



UNIVERSITY OF SALERNO

#### **Department of Industrial Engineering**

Master's Degree in Chemical Engineering

## Stimuli-sensitive micelles for targeted delivery system of chemotherapeutic drugs

Thesis in **Transport Phenomena** 

Supervisors:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Dr. Ir. Wim E. Hennink

Prof. Dr. Cornelus F. van Nostrum

Dr. PhD Mahsa Bagheri

Candidate:

Marco Iannone 0622200461

Academic Year 2018/2019



# **Universiteit Utrecht**

The experimental part of this thesis has been performed at the Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Sciences, Utrecht University (Utrecht, Netherland), under the supervision of Prof. Dr. Cornelus F. Van Nostrum, Prof. Dr. Ir. Wim E. Hennink and PhD student Mahsa Bagheri, during the Erasmus Traineeship project.

La parte sperimentale di questa tesi è stata svolta presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Scienze dell'Università di Utrecht (Utrecht, Olanda) sotto la supervisione di Prof. Dr. Cornelus F. Van Nostrum, Prof. Dr. Ir. Wim E. Hennink e della dottoranda Mahsa Bagheri, durante il progetto Erasmus Traineeship.

Ti sei mai chiesto quale funzione hai?

Have you ever wondered what function you have?

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Romans

La data prevista per la discussione della tesi è il 25-07-2019 Fisciano, 15-07-2019

## **Table of Contents**

Table of Contents	I
List of Figures	V
List of Tables	VII
Estratto della tesi	IX
Abstract	XV
Introduction	1
1.1 General on Cancer	2
1.1.2 Classification of tumours	2
1.2 State of art	4
1.2.1 Cancer treatments: Chemotherapy	4
1.2.2 Taxanes	6
1.2.3 Targeting strategies	7
1.2.3 Polymeric micelles	7
1.2.4 Stimuli-sensitive nanotechnologies for anticancer drudelivery system	ug 9
1.3 Aim of Thesis	10
Methods and materials	13
2.1 Materials and instruments	14
2.1.1 Monomers synthesis materials	14

Pag. II	Stimuli-sensitive micelles	Marco Iannone
	2.1.2 Polymerization and micelles formation materials	14
	2.1.3 mPEG <sub>2</sub> -ABCPA	14
	2.1.4 Paclitaxel	14
	2.1.5 Used instruments	16
2.2	. Monomers synthesis	17
	2.2.1 HPMA-Bz N-(2-benzoyloxypropyl) methacrylamide	17
	2.2.2 PDTEMA (N-[2-(2-pyridyldithio)ethyl]methacrylamid	e) 17
2.3	Polymerization and empty/PTX-loaded micelles preparation	21
	2.3.1 Polymerization	21
	2.3.2 Empty micelles preparation	23
	2.3.3 Empty micelles stability	23
	2.3.4 PTX-loaded micelles preparation	24
2.4	Release study methods	24
	2.4.1 Loading Capacity (LC) and Encapsulation Efficacy (El	E) 24
	2.4.2 Release Study method	25
Resu	Its and discussion	
3.1	Monomers characterization	28
	3.1.1 HPMA-Bz	28
	3.1.2 PDTEA	29
	3.1.3 PDTEMA	29
3.2	Polymers characterization	30
	3.2.1 TGA	30
	3.2.2 DSC analysis	32
	3.2.3 GPC analysis	35
	3.2.4 H-NMR analysis	37
3.3	Micelles Characterization	40
	3.3.1 Empty and PTX-loaded micelle's size	40
	3.3.2 Encapsulation efficacy and Loading capacity	41
	3.3.3 Stability	42
3.4	Release study	45

