

DRUG DELIVERY E INCAPSULAMENTO CELLULARE: MATERIALI, DISPOSITIVI, MECCANISMI DI RILASCIO E INTERAZIONE CON LE CELLULE

Ilaria Cacciotti

Dipartimento di Ingegneria, Università degli Studi Niccolò Cusano, Roma

Drug delivery

Il *drug delivery* consiste nella somministrazione di farmaci, biomolecole e fattori di crescita (*growth factor*) tramite l'impianto o l'iniezione di Sistemi a Rilascio Controllato (SRC) (1).

Lo scopo finale del *drug delivery* è rappresentato dal superare i limiti della somministrazione tradizionale, quali:

- distribuzione del farmaco in tutto il corpo del paziente in maniera incontrollata attraverso il circolo sanguigno;
- limitata possibilità di rilascio diretto in ambiente fisiologico di farmaci a emivita bassa (necessità di trattamenti ripetuti per poter mantenere un adeguato livello terapeutico);
- degradazione di molti principi attivi durante l'attraversamento del tratto gastro-intestinale;
- inadeguato assorbimento del farmaco in quantità tali da risultare efficace;
- trattamenti terapeutici lunghi;
- concentrazione del farmaco con tipico andamento pulsato ("a dente di sega"), con indesiderate punte di massimo al di sopra della soglia tossica (sovradosaggio), e gole di minimo al sotto della concentrazione minima efficace, dovuta a reiterazione del trattamento (Figura 1a).

I sistemi a rilascio controllato devono, infatti, garantire:

- di agire come veicolo delle molecole verso il sito d'azione nella loro forma attiva, preservandole dalla deattivazione e denaturazione;
- l'incremento della solubilità di farmaci poco solubili;
- un rilascio uniforme con andamento prevedibile sia nello spazio che nel tempo;
- la possibilità di rilascio localizzato al sito bersaglio, con incremento dell'efficienza del farmaco;
- il mantenimento di una concentrazione ematica del principio attivo all'interno della "finestra terapeutica" per un tempo prolungato (Figura 1b).

In tale modo i sistemi a rilascio controllato consentono di ridurre la dose di farmaco da somministrare e la frequenza di somministrazione, prevenendo/limitando i relativi effetti collaterali.

Lo sviluppo e la messa a punto di sistemi alternativi per l'indirizzamento dei farmaci nell'organismo richiedono di tenere conto simultaneamente di diversi aspetti:

- materiale,
- meccanismo di rilascio,
- geometria e dimensioni,
- quantità di farmaco.

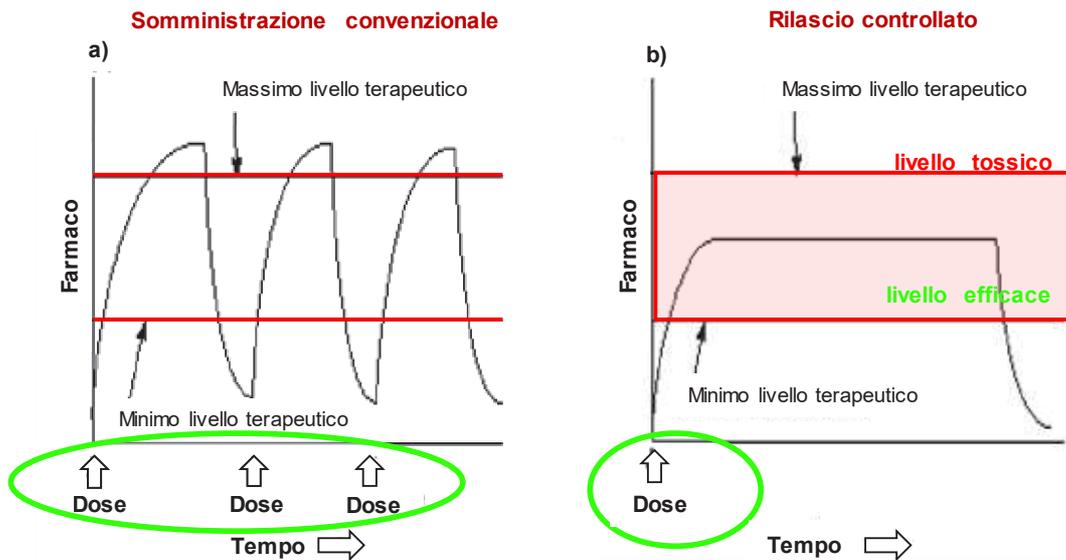


Figura 1. Andamento della concentrazione del farmaco nel caso di una somministrazione convenzionale (a) e di un sistema a rilascio controllato (b)

Un sistema ideale deve soddisfare i seguenti prerequisiti:

- essere biocompatibile,
- essere semplice da impiantare, somministrare e rimuovere,
- essere capace di contenere elevate quantità di farmaco,
- essere facilmente fabbricabile e sterilizzabile.

