



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO: SCIENZE CHIMICHE

XXIII CICLO

NUOVI AGENTI PER LA TERAPIA FOTODINAMICA BASATI SU NANOSISTEMI

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Prof. Fabrizio Mancin

Dottorando: Francesco Selvestrel

31 Dicembre 2010

Riassunto

Questa tesi di dottorato si inserisce nel campo della nanomedicina e si occupa della realizzazione di nanovettori di silice per potenziali applicazioni nella terapia fotodinamica (PDT). Questo lavoro di tesi era inserito nel progetto Nanophoto, finanziato dalla comunità europea e a cui partecipano diversi gruppi di ricerca e imprese italiani ed europei.

Più in particolare, la tesi discute di una nuova procedura sintetica che consente di realizzare in un unico step nanoparticelle di silice organicamente modificata (ORMOSIL) ricoperte con un denso strato di PEG e caricate con molecole idrofobiche, tra cui fluorescenti e foto sensibilizzatori per la PDT. Grazie a questa procedura è possibile controllare il diametro delle nanoparticelle preparate in un intervallo tra 10 e 200 nm e la purificazione delle preparazioni è stata molto semplificata. Lo strato di PEG dei carrier è estremamente denso, tanto da rendere le nanoparticelle stabili contro l'aggregazione anche in mezzi salini ed in ambiente biologico, e da conferire loro notevoli abilità stealth (resistenza alla cattura da parte di cellule del sistema immunitario) sia in vitro che in vivo e da incrementare notevolmente l'accumulo nei tessuti tumorali in virtù dell'effetto EPR (Enhanced Permeation and Retention).

Il fotosensibilizzatore utilizzato in questo lavoro di tesi è la m-tetraidrossifenilclorina (mTHPC), già commercializzata come farmaco antitumorale e dermatologico e fornita dalla ditta Biolitec, che è coinvolta nel progetto Nanophoto. La speranza iniziale era quella di poter intrappolare fisicamente l'mTHPC nelle nanoparticelle senza necessità di modificarlo. Tuttavia studi effettuati nell'ambito del progetto e del mio lavoro di tesi hanno dimostrato che il fotosensibilizzatore viene rapidamente rimosso dalle nanoparticelle in presenza di proteine del siero. Neppure il coating di PEG, che sfavorisce l'interazione delle particelle con le proteine, è capace di arrestare la fuga dell'mTHPC. Il fotosensibilizzatore è stato quindi modificato chimicamente per consentirgli di ancorarsi covalentemente alla matrice della

nanoparticella. L'elaborato discute gli effetti della funzionalizzazione e del legame con la matrice silicea sulle caratteristiche dell' mTHPC.

La nuova procedura di sintesi messa a punto permette inoltre di introdurre dei gruppi funzionali nello strato di PEG contemporaneamente alla formazione delle particelle. Questi gruppi funzionali possono essere utilizzati per una successiva coniugazione con piccole molecole organiche, come acido folico e biotina, oppure per la bioconiugazione di anticorpi e altre biomolecole e ottenere così nanoparticelle direzionanti. Risultati particolarmente incoraggianti sono stati ottenuti in queste strategie di targeting attivo con anticorpi monoclonali come il D2B, specifico per l'antigene del tumore prostatico, e con ligandi di recettori sovraespressi dai tumori come l'EGF (Epidermal Growth Factor).

Abstract

This PhD thesis describes the development of silica nanocarriers that will be potentially useful in photodynamic therapy. The research described in this thesis was conducted within the Nanophoto project, a EU-funded collaborative effort to address the current limitations of photodynamic therapy through nanotechnology.

A new strategy for the one-step synthesis of highly PEGylated ORMOSIL silica nanoparticles doped with hydrophobic molecules for use as drug carriers is presented, in particular for PDT. Thanks to this procedure, size of prepared nanoparticles can be controlled in the range between 10 and 200 nm, and purification procedures are much simpler than those involved in current literature methods. The dense PEG layer makes the nanoparticles stable by aggregation in saline medium and in a biological environment and endows them at the same time with stealth properties (capture resistance from immunitary system cells) both *in vitro* and *in vivo*. As a consequence, the drug concentration in tumoral tissues is increased significantly by the EPR effect (Enhanced Permeability and Retention). The photosensitizer used in my thesis is meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC), anticancer and dermatological drug: its furniture was provided by Biolitec, one of the partner of the Nanophoto project. However, the PEG coating is not completely effective in preventing the release of the photosensitizer mTHPC in the presence of serum, a problem that hampered our previous attempts. The drug was then modified so that it could be covalently anchored to the nanoparticles, and the effects on its physical and chemical properties after derivatization and grafting to the silica matrix were investigated.

The new procedure also enables the introduction of functional groups on the PEG layer at the same time of nanoparticle's formation. These reactive moieties can be used for the subsequent conjugation of small organic molecules, such as folic acid or biotin, or the bioconjugation of antibodies and other biomolecules so as to obtain targeted nanoparticles. Encouraging results

were demonstrated in active targeting experiments with monoclonal antibodies, such as those for D2B, specific for prostatic tumoral antigen, and EGF (Epidermal Growth Factor).

Indice

RIASSUNTO	1
ABSTRACT.....	3
INDICE	5
PREFAZIONE: IL PROGETTO NANOPHOTO.....	9
1. INTRODUZIONE	11
1.1 Nanotecnologie	11
1.2 Nanomedicina.....	13
1.3 Drug Delivery	14
1.4 Terapia fotodinamica	16
1.4.1 Meccanismo di azione della PDT	17
1.4.2 Effetti biologici della PDT	19
1.4.3 Fotosensibilizzatori per la PDT.....	22
1.4.4 La meta-tetraidrossifenilclorina (mTHPC)	26
1.5 Nanoparticelle nel Drug Delivery	28
1.5.1 Nanoparticelle polimeriche	29
1.6 Nanoparticelle di silice	31
1.6.1 Principali metodi di sintesi.....	32
1.6.2 Nanoparticelle di silice in PDT	34
1.7 Targeting	39
1.7.1 Sistemi di targeting verso i tumori.....	43

1.7.2 Anticorpi	44
1.7.3 Acido Folico.....	45
1.7.4 Biotina	48
1.8 Tossicità	52
2. OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA.....	54
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	57
3.1.1 Sintesi di derivati trialcossilano di composti fluorescenti	57
3.1.2 Scelta del metodo di preparazione delle nanoparticelle.....	61
3.1.3 Caratterizzazione fotofisica delle nanoparticelle.....	62
3.2 Nanoparticelle PEGilate.....	64
3.2.1 Sintesi del precursore PEG-Si.....	64
3.2.2 Sintesi di PEG ₂₀₀₀ -NH ₂	65
3.2.3 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle PEGilate.....	67
3.3 Nanoparticelle per il targeting attivo.....	71
3.3.1 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle funzionalizzate con FOL- PEG ₂₀₀₀ -Si.....	75
3.3.2 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle con ammine libere.....	77
3.3.3 Sintesi di nanoparticelle con ammine libere.....	78
3.3.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle con ammine	80
3.4. Funzionalizzazione con piccole biomolecole.....	81
3.4.1 1Acido Folico	81
3.4.2 Biotina	82
3.4.3 Coniugazione con anticorpi	86
3.5 Studi di rilascio dell'mTHPC.....	88
3.6 Risultati biologici.....	94