Conclusions	51
4.1 Conclusions	52
4.2 Future perspectives	54
References	57

# **List of Figures**

Figure 1. How neoplasia starts (from https://www.cancercouncil.com.au)	3
Figure 2. Chemical structures of Paclitaxel(Taxol®) and Docetaxel(Taxotere®)	6
Figure 3. Polymeric micelle. Spheres: hydrophilic part; folded lines: lipophilic part.	c 8
Figure 4. Gemini 600 MHz (Varian Associates Inc., NMR Instruments, Palo Alto, CA)	16
Figure 5. HPMA-Bz, scheme of reaction	17
Figure 6. PDTEA scheme reaction	17
Figure 7. Powder of PDTEA after purification	18
Figure 8. PDTEMA scheme reaction	19
Figure 9. On the left: PDTEA reaction system, on the right: purification step of PDTEMA by manual silica gel chromatography	of 19
Figure 10. TLC plates to monitor PDTEMA fraction	20
Figure 11 PDTEA reaction system on left, PDTEA purification step on right	:.20
Figure 12. Reaction scheme polymerization mPEG-b-p-(HPMA-Bz)	21
Figure 13. Reaction scheme polymerization mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co- PDTEMA)	22
Figure 14. Reaction scheme polymerization mPEG-b-p-(PDTEMA)	23
Figure 15. Illustration of micelles formation[43]	23
Figure 16. PTX calibration curve for UPLC analysis	24
Figure 17. Micellar suspensions for in-vitro release study (from left to right): (A) mPEG-b-p-(HPMA-Bz) in PBS and in PBS + DTT; (C) mPEG-b-p- (PDTEMA) in PBS and in PBS + DTT; (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co- PDTEMA) in PBS and in PBS + DTT	26
Figure 18. Monomer's crystals after precipitation (HPMA-Bz on left and PDTEA after first precipitation in diethyl ether on right)	28
Figure 19. PDTEMA monomer H-NMR spectrum	29
Figure 20. TGA of (A) mPEG-b-p-(HPMA-Bz)	30

Figure 21. TGA of (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz <sub>(70)</sub> -co-PDTEMA <sub>(30)</sub> ) 31
Figure 22. TGA of (C) mPEG-b-p-(PDTEMA)
Figure 23. MDSC analysis on (A) mPEG-b-p-(HPMA-Bz), ramp of 3°C/min from -50°C to 150°C
Figure 24. MDSC analysis on (B)mPEG-b-p-(HPMA-Bz <sub>(70)-</sub> co-PDTEMA <sub>(30)</sub> ), ramp of 3°C/min from -50°C to 150°C
Figure 25. MDSC analysis on (C) mPEG-b-p-(PDTEMA), ramp of 3°C/min from -50°C to 150°C
Figure 26. GPC chromatogram of mPEG-b-p-(HPMA-Bz)
Figure 27. GPC Chromatogram of (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co-PDTEMA) 36
Figure 28. GPC chromatogram of (C) mPEG-b-p-(PDTEMA)
Figure 29. H-NMR spectrum of (A) mPEG-b-p-(HPMA-Bz)
Figure 30. H-NMR spectrum of (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co-PDTEMA) 38
Figure 31. H-NMR spectrum of (C) mPEG-b-p-(PDTEMA)
Figure 32. Size distribution of empty (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co-PDTEMA) micelles
Figure 33. (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz <sub>(70)</sub> -co-PDTEMA <sub>(30)</sub> ) – Size
Figure 34. (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz <sub>(70)</sub> -co-PDTEMA <sub>(30)</sub> ) – Derived Count Rate
Figure 35. (C) mPEG-b-p-(PDTEMA) – Size
Figure 36. (C) mPEG-b-p-(PDTEMA) – Derived Count Rate
Figure 37. (A) mPEG-b-p-(HPMA-Bz) in-vitro release study
Figure 38. (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co-PDTEMA) in-vitro release study 46
Figure 39. (C) mPEG-b-p-(PDTEMA) in-vitro release study 47
Figure 40. Comparison in "PBS only" solution
Figure 41. Comparison in "PBS + DTT" solution 49
Figure 42. Release study - global comparison
Figure 43. Other monomers which contain pi-pi stacking and S-S bond that could be developed and studied in future for stimuli-sensitive polymeric micelles as targeted delivery system for chemotherapeutic drugs