Si possono seguire due strategie distinte per il trasporto dei farmaci/*growth factors*, in maniera tale che possano essere resi disponibili alle cellule che entrano in contatto con la matrice:

1. immobilizzazione chimica all'interno di una matrice polimerica (approccio covalente): immobilizzazione covalente dei fattori di crescita (o molecole che ne mimano il funzionamento) alla matrice;
2. incapsulamento fisico all'interno di una membrana polimerica (approccio non covalente): adsorbimento fisico dovuto a legami a idrogeno o a interazioni idrofobiche con molecole eccipienti.

Entrambi questi approcci si basano sulla diffusione e sul rilascio programmato nel tessuto circostante, con conseguente elevato livello di controllo sulla distribuzione del segnale, dato che allo *scaffold* sono legate anche le cellule bersaglio.

L'approccio covalente (strategia 1) prevede la formazione di un legame chimico tra il farmaco/fattore di crescita e i polimeri tramite gruppi funzionali precedentemente incorporati durante il processo di copolimerizzazione o tramite trattamenti chimici o fisici. Tale tipo di strategia permette ai fattori legati alla matrice di degradarsi molto più lentamente, consentendo un rilascio prolungato. L'immobilizzazione chimica presenta, però, dei limiti: difficoltà nell'assegnazione del sito di accoppiamento sulla proteina e possibile perdita di bioattività delle proteine a causa dell'immobilizzazione o del danneggiamento dei gruppi funzionali.

L'approccio non covalente (strategia 2) o adsorbimento fisico sfrutta in genere le seguenti interazioni:

- interazioni secondarie dipolo-dipolo o legami idrogeno tra farmaco/fattore di crescita e matrici;
- interazioni indirette attraverso proteine intermedie o altre molecole biologiche: proteine come eparina, fibronectina, gelatina e piccoli oligopeptidi possono essere rivestite chimicamente o fisicamente per fornire siti specifici per immobilizzare i fattori di crescita o morfogeni.

I materiali comunemente utilizzati per questo approccio sono essenzialmente gel biopolimerici, quali fibronectina, laminina, collagene, elastina, acido ialuronico, o una varietà di idrogeli sintetici, per la loro proprietà di riprodurre la membrana extracellulare.

Le possibili cinetiche di rilascio sono riportate in Figura 2, dove è possibile identificare i seguenti profili, tra i quali, i primi due sono quelli più comuni:

- profilo I, rilascio convenzionale, ritardato, non costante;
- profilo II, rilascio di ordine zero: la concentrazione è mantenuta al livello ottimale per gli effetti terapeutici;
- profilo III, rilascio ritardato seguito da rilascio costante: utile per il rilascio di agenti attivi che devono svolgere la loro azione durante la notte;
- profilo IV, rilascio impulsivo ritardato: valido per un'azione notturna (es. per un ormone, la cui somministrazione deve essere effettuata una singola volta e non in modo graduale);
- profilo V, rilascio impulsivo periodico: per somministrazioni che vanno effettuate a distanze temporali costanti.