4. CONCLUSIONI	105
5. PARTE SPERIMENTALE	109
5.1 Strumentazione.....	109
5.2 Solventi, soluzioni e prodotti commrciali.....	110
5.3 Sintesi dei precursori fluorescenti	112
5.3.1 Sintesi di N-(3-trietossisililpropil)-N'-[4-(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea (TPP-Si).....	112
5.3.2 Sintesi di N-butil-N'-[4-(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea (TPP-butile)	113
5.3.3 Sintesi IR755-Si.....	114
5.3.4 Sintesi di Cian678z-Si.....	115
5.3.5 Sintesi mTHPC-monoSi e mTHPC-tetraSi.....	116
5.4 Sintesi PEG₂₀₀₀-NH₂.....	117
5.4.1 Sintesi di PEG ₂₀₀₀ -tosilato	117
5.4.2 Sintesi di mPEG ₂₀₀₀ -ftalimmide	118
5.4.3 Sintesi di mPEG ₂₀₀₀ -NH ₂	119
5.5 Sintesi di mPEG₂₀₀₀-Si	120
5.6 Sintesi di NH₂-PEG₂₀₀₀-Si.....	121
5.7 Sintesi del derivato Fol-PEG₂₀₀₀-Si.....	123
5.7.1 Sintesi di BOC-NH-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂	123
5.7.2 Sintesi di BOC-NH-PEG ₂₀₀₀ -FOL.....	124
5.7.3 Sintesi di FOL-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂	125
5.7.4 Sintesi di FOL-PEG ₂₀₀₀ -Si.....	126
5.8 Sintesi delle nanoparticelle.....	128
5.8.1 Sintesi di nanoparticelle tipo Stöber.....	128
5.8.2 Sintesi di nanoparticelle tipo Prasad	129
5.8.3 Sintesi di nanoparticelle PEGilate	130

5.9 Sintesi di nanoparticelle biotinilate.....	132
5.9.1 Sintesi di biotina-OSu	132
5.9.2 Sintesi di nanoparticelle biotinilate	134
5.10 Sintesi di nanoparticelle con folato	136
5.10.1 Sintesi di folato-OSu	136
5.10.2 Sintesi di nanoparticelle coniugate con l'acido folico	137
5.11 Test.....	138
5.11.1 Test fluorescamina.....	138
5.11.2 Test HABA/Avidin.....	140
5.11.3 Test EZview TM Red Streptavidin Affinity Gel	140
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	143

Prefazione: il progetto Nanophoto

La ricerca scientifica sta alla base di ogni nuova tecnologia e non c'è campo in cui essa non abbia portato il suo contributo. L'importanza della ricerca di base è perciò evidente, basti pensare a quante ripercussioni positive ha introdotto nell'ultimo secolo, dal benessere quotidiano alla maggiore prospettiva di vita grazie al miracoloso progresso della medicina. Frequentare una scuola di dottorato non è che il primo passo e la prima occasione per dare un proprio contributo alla ricerca. Questo periodo si è rivelato molto impegnativo ma stimolante, perché ha richiesto di acquisire l'abilità nella risoluzione di problemi complessi offerti dal mio progetto, ma mi ha anche permesso di acquisire quotidianamente nuove competenze teoriche e pratiche.

Lo studio che ho sviluppato nell'arco di questi ultimi tre anni ha fatto parte di un progetto di ricerca molto più ampio, il progetto "Nanophoto", finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del VII programma quadro. Il programma ha come finalità generali lo studio e lo sviluppo di nuovi nanosistemi dopati con il Foscan® e coniugati con ligandi specifici per le cellule tumorali, al fine di aumentare l'efficacia e la selettività della terapia fotodinamica (PDT) e ottimizzare l'approccio della diagnosi dei tumori basato sull'Imaging di fluorescenza. L'impulso a questo progetto è dato dalla effettiva efficacia che il Foscan® presenta nella cura di alcune patologie tumorali tramite PDT, ma anche dal suo accumulo nelle aree sane dell'organismo a causa della scarsa capacità di discriminazione per i tessuti malati. Al fine di aumentare la selettività nei confronti delle cellule bersaglio della terapia, il progetto ha selezionato tre potenziali vettori per il farmaco, con differente natura chimica e coniugati con ligandi specifici per le cellule tumorali. I diversi sistemi selezionati hanno permesso di valutare con test *in vitro* e *in vivo* la loro differente abilità nel trasporto del farmaco e la compatibilità con i sistemi biologici. I ligandi specifici scelti dal progetto (acido folico e anticorpi monoclonali) trovano giustificazione nella

sovraespressione dei recettori nelle cellule malate, perciò possono condurre il farmaco ad un arricchimento selettivo attraverso un meccanismo attivo di riconoscimento del vettore da parte delle cellule bersaglio. Questo accumulo preferenziale nel tessuto tumorale consentirebbe anche di effettuare delle indagini diagnostiche, grazie all'emissione di fluorescenza del farmaco nella zona del rosso dello spettro visibile. I sistemi selezionati sono stati i liposomi, le nanoparticelle PLGA (*poly-lactide-co-glycolide*) e le nanoparticelle di silice. Per un programma di ricerca così ampio sono numerosi i gruppi di ricerca che hanno partecipato, ciascuno con le proprie competenze nello sviluppo di una parte del progetto. L'Università di Padova, oltre della coordinazione del progetto della Dott. Elena Reddi del Dipartimento di Biologia, si è occupata della sintesi e della caratterizzazione delle nanoparticelle di silice, oltre ai test *in vitro* per studi di tossicità e di internalizzazione dei nanovettori. Il Prof. Colombatti, presso l'Ateneo di Verona, si è invece concentrato sulla produzione di anticorpi e sulla loro coniugazione con i diversi nanosistemi. All'Università di Lubiana sono state sintetizzate dal Prof. Kos le nanoparticelle polimeriche PLGA, mentre della produzione dei liposomi si è interessata la Biolitec, nei suoi laboratori di Jena (Germania). Inoltre l'azienda farmaceutica ha fornito il farmaco per tutto il progetto. Gli studi *in vivo* sono stati eseguiti all'UCL di Londra dal Prof. MacRobert e hanno riguardato l'attività di PDT e la farmacocinetica, mentre a Groningen è stato assegnato lo studio dell'*imaging* di fluorescenza *in vivo*.

1. Introduzione

1.1 Nanotecnologie

“There’s plenty of room at the botton.”¹ Il premio Nobel Richard Feynman ha pronunciato queste parole nel 1959 davanti alla platea dell’*American Physical Society* riunitasi al Caltech (CA, USA). Durante questo storico discorso Feynman descriveva dei processi con i quali si sarebbe potuto operare su scala atomica e arrangiare gli atomi a piacimento, per ottenere dei materiali con proprietà originali. Da quel discorso nacque il concetto di nanoscienza, anche se si sono succedute diverse altre tappe prima che la disciplina cominciasse a svilupparsi: dalla scoperta del *Molecular Beam Epitaxy* nel 1969, fino alla nascita della Scienza dei *Cluster* negli anni ’80 contemporanea all’invenzione dell’STM (*Scanning Tunneling Microscopy*). Le scoperte di quegli anni diedero un forte impulso allo sviluppo della nanoscienza e delle nanotecnologie, che focalizzarono su di loro non solo l’interesse della comunità scientifica, ma anche dell’industria e della politica, poichè avanzarono nuove prospettive di sviluppo che resero partecipe l’intera opinione pubblica. Infatti, esaminando gli ultimi trent’anni, si osserva un aumento vertiginoso delle pubblicazioni scientifiche su temi nanotecnologici, ma si contano anche i primi prodotti commerciali con componenti nanotecnologiche. Dopo oltre vent’anni si era quindi concretizzato ciò che Feynman aveva prospettato, cioè la manipolazione della materia su scala nanometrica per ottenere nuovi materiali con proprietà differenti rispetto a quelle dello stesso materiale su scala maggiore. La nanotecnologia è quindi un nuovo campo di ricerca interdisciplinare, che taglia trasversalmente chimica, fisica e biologia ed è definita in diversi modi, ma nella sua accezione più generale è descritta come la progettazione, la caratterizzazione, la produzione e il controllo della materia su scala nanometrica, tipicamente tra 1 e 100 nm, per creare materiali con nuove funzioni e proprietà.² Per

nanoscienza invece si intende lo studio dei fenomeni che avvengono su scala nanometrica.