## **List of Tables**

Table 1. Chemotherapeutic drugs (from: https://www.cancerquest.org/patients/treatments/cancer-treatment-tables)	4
Table 2. History of Paclitaxel [38]	.15
Table 3. Starting materials for mPEG-b-p-(HPMA-Bz)	.21
Table 4. Starting materials for mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co-PDTEMA)	.22
Table 5. Starting materials for mPEG-b-p(PDTEMA)	.22
Table 6. Polymers Degradation Temperatures from TGA	.30
Table 7. Polymer's melting point temperature by DSC analysis	.34
Table 8. GPC results mPEG-b-p-(HPMA-Bz)	.35
Table 9. GPC results(B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co-PDTEMA)	.36
Table 10. GPC results of mPEG-b-p-(PDTEMA)	.36
Table 11. Empty/PTX-loaded micelles size	.40
Table 12. Details of proofs to determine EE and LC	.41
Table 13. Loading Capacity and Encapsulation Efficacy results	.41

### Estratto della tesi

Il cancro è una delle principali cause di morte al giorno d'oggi, e, nonostante la ricerca oncologica stia compiendo passi da gigante, lo sviluppo di una cura efficace giace ancora sotto la lente d'ingrandimento della scienza. Questo lavoro di tesi ha come scopo la realizzazione la\_ caratterizzazione di micelle е polimeriche nanoscopiche utili per l'incapsulamento e per il trasporto mirato di farmaci antitumorali, nello specifico di Paclitaxel, un principio attivo chemioterapeutico appartenente alla classe dei taxani, attualmente veicolato in una soluzione equimolare di etanolo ed olio di ricino poliossietilato. Importante sottolineare che con gli attuali sistemi di trasporto ci si imbatte spesso in un alto numero di effetti collaterali indesiderati, e, che la non-specificità cellulare dei farmaci chemioterapeutici come il paclitaxel rende necessaria la realizzazione di un sistema di "targeting mirato" del principio attivo. Le modalità di targeting sono due: attivo se si usano ligandi specifici per recettori specifici presenti sul tessuto tumorale, passivo se si sfruttano caratteristiche fisico-chimiche dell'ambiente tumorale. In merito a quest'ultima strategia, è stato verificato che il compartimento intracellulare è molto più riducente della matrice extracellulare, ed inoltre, molti studi hanno evidenziato come il tessuto tumorale sia generalmente molto più riducente del tessuto normale. Infine, un'ultima constatazione di rilievo: la stragrande maggioranza dei farmaci chemioterapeutici sono di natura lipofila, quindi di difficile formulazione farmaceutica.

Le micelle sensibili agli ambienti riducenti (Reduction-sensitive micelles) sono progettate per essere composte da un nucleo idrofobo in grado di ospitare il principio attivo chemioterapeutico di natura lipofila e di una corona idrofila che conferisce proprietà di "invisibilità" per il sistema reticolo-endoplasmatico (RES), che riduce l'assorbimento di biomolecole sulla superficie della micella, e che, oltre a ciò, è in grado di rilasciare il farmaco esclusivamente al presentarsi di determinate condizioni ambientali, quali, per l'appunto, l'ambiente riducente. Nel tentativo di realizzare un sistema di rilascio mirato è stata dunque indagata la natura dell'interazione  $\pi$ - $\pi$  (legame di tipo non covalente che si instaura tra molecole contenenti gruppi aromatici, come l'anello benzoilico) che, sulla base di studi precedenti, ha aumentato la ritenzione del farmaco da parte delle micelle e migliorato la stabilità delle stesse nella circolazione sanguigna e la natura del ponte disolfuro constatato che il legame S-S va incontro a rapida scissione in ambienti riducenti. Le micelle polimeriche in esame, la quale parte idrofila è composta da mPEG (methoxypoly(ethylene glycol)), si sono manifestate come agenti di solubilizzazione per farmaci idrofobici sicuri e biocompatibili con il corpo umano.