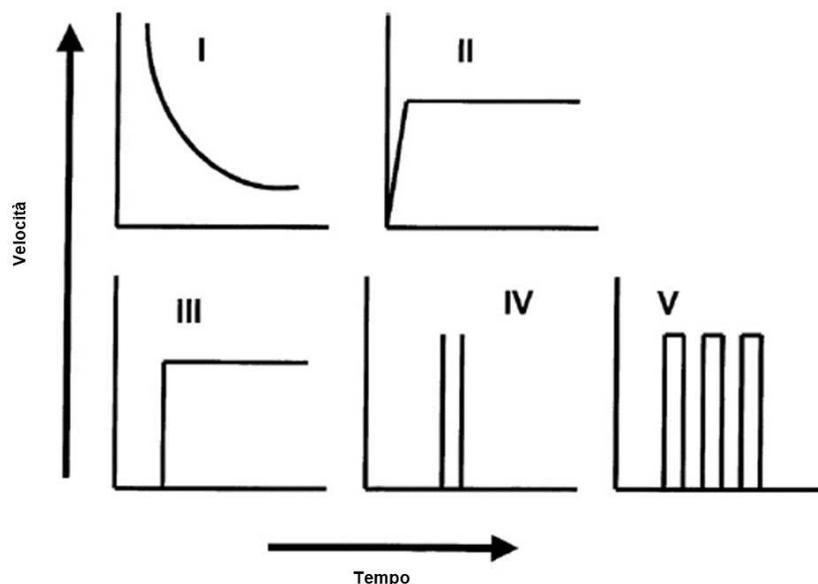


Figura 2. Possibili profili relativi alle diverse cinetiche di rilascio

Sistemi a rilascio controllato

Nel design di un sistema a rilascio controllato è possibile ottenere un *targeting* passivo o attivo (2).

Nel caso di un *targeting* passivo, la particella usata come veicolo non viene modificata in maniera tale da renderla selettiva per un bersaglio (*target*) specifico, ma usata tal quale.

Il *targeting* passivo è di solito effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (*Enhanced Permeability and Retention*, EPR) e sfrutta la tendenza naturale delle particelle ad accumularsi in alcune parti del corpo, in particolare nei tumori o nei tessuti infiammati che possiedono ipervascolarizzazione (endotelio attorno ai vasi sanguigni nel tumore è spesso molto discontinuo e permette così il passaggio di grandi particolati) e scarso drenaggio linfatico (mancanza di rimozione dei particolati) (3).

Nel caso di *targeting* attivo, le particelle veicolo vengono funzionalizzate sulla superficie con agenti specifici, detti di *target*, selettivi per specifici organi/cellule bersaglio.

Il *targeting* attivo garantisce notevoli vantaggi, quali:

- possibilità di far legare le nanoparticelle solo a siti specifici delle cellule malate;
- massimizzazione della concentrazione di farmaco sul sito d'interesse, così da ridurre la distribuzione in altre parti del corpo e, di conseguenza, contenere e evitare i relativi effetti collaterali.

Per ottenere un *target* attivo è possibile seguire diversi approcci:

- alterare la carica superficiale delle nanoparticelle;
- incorporare nanoparticelle magnetiche nella matrice polimerica;
- legare sulla superficie della nanoparticella un agente che interagisce con recettori specifici o che viene riconosciuto dai tumori stessi (es. peptidi, proteine, oligonucleotidi, anticorpi monoclonali).

Tra questi approcci, il terzo risulta il più diffuso e utilizzato, essendo possibile legare molecole specifiche sulla superficie mediante:

- legame covalente sfruttando gruppi funzionali superficiali (per esempio, reazione di *coupling* tra un acido carbossilico e un'ammina, gruppi in genere abbondanti su proteine e peptidi) (modalità più comune);
- interazione elettrostatica.

I "sistemi" di trasporto possono essere classificati secondo diversi criteri (4). A seconda del meccanismo che regola il rilascio del farmaco, sono classificati in sistemi:

- 1) a diffusione controllata mediante:
 - a) serbatoio (sistemi a membrana)
 - b) matrice (sistemi monolitici)
- 2) controllati chimicamente, nello specifico:
 - a) bioerodibili e biodegradabili
 - b) a catena pendente
- 3) attivati da solvente, vale a dire:
 - a) sistemi controllati osmoliticamente
 - b) sistemi controllati mediante rigonfiamento
- 4) sistemi a rilascio modulato.

Il meccanismo di rilascio maggiormente utilizzato si basa sulla diffusione, come schematizzato.

I sistemi a diffusione controllata sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, che subirà biodegradazione una volta assolto il proprio compito e si possono suddividere in due sottocategorie: sistemi a serbatoio e sistemi monolitici (mediante matrice).

I sistemi a serbatoio sono sistemi cavi in cui un nucleo interno di farmaco è circondato da una membrana polimerica esterna, comunemente a base di idrogel, che, rigonfiandosi, apre le porosità e rilascia il farmaco. Il trasporto avviene tipicamente secondo meccanismi di diffusione, con

cinetica tipicamente di ordine zero finché il farmaco è in alta concentrazione all'interno della membrana.