L'impatto delle nanotecnologie è stato tale da suggerire agli USA nel 2001 l'istituzione del *National Nanotechnology Initiative* (NII) allo scopo di coordinare i progetti federali in ricerca e sviluppo su studi di carattere nanotecnologico.

Quindi le nanotecnologie, dopo un periodo di gestazione durato vent'anni, hanno introdotto delle innovazioni in diverse discipline molto lontane tra loro, portando degli straordinari mutamenti soprattutto se consideriamo il breve lasso di tempo in cui sono avvenuti. Un primo chiaro esempio lo ritroviamo nell'evoluzione dell'elettronica, che oggi permette di eseguire velocemente calcoli molto complessi grazie alla costruzione di circuiti sempre più piccoli e potenti, ma molti altri esempi si possono presentare. Ciò è provato dal *National Nanotechnology Initiative* che nell'agosto del 2009 documentava 1015 linee di prodotti di consumo con contenuti nanotecnologici, con un giro d'affari di centinaia di miliardi di dollari, con la previsione che diventi di 3000 miliardi di dollari nel 2015.³ L'elenco comprende nuovi materiali impiegati quotidianamente per le più disparate applicazioni, dall'elettronica, alle automobili e alla salute. Oltre alle applicazioni che hanno già trovato uno sbocco commerciale, molte altre soluzioni sono state proposte che riguardano ogni campo della scienza e della tecnica, dall'ingegneria⁴ ai processi industriali,⁵ dall'energia e l'ambiente,⁶ ma anche per gli alimenti⁷ e per l'agricoltura,⁸ per i cosmetici⁹ e per il tessile,¹⁰ per la costruzione di nanomacchine¹¹ ma soprattutto per la medicina, dove l'avvento delle nanotecnologie ha prodotto un tale impatto da porre problematiche socio-economiche,¹² sociali¹³ e etiche.¹⁴ Ciò è dovuto alla particolarità del campo medico, la cui evoluzione influisce direttamente sulla popolazione e sulle sue aspettative. Ad esempio, considerando l'aumento delle prospettive di vita nei prossimi anni, sono state identificate delle patologie che avranno un peso socio-economico sempre maggiore e alle nanotecnologie è richiesto un aiuto per ricercare nuove soluzioni di cura e per migliorare la qualità della vita.¹⁵

1.2 Nanomedicina

Negli ultimi venticinque anni le nanotecnologie hanno assunto una importanza crescente in ambito medico-biologico, tanto da indurre nel 2000 il *National Institute of Health* (USA) a coniare il termine “nanomedicina”, che sta ad indicare tutte le applicazioni nanotecnologiche in campo medico-biologico.¹⁶ Rispetto alla nanomedicina si nutrono grandi aspettative, che sono supportate da una serie di fattori. In primo luogo un nanosistema sta sulla stessa scala di grandezza delle grandi biomolecole, come proteine e anticorpi, ma ha dimensioni inferiori rispetto a una struttura biologica, come una cellula. Un secondo aspetto riguarda l’elevatissimo rapporto tra area superficiale e volume di un nanomateriale, che può superare di diversi ordini di grandezza il solido macroscopico.¹⁷ Inoltre i materiali di dimensioni nanometriche presentano proprietà ottiche, elettroniche, magnetiche e biologiche del tutto nuove, che sono modificabili cambiando le dimensioni, la forma, la composizione chimica, le caratteristiche chimiche della superficie del nanosistema, creando strutture cave oppure solide.^{18,19} Perciò la nanotecnologia si presta all’applicazione in campo medico, progettando una serie potenzialmente infinita di nanosistemi, che possono essere utilizzati per trasportare agenti terapeutici o diagnostici attraverso le barriere biologiche, per favorire l’accesso alle molecole, per mediare le interazioni molecolari e rilevare con alta sensibilità e rendimento i cambiamenti molecolari. Queste proprietà sono incorporate nei nuovi nanosistemi, alcuni dei quali sono già stati approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) e altri sono in fase di sperimentazione clinica,²⁰ e riguardano il *drug delivery*, il *gene delivery*, gli agenti di contrasto, i dispositivi diagnostici e l’ingegneria tissutale.

Una delle sfide più importanti intraprese dalla nanomedicina è la lotta contro le patologie tumorali, tanto è vero che il *National Cancer Institute* (USA) ha fissato come ambizioso obiettivo la vittoria contro il cancro nel 2015.²¹ Questa complessa malattia è causata dalla instabilità genetica e dalla somma di alterazioni molecolari multiple.²² Fino ad ora, le conoscenze mediche non sono state sufficienti per diagnosticare efficacemente le diverse patologie tumorali, ne tantomeno prevederne la comparsa, oltre ad essere

risultate insufficienti per formulare previsioni sull'esito efficace di una terapia.²³ Le correnti difficoltà di cura per essere risolte richiedono:

- 1 delle tecnologie avanzate per osservare e rilevare precocemente le patologie;
- 2 dei nuovi metodi per ottenere diagnosi e prognosi accurate;
- 3 delle strategie per superare la tossicità e gli effetti collaterali dei farmaci chemioterapici;
- 4 dei nuovi trattamenti per colpire patologie particolarmente aggressive e letali.

L'avanzamento su questi punti è di fondamentale importanza anche per le nuove frontiere della medicina, ovvero quella "personalizzata",²⁴ con la quale l'individuazione, la diagnosi e la terapia del cancro saranno legati al profilo molecolare tumorale di ogni individuo, e quella "predittiva" che si basa sull'individuazione di marcatori molecolari e genetici per prevedere la comparsa di eventuali patologie.²⁵

1.3 Drug Delivery

Una delle strategie adottate dalla nanomedicina come alternativa alla medicina molecolare è la costruzione di sistemi di trasporto per i farmaci o *drug delivery*. Con questa terminologia si intende quel processo che avviene quando una specie, naturale o sintetica, definita *carrier*, viene combinata con un farmaco o con un agente attivo, affinché questo sia trasportato all'interno del tessuto malato e rilasciato in maniera controllata²⁶. Il rilascio può avvenire attraverso un meccanismo continuo o pulsato. Nel primo caso il contenuto fuoriesce dal sistema di trasporto ad una velocità controllata dalla diffusione o dalla degradazione del *carrier* in un noto intervallo di tempo. Nel secondo caso si assiste alla liberazione del farmaco in seguito a specifici stimoli ambientali, come una variazione di pH, di temperatura o per irraggiamento. Un sistema a rilascio controllato permette la somministrazione di dosi più basse del farmaco oppure una diminuzione della frequenza di somministrazione, con conseguente migliore *compliance* da parte del

paziente, ma la concentrazione del principio attivo deve essere mantenuta all'interno dell'intervallo della finestra terapeutica.²⁷ Perciò per essere efficace il vettore deve rimanere stabile finché attraversa la vascolarizzazione,²⁸ ma deve garantire la corretta velocità di rilascio del farmaco una volta raggiunto il tessuto bersaglio.¹⁶

Disporre di un sistema di *delivery* può dimostrarsi molto utile nella somministrazione di farmaci per far fronte a problemi farmacocinetici e farmacodinamici, come la bassa biodisponibilità, la mancanza di selettività e la rapida cattura da parte del sistema del reticolo endoteliale (RES). Molti tra gli agenti terapeutici impiegati, in particolar modo quelli antitumorali, presentano spiccate caratteristiche idrofobiche, perciò la preparazione di formulazioni farmaceutiche da somministrare per via parenterale è altamente ostacolata. Oltretutto, l'efficacia di alcuni agenti farmacologici molto potenti, è spesso osteggiata da effetti avversi dose-dipendenti, come per i chemioterapici, che risultano tossici sia per le cellule sane che per quelle tumorali.²⁹ L'inclusione di questi farmaci in un sistema di *drug delivery* permette di migliorare alcune loro caratteristiche, in quanto può innalzare la solubilità rendendo più agevole la somministrazione per via sistemica, aumenta il tempo di ritenzione nel plasma e consente di ottenere un rilascio controllato, nonché l'indirizzamento sito-specifico.³⁰ In particolare, la diminuzione del riconoscimento da parte del sistema immunitario aumenta il tempo di vita del farmaco stesso, che si traduce in una migliore farmacocinetica e biodistribuzione rispetto al farmaco somministrato in forma libera.³¹ La scelta di un sistema di *delivery* deve essere molto oculata, poiché deve rispondere a determinati requisiti, che riguardano la biocompatibilità del *carrier*, la sua capacità di incapsulamento (*loading*), il controllo nel rilascio del farmaco per raggiungere la concentrazione locale efficace,³² oltre alle considerazioni sui maggiori costi da sostenere nella produzione del vettore.