In questo lavoro sono stati sintetizzati due monomeri: il primo HPMA-Bz, chiamato anche N-(2-benzoyloxypropyl) methacrylamide, che fornisce alle micelle la possibilità di sfruttare l'impilamento  $\pi$ - $\pi$ , ed il PDTEMA, chiamato anche N-[2-(2pyridyldithio)ethyl]methacrylamide, prodotto tramite una reazione in due step e contenente l'anello piridinico, che fornisce l'impilamento  $\pi$ - $\pi$  ed il legame S-S che fornisce la capacità di reagire agli stimoli.

Dei monomeri sono state verificate le strutture chimiche molecolari tramite spettroscopia di risonanza magnetica nucleare sugli atomi di idrogeno (analisi H-RMN). Verificata la struttura dei monomeri, gli stessi sono stati utilizzati per la sintesi di polimeri anfifilici tramite polimerizzazione radicalica, utilizzando come macroiniziatore mPEG-ABCPA. Sono stati sintetizzati tre polimeri: (A) mPEG-b-p-(HPMA-Bz), (B) mPEG-b-p-(HPMA-B $z_{(70)}$ -co-PDTEMA<sub>(30)</sub>) e (C) mPEG-b-p-(PDTEMA). I polimeri sono stati caratterizzati in termini di massa molecolare media numerica (Mn) tramite cromatografia a permeazione di gel (GPC) ed il risultato verificato tramite una tecnica basata sull'analisi H-RMN del polimero, e poi in termini di massa molecolare media ponderale (Mw) e quindi indice di polidispersità tramite GPC, temperatura di degradazione tramite analisi termogravimetrica (TGA) e temperatura di fusione tramite analisi calorimetrica differenziale (DSC). La massa molecolare medio numerica dei polimeri è risultata essere compresa tra gli 8500 e i 18500 g/mol, l'indice di polidispersità passa dal valore di 1.2 per (A) a 1.75 per (B) a 2.3 per (C), la temperatura di degradazione risulta essere circa 150-155°C per tutti i polimeri, mentre la temperatura di fusione è risultata essere compresa tra i 51 e i 57°C.

Le micelle polimeriche sintetizzate a partire dai tre polimeri sono state prodotte tramite metodo di nanoprecipitazione, e con lo stesso metodo sono state prodotte micelle caricate di farmaco. Le micelle prodotte sono state caratterizzate in termini di dimensioni e stabilità

dimensionale nel tempo tramite analisi DLS (Dynamic light scattering) in due differenti soluzioni: una soluzione tampone simulante le condizioni del sistema sanguigno circolatorio (PBS: pH=7.4 e T=37°C) e una soluzione tampone simulante un ambiente riducente (Soluzione 10mM di DTT in PBS e T=37°C). Le dimensioni delle particelle oscillano in un range di 40-60nm e sono risultate stabili nelle soluzioni usate per il tempo di una settimana. Le micelle cariche di principio attivo caratterizzate in di efficienza sono state termini dell'incapsulamento e della capacità di carico nonché in termini di rilascio nel tempo tramite analisi UHPLC (Ultra high performance liquid chromatography) anche in questo caso usando le due soluzioni sopracitate. Dall'analisi è risultato che l'efficienza di incapsulamento oscilla da un valore minimo dell'87% per le micelle di tipo (C), passando al 93% delle micelle di tipo (A) per arrivare al 96% delle micelle di tipo (B), mentre la capacità di carico è per tutte circa il 9%. Infine, dallo studio del rilascio è risultato che le micelle di tipo (A) e di tipo (C) hanno un rapido rilascio nelle prime 6 ore, ma, mentre per le micelle di tipo (A) dopo le prime 24 ore il rilascio si è assestato intorno al 40-50% per poi continuare gradualmente ad aumentare fino al 60% circa al quinto giorno, per le micelle di tipo (C) alla soglia delle 24 ore, il rilascio è risultato essere quasi completo, inoltre per le micelle di tipo (A) e (C) non si presenta una sostanziale differenza, in termini di rilascio, tra soluzione con mezzo riducente e soluzione tampone standard.