I sistemi monolitici (mediante matrice) sono sistemi in cui il farmaco è dissolto (o disperso) uniformemente in una matrice polimerica e viene rilasciato per rigonfiamento dell'intero sistema grazie all'apertura dei canali delle porosità. Tali sistemi presentano una cinetica di rilascio di primo ordine, in cui si ha un alto tasso di diffusione all'inizio, che poi decresce nel tempo.

Nel caso dei sistemi controllati chimicamente il rilascio ha luogo in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada a causa della presenza di legami labili idroliticamente o enzimaticamente, che coinvolgono o la superficie o il *bulk*.

Tale meccanismo di rilascio viene definito erosione: per i materiali bioerodibili la cinetica di rilascio dipende dall'erosione (degradazione chimica o biochimica) che avviene in massa (*bulk*) per i polimeri idrofili o in superficie per quelli idrofobi.

Tali sistemi possono essere suddivisi in due diverse tipologie:

a) bioerodibili e biodegradabili:

- si evita la necessità di una rimozione chirurgica ma i prodotti di degradazione non dovranno provocare reazioni tossiche o cancerogene, condizione abbastanza difficile da raggiungere.

b) a catena pendente:

- la molecola del farmaco è legata chimicamente al polimero e viene rilasciata da una scissione idrolitica o enzimatica;
- la velocità di rilascio è legata alla velocità con cui i legami vengono rotti dall'azione dell'acqua o delle proteine, consentendo al farmaco di agire su uno specifico tipo di cellule o tessuti.

I sistemi attivati dal solvente presentano un comportamento tipico di idrogeli (macromolecole a struttura reticolata create in modo da formare una maglia aggrovigliata che svolge il ruolo di matrice per l'intrappolamento di farmaci).

Quando questi idrogeli vengono a contatto con un solvente compatibile termodinamicamente, le catene polimeriche si rilassano (specialmente quando la temperatura di transizione vetrosa è inferiore a quella dell'ambiente circostante), permettendo un flusso di acqua verso l'interno e la diffusione verso l'esterno del farmaco.

Nei sistemi a rilascio modulato il rilascio è controllato da stimoli esterni quali temperatura, pH, campi elettrici, campi magnetici, radiazione elettromagnetica, raggi UV, ecc.

Si possono identificare diverse tipologie di sistemi per il rilascio controllato (5).

Le ciclodestrine consistono in oligosaccaridi ciclici naturali formati da 6, 7 o 8 monomeri di glucosio (zucchero) e si organizzano in maniera tale da ottenere strutture anfifiliche e da incapsulare all'interno il farmaco.

I dendrimeri consistono in polimeri sintetici altamente ramificati con un'architettura a strati costituita da tre parti: un nucleo (*core*) polifunzionale, delle unità ramificanti e i gruppi funzionali superficiali, che ne determinano le caratteristiche.

Tali sistemi sono prodotti attraverso condensazioni ripetitive della stessa unità ramificata, al fine di originare strutture altamente regolari e complesse.

Per la loro sintesi, vengono fatti reagire una diammina (comunemente etilendiammina) con acrilato di metile. La loro formazione parte da un *core* centrale che fa da centro di nucleazione e le ramificazioni che partono da un unico ramo ancestrale formano una struttura definita dendrone. Ogni ramificazione successiva è detta generazione.

Le vescicole o miscele sono composte da lipidi o molecole anfifiliche, che si auto-assemblano formando delle vescicole con un *core* idrofobico, ispirandosi alla struttura delle membrane

cellulare o plasmatica, consistente in un doppio strato fosfolipidico. Per anfifilico si intende, infatti, una sostanza con una porzione polare idrofila (lipofoba) e apolare idrofoba (lipofila), che quindi sia in grado di auto-organizzarsi in soluzione acquosa diluita o di interagire all'interfaccia fra le fasi acquosa e non acquosa di un sistema bifasico. Sono comunemente utilizzate per trasportare numerose tipologie di farmaci lipofili.

Un copolimero, come noto, si ottiene dalla polimerizzazione simultanea di due o più monomeri con la formazione di legami covalenti tra le unità monomeriche diverse (o sequenze di unità diverse) a formare l'unità ripetitiva o costitutiva caratteristica.