I sistemi di *drug delivery* più comunemente usati sono sistemi colloidali come micelle polimeriche, microemulsioni, liposomi o nanoparticelle, ma sono studiate anche specie molecolari di grandi dimensioni, come nanotubi di carbonio e dendrimeri. Questi possono trasportare contemporaneamente il

farmaco, un tracciante per seguirne il percorso all'interno dell'organismo, delle molecole direzionanti come gli anticorpi per conferirgli specificità tissutale e essere contemporaneamente schermati dalle cellule fagocitiche del sistema immunitario, ricoprendo la superficie del vettore con macromolecole come il polietilenglicole (PEG) o altri polimeri.^{33,34}

Per questa serie di motivi la diffusione di macromolecole o nanoparticelle varia a seconda della patologia, della localizzazione anatomica e da possibili fattori che influenzano la composizione e la struttura della matrice extracellulare

1.4 Terapia fotodinamica

La terapia fotodinamica o PDT (*Photo Dynamic Therapy*) sta emergendo come un'importante opzione terapeutica nel trattamento di patologie cardiovascolari, dermatologiche, oftalmiche ma soprattutto nella cura del cancro.³⁵ Questa terapia di nuova generazione si propone di superare il danno tissutale aspecifico causato dalle comuni terapie antitumorali. Questa modalità di trattamento è non invasiva ed esplica la sua funzione quando si ha la contemporanea presenza di un agente fotoreattivo, chiamato fotosensibilizzatore (PS), di luce e di ossigeno tissutale. Sebbene le potenzialità cliniche della PDT siano note da oltre trent'anni, solo di recente si è intrapreso un impiego più esteso di questa terapia che ha ricevuto, da parte della FDA, l'approvazione per l'applicazione oncologica nel 1995.³⁶

La terapia fotodinamica offre diversi vantaggi rispetto alle tradizionali modalità di trattamento antitumorali, quali l'intervento chirurgico, la radioterapia o la chemioterapia.³⁷ Infatti, oltre ad essere scarsamente invasiva, la terapia può essere indirizzata verso il tessuto neoplastico e la luce utilizzata per eccitare il fotosensibilizzatore può essere accuratamente direzionata, grazie all'impiego di moderne fibre ottiche e svariati tipi di endoscopi.³⁸ Tuttavia, il vantaggio maggiore di tale tecnica è dato dall'agente fotosensibilizzante, poiché va ad accumularsi e viene trattenuto preferibilmente nel tessuto neoplastico piuttosto che nei circostanti tessuti

sani³⁹ per effetto EPR. Questa selettività di accumulo del fotosensibilizzatore permette di ripetere eventualmente il trattamento, senza provocare effetti collaterali significativi se il direccionamento avviene in modo efficace. Ciò consente di ottenere rapidamente la riduzione o la completa scomparsa della massa tumorale, con un esito ottimale anche dal punto di vista estetico, passati solamente pochi mesi dal trattamento. Infatti la PDT risparmia la matrice extracellulare e ciò permette una più facile rigenerazione del tessuto normale dopo il trattamento.⁴⁰ Contrariamente alle settimane o mesi di radioterapia e chemioterapia o al ricovero ospedaliero prolungato nel caso di intervento chirurgico, la PDT è molto spesso una terapia ambulatoriale. Infine, a differenza della maggior parte delle altre terapie oncologiche, la PDT può indurre l'immunità anche contro i tumori meno immunogenici e contribuire così al controllo a lungo termine del tumore.

1.4.1 Meccanismo di azione della PDT

Un trattamento clinico di PDT si può suddividere in quattro fasi: somministrazione del farmaco, accumulo nel tumore, attivazione del fotosensibilizzatore con generazione delle specie citotossiche e morte cellulare.

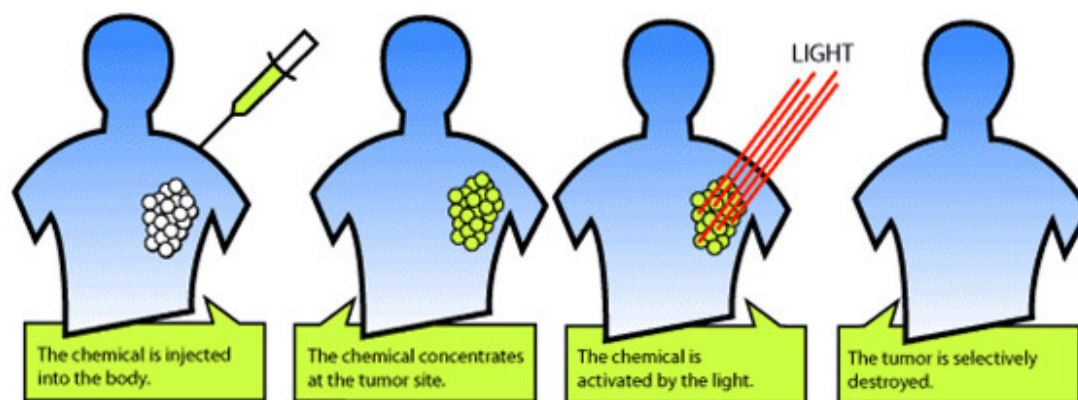


Figura 1: Rappresentazione semplificata dell'azione della PDT.

Nella pratica clinica il fotosensibilizzatore viene somministrato al paziente in modo tale da favorirne l'accumulo nei tessuti malati.

Successivamente questi vengono irraggiati con luce visibile di opportuna lunghezza d'onda che eccita elettronicamente il fotosensibilizzatore, il quale passa dallo stato fondamentale di singoletto S_0 a quello di singoletto eccitato S_1 .

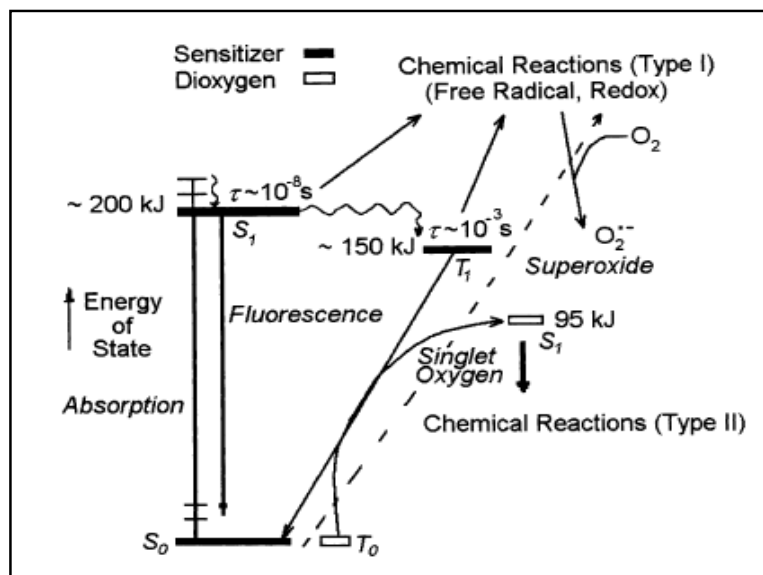


Figura 2: Diagramma di Jablonski.