Diverso è il risultato ottenuto per le micelle di tipo (B), che non presentano un rilascio iniziale marcato, bensì un rilascio graduale nel tempo che si assesta dopo 5 giorni ad un valore del 60% in soluzione tampone standard, mentre supera l'80% nella soluzione con mezzo riducente.

In conclusione, tutte le micelle nanoscopiche risultano avere una buona stabilità in condizioni fisiologiche, inoltre, tutte le micelle presentano una elevata capacità di carico ed un'alta efficienza di incapsulamento del farmaco. Nonostante ciò, solo le micelle di tipo (B) hanno presentato un comportamento apprezzabilmente differente, in termini di rilascio, nelle due soluzioni (riducente e non) e questo potrebbe essere riconducibile al forte impilamento  $\pi$ - $\pi$  dell'HPMA e alla simultanea presenza dell'impilamento  $\pi$ - $\pi$  e del ponte disolfuro dovuto al PDTEMA, entrambi presenti nel polimero di tipo (B).

#### Abstract

In recent years, a lot of attention has been devoted to stimuli-sensitive drug delivery systems. Generally, tumour tissue and intracellular compartment are highly reductive than normal tissues and extracellular matrix respectively, thus making redox sensitive drug delivery systems promising carriers for development of controlled release formulations. The aim of this dissertation is to develop redox sensitive polymeric micelles based on mPEG-HPMA-Bz copolymers by introducing PDTEMA as the reduction sensitive monomer. The polymers were synthesized using N-(2-benzoyloxypropyl) methacrylamide (HPMA-Bz), N-[2-(2-pyridyldithio)ethyl]methacrylamide (PDTEMA) and (mPEG)<sub>2</sub>-ABCPA as the macroinitiator via free radical polymerization. Both monomers can stabilize the micelles using  $\pi$ - $\pi$  stacking while PDTEMA provides also disulphide bound which is sensitive to redox environment. The monomers were synthesized as reported in literature, and the molecular chemical structures were verified by nuclear magnetic resonance spectroscopy (H-NMR analysis). Three polymers, (A) mPEG-*b*-p-(HPMA-Bz), (B) mPEG-*b*-p-(HPMA-Bz<sub>(70%)</sub>-co-PDTEMA<sub>(30%)</sub>) and (C) mPEG-*b*-p-(PDTEMA) were synthesized simply by changing the feed ratio of the monomers at constant 1:200 macrointiator/monomer ratio. The molecular weights ( $M_n$ ,  $M_w$ ) of the synthesized polymers were characterized by <sup>1</sup>H-NMR and gel permeation chromatography (GPC). Polymers were also characterized in terms of degradation temperature by thermogravimetric analysis (TGA) and in terms of melting temperature by differential calorimetric analysis (DSC). The  $M_n$  of the polymers were 18500, 11500 and 8500 g/mol with polydispersity index (PDI) of 1.2, 1.75 and 2.3 for (A) mPEG-*b*-p-(HPMA-Bz), (B) mPEG-*b*-p-(HPMA-Bz<sub>(70%)</sub>-co-PDTEMA<sub>(30%)</sub>) and (C) mPEG-*b*-p-(PDTEMA) polymers respectively.

Polymeric micelles were prepared via nanoprecipitation technique using THF as the organic solvent and HEPES-buffer as aqueous phase. The size and polydispersity of the micelles were determined by dynamic light scattering (DLS). Stability of micelles containing S-S bond was monitored incubating the micelles in both non-reductive (PBS pH=7.4 and T=37°C) and reductive phosphate buffer saline medium (PBS) containing 10mM dithiothreitol (DTT) at 37°C under physiological pH, so, micelles size over time was observed by DLS analysis.