I copolimeri a blocchi sono caratterizzati da una struttura in cui una sequenza di un tipo di monomero è alternata con una sequenza dell'altro monomero come, per esempio:

AAAAABBBBBBBBAAAAABBBBBBBBAAAAA

indicando con A e B due monomeri diversi.

I liposomi consistono in vescicole fosfolipidiche (50–100 nm) che si generano attraverso il *self assembly* di lipidi anfifilici che formano un *bilayer* basato su interazioni idrofobiche che avvengono in parallelo lungo una superficie continua, con le teste idrofiliche disposte sul versante acquoso. In genere, sono utilizzati come *carriers* in cui le molecole idrofiliche sono incapsulate nella fase acquosa interna, mentre le molecole idrofobiche trasportate nel *bilayer* lipidico.

I polimersomi presentano struttura e applicazioni simili ai liposomi, consistendo in liposomi composti da polimeri.

I sistemi a matrice consistono in sistemi in cui il farmaco è distribuito uniformemente nel polimero e si distinguono in:

- a) matrici (propriamente dette)
- b) sfere (nano e microsfele)

Le matrici (propriamente dette) sono sistemi costituiti dalla dispersione uniforme del farmaco nel polimero e si possono distinguere, in funzione del polimero impiegato, in matrici idrofobe e matrici idrofile, e, in funzione della tecnologia impiegata, in matrici omogenee (o non porose) e matrici eterogenee (o porose).

Le matrici presentano diversi vantaggi, essendo:

- facili da preparare
- versatili
- non pericolose
- poco costose
- possibilità di modulare e controllare il rilascio
- adatte a tutti i farmaci purché solidi.

Tale tipologia di SRC, però, non consente di incorporare farmaci liquidi o gassosi.

Per tutti questi motivi, le matrici propriamente dette sono impiegate per applicazioni:

- via orale (matrici idrofobe, matrici idrofile, matrici rivestite);
- via transdermica;
- via transmucosale;
- via sottocutanea.

Le matrici idrofile sono, in genere, sistemi porosi ottenuti per compressione di una polvere o di un granulato costituiti dal farmaco, dal polimero (spesso derivati idrofili della cellulosa) e da eventuali altri eccipienti dispersi uniformemente.

Il rilascio del farmaco dalle matrici idrofile può avvenire secondo diverse modalità:

- diffusione del farmaco;
- degradazione del polimero;

- rigonfiamento del polimero.

Il rilascio del farmaco e la velocità di rilascio da matrici idrofile possono essere influenzati da:

- rapporto farmaco/polimero,
- porosità del sistema,
- caratteristiche del farmaco,
- caratteristiche del polimero,
- dimensioni delle particelle del polimero e del farmaco,
- viscosità del gel che si forma in seguito a idratazione del polimero,
- presenza di eccipienti.

In particolare, si osservano comportamenti diversi a seconda della tipologia di farmaco, del suo grado di solubilità e dimensioni, come riportato in dettaglio di seguito:

- farmaci solubili e/o di piccole dimensioni vengono più facilmente rilasciati per diffusione attraverso il polimero gelificato;
- farmaci di grandi dimensioni e/o meno solubili possono essere rilasciati in seguito all'erosione o al rigonfiamento del polimero in funzione della velocità dei due processi;
- polimeri ad alto peso molecolare o con elevato grado di reticolazione gelificano e si erodono molto lentamente nel tempo e spesso in funzione anche delle caratteristiche del farmaco permettono un controllo del rigonfiamento o dell'erosione sul rilascio.

La velocità di rilascio da matrici difficilmente è costante:

1. se il rilascio è controllato dalla diffusione diminuisce nel tempo;
2. se il rilascio è controllato dall'erosione o dal rigonfiamento del polimero è costante solo se la geometria è piana;
3. se il rilascio è controllato da due meccanismi non è costante.

Per regolarizzare la velocità di rilascio da sistemi a matrice sono stati proposti alcuni approcci: la modificazione della geometria del sistema o l'impiego di additivi.

Per quanto riguarda invece le matrici idrofobe, queste consistono in sistemi omogenei ottenuti o per evaporazione del solvente da una soluzione contenente farmaco e polimero oppure per fusione del polimero e incorporazione allo stato fuso del farmaco seguita da raffreddamento.

