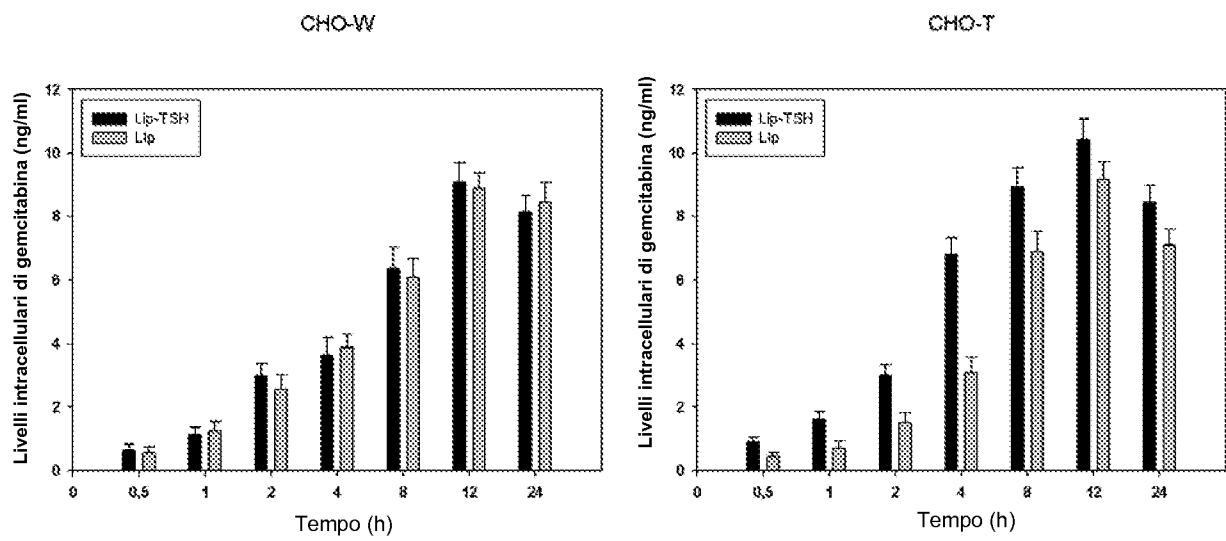


FIGURA 3

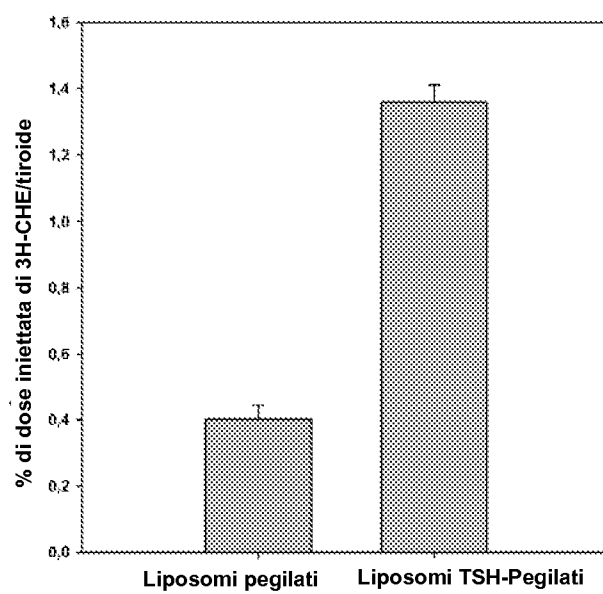


FIGURA 4