Furthermore PTX-loaded micelles were prepared using 30mg of polymer and 3mg of Paclitaxel. The encapsulation efficacy (EE%) was around 90% for all the micelles with loading capacity (LC) of 9%. The effect of reductive environment on the stability of PTX loaded micelles was studied by determining the concentration of encapsulated PTX overtime. (C) mPEG-PDTEMA micelles showed higher PTX release at earlier timepoints, if compared with (A) mPEG-HPMA-Bz micelles, in the 10mM PBS medium. Also, (A) mPEG-PDTEMA micelles showed the highest release overtime compared to the other formulations. This

can be due to lower efficacy of  $\pi$ - $\pi$  stacking between PDTEMA and PTX compared to HPMA-Bz. A different behaviour was observed for (B) mPEG-b-p-(HPMA-Bz-co-PDTEMA) which has showed different release in the two solutions, higher in reductive environment and similar to type (A) micelles in normal PBS.

In conclusion, all nanoscopic micelles have a good stability in physiological conditions, also, all micelles present high EE and LC. Nevertheless, only type (B) micelles have an appreciable different behavior, in terms of release, in different environments (reductive or not) and that it's due to the strong  $\pi$ - $\pi$  stacking between the polymer's chains, and to the simultaneous presence of the disulfide bridge.

### References

- 1. Birbrair, A., et al., *Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2014. **307**(1): p. C25-C38.
- 2. Stedman, T.L., *Stedman's Medical Dictionary for the Health Professions and Nursing*. 2005: Lippincott Williams & Wilkins.
- 3. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary.* 2011: Elsevier Health Sciences.
- 4. Cooper, G.M., *Elements of Human Cancer*. 1992: Jones and Bartlett Publishers.
- 5. Jain, V., S. Jain, and S.C. Mahajan, *Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment*. Curr Drug Deliv, 2015. **12**(2): p. 177-91.
- 6. Corrie, P.G., *Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects.* Medicine, 2008. **36**(1): p. 24-28.
- 7. de Boer-Dennert, M., et al., Patient perceptions of the sideeffects of chemotherapy: The influence of 5HT3 antagonists. Vol. 76. 1997. 1055-61.
- 8. Jahn, P., et al., *Reduction of chemotherapy-induced anorexia, nausea, and emesis through a structured nursing intervention:* A cluster-randomized multicenter trial. Vol. 17. 2009. 1543-52.
- 9. Kim, S.C., et al., *In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy.* J Control Release, 2001. **72**(1-3): p. 191-202.
- 10. Lee, K.S., et al., *Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer.* Breast Cancer Research and Treatment, 2008. **108**(2): p. 241-250.
- 11. Program, N.T., *Report on Carcinogens (12th Ed.*). 2011: DIANE Publishing Company.