Il rilascio del farmaco dalle matrici idrofobe avviene in genere per diffusione del farmaco attraverso il polimero; se il polimero è biodegradabile il rilascio da una matrice idrofoba potrebbe essere controllato o dalla diffusione del farmaco o dalla degradazione polimerica o da entrambi i meccanismi. In genere: i farmaci solubili e/o di piccole dimensioni vengono più facilmente rilasciati per diffusione attraverso il polimero, mentre farmaci di grandi dimensioni e/o poco solubili possono essere rilasciati solo in seguito all'erosione superficiale della matrice.

Il meccanismo di rilascio del farmaco potrebbe essere condizionato anche dalle caratteristiche strutturali del polimero, quali: il peso molecolare, il grado di reticolazione e la velocità di degradazione.

Le sfere consistono in particelle sferiche con dimensioni macro (cioè maggiore di 1mm), micro (100- 0,1 μm), nano (100 – 1 nm), nelle quali il farmaco è uniformemente distribuito nella fase polimerica (sistema a matrice).

Il rilascio del farmaco può avvenire attraverso meccanismi diversi:

- diffusione del farmaco attraverso il polimero;
- desorbimento del farmaco;
- erosione della matrice (polimeri biodegradabili);
- rigonfiamento del polimero (polimeri idrofili).

I fattori che possono influenzare la velocità di rilascio del farmaco dalle microsfele si dividono in quelli inerenti al farmaco (dimensioni molecolari, idrofilia, quantità, distribuzione); in fattori

inerenti alle microsfere (tipo e quantità di polimero (PM, reticolazione), dimensioni, forma) e quelli relativi al mezzo (pH, presenza di enzimi).

I materiali da impiegare per la produzione di tali sistemi devono soddisfare i seguenti requisiti:

- presentare un comportamento anfifilico;
- essere non tossico;
- essere biocompatibile;
- essere biodegradabile;
- subire una degradazione controllata;
- rispondere a specifici stimoli (pH, T, solventi, luce, ecc.).

I materiali comunemente impiegati sono classificabili in:

- non-degradabili (per esempio, poliuretani (PU), polimetilmetacrilato (PMMA), polietilene (PE).
- biodegradabili (per esempio copolimeri di acido polilattico e poliglicolico, poliesteri, polianidridi, idrogeli).

I polisaccaridi presentano proprietà che li rendono utilizzabili in ambito biomedicale:

- biocompatibilità;
- non citotossicità;
- alta idrofilia;
- alto contenuto d'acqua;
- versatilità;
- presenza di un elevato numero di siti reattivi sulla catena polimerica;
- elevati gradi di caricamento di farmaco e di tipologie di coniugazione.

Proprio per tali caratteristiche, sono impiegati in ambito farmaceutico, cosmetico, alimentare, agricolo e biomedicale, per le seguenti applicazioni:

- biomateriali per ingegneria tissutale;
- come sistemi di *drug delivery*;
- come sistemi di *gene delivery*;
- biomateriali per la produzione di lenti a contatto;
- come rivestimenti per tessuti artificiali e dispositivi medici.

Gli idrogeli presentano diversi vantaggi, come riportato di seguito:

- struttura tridimensionale;
- proprietà idrofiliche;
- possono presentarsi in varie forme, come lastre, microparticelle, nanoparticelle, rivestimenti e pellicole;
- la loro struttura altamente porosa può essere facilmente regolata controllando la densità dei legami incrociati (*crosslinking*) nella matrice;
- biocompatibilità (elevato contenuto d'acqua e somiglianza fisicochimica, compositiva e meccanica con la matrice extracellulare nativa);
- biodegradabilità (per via enzimatica, idrolitica o ambientale (per esempio può essere dovuta al pH, alla temperatura, al campo elettrico));
- deformabilità (capacità di conformarsi alla superficie di applicazione);
- in alcuni casi proprietà “bioadesive”, vantaggiose nel momento in cui si richiede una loro immobilizzazione al sito di applicazione;
- elevata capacità di *loading*;
- elevata capacità di protezione delle biomolecole trasportate dalla degradazione metabolica cellulare;

- incremento della biodisponibilità dei farmaci a basso peso molecolare, nel caso della somministrazione per via orale;
- possibilità di intrappolare un *core* metallico o minerale per il bio *imaging*;
- rilascio dei farmaci inglobati secondo una cinetica dipendente dal coefficiente di diffusione della molecola all'interno della matrice stessa;
- capacità di mantenere un'elevata concentrazione locale di farmaco nei tessuti circostanti per un periodo prolungato.