Il tempo di vita dello stato eccitato S_1 è dell'ordine dei nanosecondi, troppo breve per permettere un'efficace interazione con le molecole circostanti. Per ritornare allo stato fondamentale di singoletto S_0 , l'agente fotoreattivo deve disperdere l'energia e questo processo può seguire diversi meccanismi, come l'emissione di fluorescenza oppure la dissipazione dell'energia elettronica attraverso processi non radiativi di conversione in altre forme energetiche, come in energia termica, attraverso processi collisionali o di *quenching*. Un altro meccanismo è l'*intersystem crossing* (ISC) in cui il fotosensibilizzatore passa dallo stato eccitato di singoletto S_1 allo stato eccitato di tripletto T_1 . Questo processo, proibito dalle regole di selezione, è favorito da effetti di accoppiamento spin-orbita. L'ulteriore discesa allo stato fondamentale S_0 , richiede una seconda transizione proibita dallo stato eccitato di tripletto T_1 . Il tempo di vita della specie T_1 è quindi molto più lungo, dell'ordine dei micro-/milli-secondi, ed è sufficiente per permettere i fenomeni di trasferimento energetico e di carica a molecole

circostanti, con la generazione delle specie citotossiche. Queste ultime possono formarsi mediante due tipologie di reazioni:

1) reazioni di tipo I: un trasferimento elettronico avviene dal fotosensibilizzatore nello stato di tripletto eccitato T_1 a substrati biologici (lipidi insaturi, steroidi, aminoacidi aromatici), con conseguente formazione di specie radicaliche, le quali a loro volta reagiscono con l'ossigeno molecolare per produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questi intermedi sono altamente reattivi e forti ossidanti, come l'anione superossido $\bullet O_2^-$, l'acqua ossigenata H_2O_2 e il radicale ossidrilico $\bullet OH$;

2) reazioni di tipo II: l'energia è trasferita dal fotosensibilizzatore nello stato di tripletto T_1 direttamente all'ossigeno molecolare per formare ossigeno di singoletto (1O_2) che, come indicano prove dirette e indirette, ha un ruolo chiave nei processi molecolari alla base del trattamento anticancro tramite PDT.⁴¹

I due tipi di reazioni non avvengono in modo reciprocamente esclusivo, ma possono contribuire insieme all'effetto terapeutico finale. Un meccanismo può prevalere sull'altro a seconda del fotosensibilizzatore utilizzato, dalla sua affinità con il substrato e dalla concentrazione di ossigeno molecolare nel tessuto, ma in ogni caso si assiste alla formazione di specie radicaliche che provocano nell'organismo reazioni a cascata di tipo biochimico, immunologico e fisiologico, con conseguente distruzione del tessuto irraggiato.³⁷ Tali specie, infatti, sono estremamente tossiche per le cellule e i tessuti con cui vengono a contatto perché sono in grado di provocare danni ossidativi ai vari costituenti cellulari, fino a portare alla morte cellulare.

1.4.2 Effetti biologici della PDT

I ROS generati dal fotosensibilizzatore possono distruggere la massa tumorale attraverso tre diversi meccanismi interdipendenti, che sono il danno cellulare diretto, il danno al sistema vascolare e l'attivazione della risposta immunitaria. Per ottenere risultati a lungo termine dalla terapia è necessaria l'azione di tutti i meccanismi, anche se non è ancora chiaro quale sia il

contributo apportato da ogni singolo processo.⁴² Comunque, l'efficacia della terapia fotodinamica dipende dalla localizzazione del fotosensibilizzatore e dal suo grado di accumulo nel tessuto trattato, dai tempi e dalle dosi di irraggiamento del tessuto oltre che dalla resa di formazione dei ROS.

Danno cellulare diretto

La morte delle cellule tumorali indotta direttamente dai ROS può avvenire per apoptosi e/o necrosi. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, coinvolge l'attivazione di enzimi proteolitici, la cui azione smantella le cellule e ne provoca la morte. L'apoptosi inizia con la condensazione e la conseguente frammentazione del nucleo cellulare, mentre la membrana plasmatica rimane intatta. In seguito, le cellule in apoptosi si frammentano in vescicole circondate da membrana (corpi apoptotici), che vengono poi catturate dai fagociti. La necrosi, invece, è un processo traumatico caratterizzato da rigonfiamento citoplasmatico, distruzione di organelli e membrana plasmatica, con conseguente rilascio del contenuto intracellulare e attivazione di fattori che inducono infiammazione. Il meccanismo di morte cellulare che si innesca dipende dalla linea cellulare impiegata, dalle dosi di luce somministrate e dalla sede di accumulo dell'agente fotosensibilizzante.⁴³ Questo ultimo fattore è determinante per l'attivazione di un processo apoptotico o necrotico, in quanto la localizzazione nei mitocondri o nel reticolo endoplasmatico induce apoptosi, mentre l'accumulo nelle membrane o nei lisosomi ritarda o blocca la via apoptotica e favorisce invece una morte necrotica. Al fine dei benefici terapeutici, l'apoptosi sembra essere il meccanismo preferibile di morte cellulare.

L'entità del danno ossidativo causato dai ROS riflette strettamente la localizzazione intracellulare del fotosensibilizzatore, poichè il breve tempo di vita dei ROS impedisce loro di percorrere distanze maggiori di poche decine di nanometri.⁴⁴ In particolare, l'ossigeno in stato di singoletto ha un'emivita inferiore ai 4 μ s e questo intervallo di tempo gli permette di diffondere per non più di 0,02 μ m. Questo corto raggio d'azione offre dei vantaggi se si attua un meccanismo di direzionamento efficace dell'agente fotoreattivo, perchè

questo può provocare danni ossidativi solo alle cellule malate bersaglio della terapia, risparmiando i tessuti sani circostanti.

I principali bersagli dei fotosensibilizzatori all'interno delle cellule sono mitocondri, lisosomi, membrana plasmatica, citoscheletro e sistemi di membrana interni alla cellula, come il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi.⁴⁵ In particolare diversi studi indicano che i danni alla membrana mitocondriale inducono una forte fototossicità, con morte cellulare per apoptosi.^{46,47} La localizzazione del farmaco fotoreattivo dipende dal suo tempo di esposizione e dalla linea cellulare indagata, ma sono determinanti le caratteristiche chimiche del fotosensibilizzatore, quali il peso molecolare, la carica elettrica, l'equilibrio idro-lipofilo, lo stato di aggregazione e la capacità di legarsi a proteine.⁴⁸

La terapia fotodinamica non presenta particolari effetti mutageni. Ciò è attribuito alla difficoltà della maggioranza dei fotosensibilizzatori ad oltrepassare la membrana nucleare e causare danneggiamenti al DNA,⁴⁹ anche se in alcuni casi si è osservata della fototossicità indotta da interruzioni nella catena di nucleotidi e da legami tra la catena e proteine.⁵⁰

La capacità di provocare la distruzione diretta delle cellule malate non è tuttavia sufficiente per sradicare completamente una massa tumorale. Le motivazioni sono da ricercare nel gradiente di concentrazione del farmaco fotoreattivo nel tessuto tumorale, che diminuisce con la distanza dal vaso sanguigno. Inoltre, la disponibilità dell'ossigeno tissutale è limitata, da una parte per il consumo durante le reazioni fotochimiche, dall'altra per gli effetti distruttivi della PDT sulla vascolarizzazione del tessuto malato.

Danno vascolare

I vasi sanguigni del tessuto canceroso rappresentano un bersaglio critico nelle terapie antitumorali. Il sistema vascolare, che rappresenta anche la principale via per la disseminazione del tumore ad organi distanti, rifornisce di nutrienti e ossigeno le cellule tumorali, come per tutti gli altri tessuti sani.