Pag. 58	Stimuli-Sensitive Micelles	Marco Iannone
12.	Maeda, H., <i>Tumor-selective delivery of macromo</i> via the EPR effect: background and future prospec	<i>lecular drugs</i> ets. Bioconjug
13.	Maeda, H., et al., <i>Tumor vascular permeability</i> effect in macromolecular therapeutics: a review Controlled Release 2000 <b>65</b> (1): p 271-284	<i>and the EPR</i> w. Journal of
14.	Gabizon, A.A., Stealth Liposomes and Tumor To Step Further in the Quest for the Magic Bullet. Cl Research, 2001, 7(2): p. 223-225.	<i>argeting: One</i> linical Cancer
15.	Owens, D.E., 3rd and N.A. Peppas, obiodistribution, and pharmacokinetics of nanoparticles. Int J Pharm, 2006. <b>307</b> (1): p. 93-10	Opsonization, polymeric )2.
16.	Lukyanov, A.N. and V.P. Torchilin, <i>Micelle derivatives of water-soluble polymers as deliver poorly soluble drugs</i> . Advanced Drug Delivery Re <b>56</b> (9): p. 1273-1289.	s from lipid y systems for eviews, 2004.
17.	Talelli, M., et al., <i>Core-crosslinked polymeric</i> controlled release of covalently entrapped Biomaterials 2010 <b>31</b> (30): p 7797-804	micelles with doxorubicin.
18.	Rijcken, C.J., et al., <i>Hydrolysable con</i> <i>thermosensitive polymeric micelles: synthesis, cha</i> <i>and in vivo studies.</i> Biomaterials, 2007. <b>28</b> (36): p.	e-crosslinked tracterisation 5581-93.
19.	Kim, T.Y., et al., <i>Phase I and pharmacoking</i> <i>Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micel</i> <i>paclitaxel, in patients with advanced malignancies</i> Res, 2004. <b>10</b> (11): p. 3708-16.	etic study of le-formulated s. Clin Cancer
20.	Kim, D.W., et al., <i>Multicenter phase II trial of G</i> novel Cremophor-free, polymeric micelle for paclitaxel, with cisplatin in patients with advance cell lung cancer. Ann Oncol, 2007. <b>18</b> (12): p. 200	enexol-PM, a rmulation of ed non-small- 19-14.
21.	Matsumura, Y. and K. Kataoka, <i>Preclinical and cloof anticancer agent-incorporating polymer mic</i> Sci, 2009. <b>100</b> (4); p. 572-9.	<i>linical studies</i> elles. Cancer
22.	Mi, P., et al., Hydrothermally synthesized PEGy phosphate nanoparticles incorporating Gd-DTPA enhanced MRI diagnosis of solid tumors. J Con 2014. <b>174</b> : p. 63-71.	lated calcium A for contrast htrol Release,
23.	Shi, Y., et al., Complete Regression of Xenograft Targeted Delivery of Paclitaxel via $\Pi$ - $\Pi$ Stacki Polymeric Micelles. ACS Nano, 2015. <b>9</b> (4): p. 374	<i>Tumors upon</i> <i>ing Stabilized</i> 40-3752.

24.	Song, B., et al., <i>The introduction of pi-pi stacking moieties for fabricating stable micellar structure: formation and dynamics of disklike micelles.</i> Angew Chem Int Ed Engl, 2005. <b>44</b> (30): p. 4731-5.
25.	Talelli, M. and W.E. Hennink, <i>Thermosensitive polymeric micelles for targeted drug delivery</i> . Nanomedicine, 2011. <b>6</b> (7): p. 1245-1255.
26.	Li, Y., et al., <i>Well-defined, reversible disulfide cross-linked micelles for on-demand paclitaxel delivery.</i> Biomaterials, 2011. <b>32</b> (27): p. 6633-6645.
27.	Shi, Y., et al., $\Pi$ – $\Pi$ Stacking Increases the Stability and Loading Capacity of Thermosensitive Polymeric Micelles for Chemotherapeutic Drugs. Vol. 14. 2013. 1826–1837.
28.	Shuai, X., et al., <i>Core-Cross-Linked Polymeric Micelles as</i> <i>Paclitaxel Carriers</i> . Bioconjugate Chemistry, 2004. <b>15</b> (3): p. 441-448.
29.	van Nostrum, C.F., <i>Covalently cross-linked amphiphilic block copolymer micelles</i> . Soft Matter, 2011. <b>7</b> (7): p. 3246-3259.
30.	Gilbert, H.F., [2] Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability, in Methods in Enzymology. 1995, Academic Press. p. 8-28.
31.	Zelikin, A.N., Q. Li, and F. Caruso, <i>Disulfide-stabilized poly</i> ( <i>methacrylic acid</i> ) capsules: formation, cross-linking, and degradation behavior. Chemistry of materials, 2008. <b>20</b> (8): p. 2655-2661.
32.	Zelikin, A.N., et al., <i>A general approach for DNA encapsulation</i> <i>in degradable polymer microcapsules</i> . ACS nano, 2007. <b>1</b> (1): p. 63-69.
33.	Kirpotin, D., et al., <i>Liposomes with detachable polymer coating:</i> <i>destabilization and fusion of dioleoylphosphatidylethanolamine</i> <i>vesicles triggered by cleavage of surface-grafted poly(ethylene</i> <i>glycol).</i> FEBS Lett, 1996. <b>388</b> (2-3): p. 115-8.
34.	Meng, F., W.E. Hennink, and Z. Zhong, <i>Reduction-sensitive</i> polymers and bioconjugates for biomedical applications. Biomaterials, 2009, <b>30</b> (12): p. 2180-98.
35.	Samadi, N., Biodegradable Nanoparticles Based on Aliphatic Polyesters; Towards Targeted Intracellular Delivery of Protein Therapeutics. 2014, Utrecht University.