Allo stesso tempo è possibile annoverare diverse criticità, quali:

- bassa resistenza alla trazione (problema non rilevante in alcune applicazioni di *drug delivery* come nei casi di applicazione sottocutanea);
- problemi di quantità e omogeneità di caricamento del farmaco nell'idrogel, in particolare nel caso di farmaci idrofobi;
- rilascio del farmaco troppo veloce (di qualche ora o qualche giorno), a causa dell'elevato contenuto d'acqua e grandi dimensioni dei pori;
- necessità di impianto chirurgico per alcuni idrogel non sufficientemente deformabili per essere iniettati.

Tali sistemi possono essere progettati in modo da renderli “smart”, cioè capaci di rispondere a cambiamenti dell'ambiente esterno per avere un controllo temporale e spaziale del rilascio del carico trasportato:

- sensibili alla temperatura
- complessanti
- sensibili a reazioni chimiche o enzimatiche
- sensibili a campi magnetici.

Attualmente sono in fase di studio sistemi multifunzionali, caratterizzati dalla presenza all'interno del materiale di cellule, farmaci, fattori di crescita e biomolecole con specifiche funzioni, come, per esempio, del plasma ricco di piastrine (PRP) (frazione di plasma sanguigno che contiene multipli fattori di crescita (utilizzabile da solo o con altri biomateriali)).

Tali materiali agiscono come *carrier* di biomolecole con attività specifiche (es. antiossidanti e antimicrobiche) di farmaci e fattori di crescita per ottenere una *delivery* controllato.

Si ricorre a diversi approcci: incapsulamento di uno o più elementi (*cues*) bioattivi simultaneamente all'interno dello *scaffold* (in forma di sfere, capsule, particelle, fibre, *coating*, ecc.) o fisi/chemi-sorbendolo sulla sua superficie (6-9).

Notevoli sforzi sono attualmente indirizzati alla modifica della superficie di *scaffold* al fine di indirizzare il differenziamento cellulare e di favorire la rigenerazione del tessuto, mediante la creazione di specifiche nanotopografie, ricorrendo a tecniche di *micropatterning*, quali fotolitografia per fabbricare *pattern* chimici o topografici, *microContact Printing* (μ CP) per fabbricare *pattern* chimici, *transfer lithography* per generare un *micropattern* in metallo (es. oro) su materiali polimeri (es. idrogeli in PEG, *PolyEthylene Glycol*).

Bibliografia

1. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation* 2012;2(1):2.
2. Dand N, Patel P, Ayre A, Kadam V. Polymeric micelles as a drug carrier for tumor targeting. *Chronicles of Young Scientists* 2013;4(2):94.

3. Ashfaq UA, Riaz M, Yasmeen E, Yousaf MZ. Recent advances in nanoparticle-based targeted drug-delivery systems against cancer and role of tumor microenvironment. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2017;34(4):317-53.
4. Siegel RA, Rathbone MJ. Overview of controlled release mechanisms. In Siepmann *et al.* (Eds). *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. Boston (MA): Springer; 2012. p. 19-43.
5. Muthu MS, Leong DT, Mei L, Feng SS. Nanotheranostics- application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. *Theranostics* 2014;4(6):660-77.
6. Cacciotti I, Ceci C, Bianco A, Pistrutto G. Neuro-differentiated Ntera2 cancer stem cells encapsulated in alginate beads: first evidence of biological functionality. *Materials Science and Engineering C* 2017;81:32-38.
7. Cacciotti I, Ciocci M, Di Giovanni E, Nanni F, Melino S. H₂S-releasing fibrous membranes: potential patches for stimulating the human stem cells proliferation and viability under oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;9(8):2368.
8. Cacciotti I, Chronopoulou L, Palocci C, Amalfitano A, Cantiani M, Cordaro M, Lajolo C, Callà C, Boninsegna A, Lucchetti D, Gallenzi, P, Sgamato A, Nocca G, Arcovito A. Controlled release of 18- β -glycyrrhetic acid by nanodelivery systems increases cytotoxicity on oral carcinoma cell line. *Nanotechnology* 2018;29(28):285101.
9. Ciocci M, Cacciotti I, Seliktar D, Melino S. Injectable silk fibroin-hydrogels functionalized with microspheres as adult stem cells-carrier systems. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018;108:960-971.