La terapia fotodinamica causa danni vascolari a seguito dei quali il tessuto malato va incontro ad ipossia e viene privato dei nutrienti. A seconda del fotosensibilizzatore utilizzato il danno potrà essere di tipo emorragico

(vasodilatazione) oppure trombotico (vasocostrizione), con occlusione della rete vascolare che porta alla morte del tessuto malato per ischemia.

Risposta immunitaria

Le terapie antitumorali convenzionali, come la chemioterapia e la radioterapia, hanno un effetto di immunosoppressione a causa della loro tossicità nei confronti del midollo osseo, nel quale vengono generate le cellule del sistema immunitario. A differenza di queste terapie ad azione sistemica, la terapia fotodinamica, come altre terapie locali, può invece stimolare la risposta immunitaria, facilitando così l'eradicazione completa del tumore.⁵¹

La risposta immunitaria è una conseguenza del danno cellulare diretto e della risposta infiammatoria che ne deriva. Dopo il trattamento fotodinamico le cellule necrotiche e apoptotiche esprimono delle proteine che richiamano le cellule macrofagiche, che a loro volta presentano gli antigeni ai linfociti T, attivando così l'immunità cellulo-mediata. I linfociti T attivati migrano quindi verso il tumore e ne distruggono le cellule.

Il ruolo della risposta immunitaria nella terapia fotodinamica non è però ancora del tutto chiaro. Infatti la PDT può anche avere un effetto di immunosoppressione, ma nonostante il gran numero di pazienti trattati, poca attenzione è stata presentata a questo aspetto della terapia.

1.4.3 Fotosensibilizzatori per la PDT

Si definisce fotosensibilizzatore un atomo o una molecola che assorbe energia radiante, solitamente luce visibile, passando conseguentemente ad uno stato elettronico eccitato, e trasferisce successivamente l'energia di eccitazione ad un altro atomo o molecola.⁵² In letteratura sono descritte diverse caratteristiche che dovrebbero essere proprie di un fotosensibilizzatore ideale per la PDT:

- 1) Elevata purezza chimica, ovvero una composizione ben definita e riproducibile, e bassa tendenza all'aggregazione della molecola, poiché questo fenomeno limita o annulla l'efficacia di un agente fotoreattivo;

- 2) Elevato coefficiente di estinzione molare (ϵ) nel rosso, laddove c'è scarso assorbimento da parte delle biomolecole e si ha una buona penetrazione della luce nei tessuti (circa 1 cm);
- 3) Fotostabilità e tossicità nulla in assenza di luce (*dark toxicity*) in modo da prevenire effetti collaterali ad alte dosi;
- 4) Sufficiente tempo di vita dello stato elettronico eccitato di tripletto, per garantire un'efficiente resa quantica di produzione delle specie citotossiche;
- 5) Sufficiente energia dello stato elettronico eccitato di tripletto, che deve essere superiore a 94 kJ mol^{-1} per permettere la transizione tra lo stato fondamentale dell'ossigeno e il primo stato eccitato di singoletto;
- 6) Una biodistribuzione preferenziale nei tessuti tumorali;
- 7) Una veloce eliminazione della molecola al fine di evitare la fotosensibilizzazione cutanea e la tossicità sistemica (*clearance*);
- 8) Buona solubilità in formulazioni farmaceutiche e nei fluidi corporei, in modo da poter essere somministrato per via parenterale e trasportato al sito tumorale.

Numerosi composti potrebbero essere utilizzati come fotosensibilizzatori per la PDT, sia specie organiche che inorganiche. Solitamente si tratta di composti organici con una struttura policiclica, come derivati porfirinici, clorine, ftalocianine e derivati fullerenici, in cui l'esteso sistema coniugato favorisce l'assorbimento di fotoni nella regione del rosso o vicino infrarosso dello spettro elettromagnetico,⁵³ ma sono state studiate anche specie inorganiche, quali ZnO e TiO₂.⁵⁴

La finestra terapeutica che è possibile sfruttare nella PDT comprende un intervallo di lunghezze d'onda tra 600 e 900 nm.⁵⁵ Infatti, al di sotto di questa banda si osservano fenomeni di *scattering* e forte assorbimento da parte di cromofori endogeni, come melanina e emoglobina, che limitano la penetrazione della luce nei tessuti *in vivo*. D'altra parte, a lunghezze d'onda superiori ai 900 nm si assiste all'assorbimento dell'acqua presente nei tessuti e inoltre la radiazione luminosa non ha più energia sufficiente per generare ossigeno di singoletto.

Gli agenti fotodinamici per la PDT sono stati intensamente studiati negli ultimi anni. I primi trattamenti con PDT venivano effettuati con un complesso miscuglio di porfirine in forma di monomeri ed oligomeri, derivante dall'ematoporfirina trattata con acido acetico e acido solforico. Eliminando i componenti meno attivi della miscela, è stato formulato il Photofrin[®], che nel 1995 è stato il primo fotosensibilizzatore approvato dalla FDA come agente fotodinamico per la PDT ed ha assunto un alto grado di popolarità per il trattamento di diverse patologie tumorali.³⁸

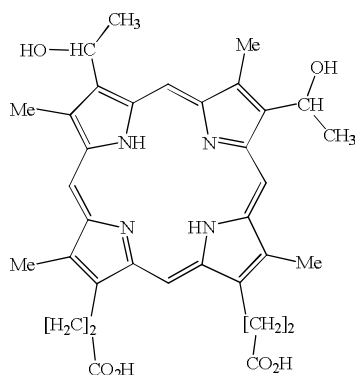


Figura 3 Formula di struttura dell'ematoporfirina

Ciò nonostante, il Photofrin[®] non risponde ha molte delle caratteristiche che dovrebbero essere proprie di un fotosensibilizzatore ideale, infatti i suoi limiti e dei suoi analoghi sono evidenti. Innanzitutto è molto difficile riprodurre la composizione della miscela: ciò rende impossibile correlare la struttura molecolare all'attività biologica e formulare una corretta prognosi. L'attività biologica, poi, è piuttosto modesta, con un coefficiente di estinzione molare (ϵ) molto basso nell'unica banda nel rosso a 630 nm (banda I, $\epsilon \sim 1170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Unendo questi aspetti alle elevate dosi che è necessario somministrare al paziente per ottenere una buona attività e alla scarsa selettività verso i tessuti bersaglio, ricaviamo una formulazione che porta a numerosi effetti collaterali, talvolta anche gravi, con limitazioni di esposizione alle fonti luminose per molte settimane per l'elevata fotosensibilizzazione della cute.⁵⁶

I fotosensibilizzatori di questo genere sono stati sostituiti con degli agenti fotodinamici chiamati di II generazione, che hanno risolto i problemi riguardanti la purezza e il miglioramento del coefficiente di estinzione

molare. La maggioranza di queste molecole appartiene alla famiglia delle porfirine, molecole facili da sintetizzare, purificare e modificare attraverso estensioni della molecola, metallazioni o ossidazioni. In particolare le tetraarilporfirine hanno un'ottima resa quantica di produzione di ossigeno singoletto e, nonostante si siano rivelate tossiche *in vivo*, offrono una versatilità sintetica che le rende ottimi fotosensibilizzatori modello.⁵⁷ Anche le porfirine naturali possono essere facilmente modificate per migliorarne le proprietà e sono commercialmente disponibili delle preparazioni farmaceutiche (Verteporfin[®]) per trattamenti antitumorali, dermatologici e oftalmici.

Un'altra importante classe di fotosensibilizzatori è rappresentata dalle ftalocianine, poichè presentano caratteristiche spettrali ideali. I massimi di assorbimento si esibiscono a lunghezze d'onda del vicino infrarosso (670-780 nm) e assumono valori di ϵ dell'ordine di $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Inoltre possono essere facilmente rese idrosolubili per solfonazione e condividono con le porfirine una SAR (relazione struttura-attività) simile. La ftalocianina di silicio Pc 4 è attualmente in fase clinica di sperimentazione.