Pag. 60	Stimuli-Sensitive Micelles Marco Iannone
36.	Betancourt, T., et al., <i>PEGylation strategies for active targeting</i> of <i>PLA/PLGA nanoparticles</i> . J Biomed Mater Res A, 2009.
	<b>91</b> (1): p. 263-76.
37.	Maccari, L., et al., 3D QSAR studies for the $\beta$ -tubulin binding
	site of microtubule-stabilizing anticancer agents (MSAAs): A
	pseudoreceptor model for taxanes based on the experimental
	structure of tubulin. Il Farmaco, 2003. 58(9): p. 659-668.
38.	Weaver, B.A., How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Mol Biol
	Cell, 2014. <b>25</b> (18): p. 2677-81.
39.	Foye, W.O., T.L. Lemke, and D.A. Williams, <i>Foye's Principles</i>
	of Medicinal Chemistry. 2008: Lippincott Williams & Wilkins.
40.	Shi, Y., et al., $\Pi$ – $\Pi$ Stacking Increases the Stability and Loading
	Capacity of Thermosensitive Polymeric Micelles for
	Chemotherapeutic Drugs. Biomacromolecules, 2013. 14(6): p.
	1826-1837.
41.	Novo, L., et al., Decationized crosslinked polyplexes for redox-
	triggered gene delivery. Journal of Controlled Release, 2013.
	<b>169</b> (3): p. 246-256.
42.	Zugates, G.T., et al., Synthesis of $Poly(\beta-amino ester)s$ with
	Thiol-Reactive Side Chains for DNA Delivery. Journal of the
	American Chemical Society, 2006. <b>128</b> (39): p. 12726-12734.
43.	Bagheri, M., et al., Effect of Formulation and Processing
	Parameters on the Size of mPEG-b-p(HPMA-Bz) Polymeric
	Micelles. Langmuir, 2018. 34(50): p. 15495-15506.
44.	Naksuriya, O., et al., HPMA-based polymeric micelles for
	curcumin solubilization and inhibition of cancer cell growth.
	European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,
	2015. <b>94</b> : p. 501-512.
45.	Konno, T., J. Watanabe, and K. Ishihara, <i>Enhanced solubility of</i>
	paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-
	methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. Journal of
	Biomedical Materials Research Part A, 2003. 65A(2): p. 209-
	214.
46.	Mar, G.N.L., W.D. Horrocks, and R.H. Holm, NMR of
	Paramagnetic Molecules: Principles and Applications. 2016:
	Elsevier Science.
47.	Thomas, L.C., Modulated DSC® Paper# 1 Why Modulated
	DSC®?; An Overview and Summary of Advantages and
	Disadvantages Relative to Traditional DSC.
48.	Thomas, L.C., Modulated DSC® Paper# 3 Modulated DSC®
	Basics: Optimization of MDSC® Experimental Conditions

49.	Thomas, L.C., Modulated DSC® Paper# 5 Measurement of
	Glass Transitions and Enthalpic Recovery. New Castle (DE):
	TA Instruments, 2005.

50. Bhattacharjee, S., *DLS and zeta potential - What they are and what they are not?* J Control Release, 2016. **235**: p. 337-351.

Ai miei genitori, a loro devo tutto.