Un'ultima classe importante di agenti per la PDT sono le clorine, che differiscono dalle porfirine per una parziale idrogenazione di uno degli anelli pirrolici. Esse possono essere ottenute in forma considerevolmente pura, possiedono generalmente un'elevata resa quantica di ossigeno di singoletto ed assorbono adeguatamente nel rosso. A questa classe appartiene la meta-tetraidrossifenilclorina, mTHPC (Foscan[®]).

Una strategia alternativa per la terapia fotodinamica si basa sull'azione di un fotosensibilizzatore endogeno, la protoporfirina IX (Pp IX), che è un intermedio nella biosintesi dell'eme che si forma *in vivo* a partire dal profarmaco ALA (acido 5-ammino levulinico). Le proprietà spettrali sono simili al Photofrin[®], ma presenta effetti collaterali considerevolmente migliori. Sia l'ALA (Levulan[®]) che il suo estere metilico (Metvix[®]) sono stati approvati per la pratica clinica.

La limitazione maggiore di questa seconda generazione di farmaci si può riassumere nell'insufficienza della selettività di accumulo degli agenti fotoattivi nel tessuto malato che porta ad avere effetti collaterali importanti.

Per affrontare questo problema lo sviluppo di fotosensibilizzatori ha intrapreso una nuova strada, cercando di conferire maggiore selettività ai farmaci già noti coniugandoli con biomolecole, come anticorpi monoclonali, lecitine, peptidi, ormoni, folati, vitamine e ligandi per recettori sovraespressi dalle cellule tumorali.⁵⁸ È nata così la III generazione di fotosensibilizzatori.

1.4.4 La meta-tetraidrossifenilclorina (mTHPC)

La 5,10,15,20-tetra(m-idrossifenil)clorina (mTHPC) o Foscan[®] nella sua formulazione commerciale è un fotosensibilizzatore di II generazione, che è stato approvato nel 2001 da parte dell'EMA (European Medicines Evaluation Agency) per l'uso in PDT nel trattamento palliativo di carcinomi in fase avanzata a cellule squamose di testa e collo. Recentemente sono state richieste estensioni anche per tumori alla prostata e al pancreas.

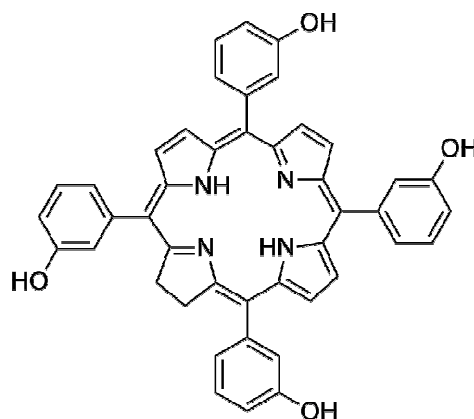


Figura 4 Formula di struttura di mTHPC.

In molti studi *in vivo* il farmaco ha dimostrato di possedere una potenza particolarmente elevata e una buona attività terapeutica, anche se causa una prolungata fotosensibilizzazione della pelle nei pazienti che può durare fino a sei settimane dalla fine del trattamento. La mTHPC ha una struttura chimica ben nota e può essere sintetizzata con una purezza superiore al 99%.⁵⁹ Le sue proprietà fotofisiche sono favorevoli al suo utilizzo in PDT: possiede infatti un

massimo di assorbimento a 652 nm, nella regione spettrale della luce rossa, con un coefficiente di estinzione molare di circa $30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Il suo spettro di assorbimento presenta le 5 bande tipiche di tutte le molecole della famiglia delle clorine: una molto intensa a 420 nm (*Soret band*) e quattro *Q-bands* rispettivamente a 520 (IV), 540 (III), 610 (II) e 650 (I) nm. Rispetto alle corrispondenti porfirine, le clorine hanno generalmente coefficienti di estinzione molare (ϵ) molto più elevati sia per la banda di Soret che per la banda (I). Infatti, l' ϵ a 650 nm, misurato in etanolo, è di circa $30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, circa dieci volte più elevato rispetto alla corrispondente 5,10,15,20-tetra(m-idrossifenil)porfirina (mTHPP). Negli spettri di fluorescenza si osservano due bande di emissione centrate rispettivamente a 652 e 720 nm.

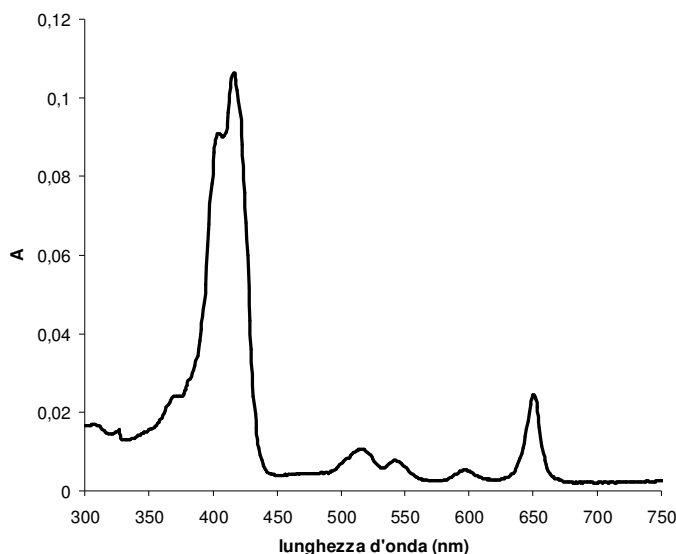


Figura 5 Spettro di assorbimento UV-Vis di mTHPC in etanolo a 25°C.

I quattro gruppi ossidrilici fenolici presenti nella struttura dell'mTHPC hanno valori di pKa più alti di quelli degli acidi carbossilici presenti in altri fotosensibilizzatori clorinici: l'*uptake* cellulare non è quindi influenzato dal pH nell'intervallo 6.5-8.0. Inoltre, diversamente da molti fotosensibilizzatori, non sono i mitocondri il bersaglio cellulare principale dell'mTHPC, che invece si localizza preferenzialmente nell'apparato di Golgi e nel reticolo endoplasmatico.

La molecola è idrofobica e per la sua somministrazione parenterale è raccomandata la dissoluzione in PEG 400, etanolo e acqua 3:2:5. Dopo l'iniezione, il farmaco forma inizialmente aggregati nel plasma per poi ridistribuirsi in forma monomerica legato alle lipoproteine. Questi fenomeni hanno come conseguenza una farmacocinetica poco prevedibile, con conseguenti e importanti variazioni negli effetti della terapia e nelle reazioni avverse.

L'utilizzo di appropriati *carrier* potrebbe fornire quindi una valida strategia sia per risolvere questi problemi di solubilità e farmacocinetica che per ottenere una maggiore selettività verso i tessuti malati.

1.5 Nanoparticelle nel Drug Delivery

Le nanoparticelle hanno dimostrato di essere una piattaforma utile e flessibile per applicazioni biologiche di vario genere, in particolare per il *drug delivery* e l'*imaging*.

I farmaci per PDT presentano delle limitazioni per la piena efficacia della terapia. Le spiccate caratteristiche idrofobiche dei fotosensibilizzatori comportano difficoltà nella somministrazione oltre all'aggregazione del farmaco in mezzo acquoso, con conseguente perdita di resa quantica di produzione dei ROS. Inoltre, è necessaria una migliore specificità di accumulo del farmaco per evitare la distruzione di cellule sane e la comparsa di effetti collaterali a volte gravi. Nonostante molti sforzi siano stati fatti con i fotosensibilizzatori di terza generazione, che coniugano una molecola *target* per i recettori sovraespressi nelle cellule tumorali, non sono stati ottenuti dei risultati apprezzabili per nuove applicazioni cliniche, poiché il farmaco mantiene una bassa specificità *in vivo*.⁶⁰

Le nanoparticelle si prestano per essere utilizzate in PDT, perché il farmaco può essere trasportato in forma monomerica, ovviando i problemi di solubilità e di aggregazione, ma soprattutto perché aumenta la selettività di accumulo per effetto EPR. Inoltre, il fotosensibilizzatore non necessita di essere rilasciato per svolgere la sua attività di generazione dei ROS, se il

carrier è sufficientemente permeabile all'ossigeno e trasparente alla luce. Questo aspetto esclusivo per la PDT consente di eliminare le difficoltà dovute al rilascio del farmaco: infatti, non è necessario studiare meccanismi di rilascio dal vettore, anzi il PS può essere intrappolato irreversibilmente nella particelle, per evitare rilasci indesiderati prima del raggiungimento del bersaglio.

In letteratura si trovano numerosi nanovettori proposti per la PDT, come le nanoparticelle polimeriche, metalliche o semiconduttori. Tra la varietà di *carrier* proposti, le nanoparticelle di silice stanno emergendo come vettori particolarmente promettenti.

1.5.1 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche possono essere considerate l'equivalente organico delle nanoparticelle di silice: analogamente a quelle di silice, che vedremo in dettaglio nei prossimi paragrafi, le polimeriche sono preparate tramite la polimerizzazione di un appropriato precursore, comunemente in micelle, in microemulsione in fase inversa o per diffusione del solvente da un'emulsione stabilizzata da surfattante di un precursore del polimero.⁶¹

Le differenze rilevanti con le particelle di silice sono principalmente tre:

- 1) le nanoparticelle polimeriche sono più sensibili all'ambiente circostante: in particolare, tendono a gonfiarsi o a cambiare proprietà a seguito di cambiamento di solvente o pH;
- 2) non soffrono di aggregazione irreversibile;
- 3) possono essere biodegradabili.

Aggiungasi che con le nanoparticelle polimeriche i livelli raggiungibili dai dopanti organici sono usualmente molto più alti (più del 10 % in peso) di quelli che possono essere raggiunti con le particelle di silice.⁶²

Come nel caso delle nanoparticelle di silice, quelle polimeriche dopate con porfirina sono largamente studiate per la PDT.⁶²

In particolare, i primi studi sulle possibili applicazioni delle nanoparticelle polimeriche alla PDT risalgono agli anni '90, quando molti materiali sono stati testati come agenti di *delivery* nella loro forma

nanoparticellare. Alla fine l'acido polilattico (PLA) e il polilattico-co-glicolico (PLGA) sono risultati i candidati più promettenti. Questi materiali infatti sono largamente usati in *drug delivery*, grazie alla loro biocompatibilità e alla loro capacità di dissolversi lentamente in soluzione acquosa, motivo per cui sono stati approvati dalla FDA per l'iniezione parenterale.⁶³

Nel 1995 Gurny e Van Lier hanno preparato nanoparticelle PEGilate di PLA (circa 1 μm di diametro) a basso loading di esadecafluoro zinco ftalocianina (< 1% w/w).⁶⁴ Le nanoparticelle dopate hanno mostrato maggiore attività PDT rispetto alla formulazione standard del farmaco.

Da allora molte delle nanoparticelle polimeriche utilizzate in PDT sono state basate su PLA/PLGA. Poco dopo Gurny ha incrementato il *loading* del fotosensibilizzatore mTHPP (tetra(meta-idrossifenil)porfirina) nelle nanoparticelle, raggiungendo l'11% w/w.⁶⁵ Inoltre il diametro è stato ridotto a circa 120-140 nm per sfruttare l'effetto EPR. Quando sono stati testati *in vitro*, questi vettori si sono dimostrati più efficienti rispetto al fotosensibilizzatore libero.

La composizione del polimero ha una grande influenza sull'efficacia della PDT e il copolimero PLGA (avente un più alto contenuto di unità glicosiliche) è il più efficiente, la cui la sua velocità di degradazione può essere più alta rispetto a quella dell'omopolimero PLA.⁶⁶

Anche il diametro delle nanoparticelle influenza il loro grado di fototossicità: si è rilevato che nanoparticelle di 167 nm trasferiscono molto rapidamente la porfirina THPP alle proteine del siero, anche se presente a basse concentrazioni (5%).⁶⁷

La formulazione di nanoparticelle si è dimostrata più efficiente rispetto al farmaco libero anche nel produrre occlusione vascolare,⁶⁸ ma nanoparticelle più piccole (117 nm) hanno una migliore attività PDT *in vivo*.⁶⁹ Questo effetto è stato attribuito all'abilità delle nanoparticelle di rimanere più a lungo in circolo nel sangue.

Nanoparticelle PLGA di questo tipo sono state studiate da molti altri gruppi di ricerca che hanno ottenuto risultati analoghi.⁷⁰

L'unico esempio dell'uso di polimeri non biodegradabili proviene dal gruppo di Kopelmann, che ha intrappolato la clorina mTHPC in nanoparticelle

idrogel di poliacrilamide di 2 nm preparate in microemulsione inversa.⁷¹ Il fotosensibilizzatore non fuoriesce dalle particelle in soluzione acquosa e la produzione di $^1\text{O}_2$ non è affetta dall'incapsulamento. Apparentemente le nanoparticelle non sono fagocitate dalle cellule ma sono ancora capaci di produrre *photokilling* attraverso il danneggiamento della membrana cellulare.

1.6 Nanoparticelle di silice

La preparazione di nanoparticelle di silice è stata descritta per la prima volta nel diciannovesimo secolo e la loro produzione industriale è iniziata nel 1933.⁷² Attualmente rappresentano una delle nanotecnologie più diffuse al mondo e sono ampiamente usate in molte applicazioni, dalla chiarificazione di bevande, ai *filler* per materiali polimerici, alla produzione di ricoprimenti antigraffio.

Sostanzialmente le nanoparticelle di silice sono costituite da un polimero inorganico altamente ramificato. Come quelle polimeriche, le nanoparticelle di silice non acquisiscono particolari proprietà chimico-fisiche dalle loro nano-dimensioni ad eccezione dell'aumento dell'area superficiale.⁷³ Esse possono essere considerate come nano-sfere di vetro poroso e rigido, relativamente inerti dal punto di vista chimico e che non rigonfiano, né cambiano porosità, quando sono poste in un solvente o per variazioni di pH e di temperatura. La rigidità della matrice conferisce una struttura ben definita con diversi compartimenti che possono essere sfruttati per ospitare sostanze diverse. Per di più, la disponibilità di vari precursori e metodi per la loro sintesi, garantisce una certa versatilità, tant'è che molti fotosensibilizzatori differenti possono essere incapsulati,⁷⁴ controllando anche il diametro, la forma, la porosità e la mono-dispersione delle nanoparticelle durante la sintesi.⁷⁵ La silice rappresenta una matrice ideale per l'inclusione di fotosensibilizzatori, grazie alla sua trasparenza alla luce e relativa inerzia rispetto ai processi fotofisici oltre alla elevata porosità che rende le nanoparticelle permeabili all'ossigeno. Inoltre, gli agenti fotoreattivi, protetti dall'ambiente esterno, godono di un'elevata resistenza al *photobleaching*. La

loro superficie può essere funzionalizzata con molecole o macromolecole per il controllo dell'interazione chimica con l'ambiente e della stabilità colloidale in diversi solventi.⁷⁶ Le nanoparticelle di silice possono fungere da piattaforma multivalente per la realizzazione di sistemi supramolecolari oppure avere una struttura multistrato, capace di contenere specie molecolari differenti nei diversi strati. Queste proprietà uniche permettono di combinare diverse funzioni in un unico nano-oggetto, come MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), *imaging* di fluorescenza e PDT, diventando utili per la cosiddetta teranostica (terapia e diagnostica combinate)

1.6.1 Principali metodi di sintesi

Le nanoparticelle di silice sono solitamente ottenute dalla polimerizzazione di alcossidi di silicio,⁷³ seguendo tre principali protocolli di sintesi.

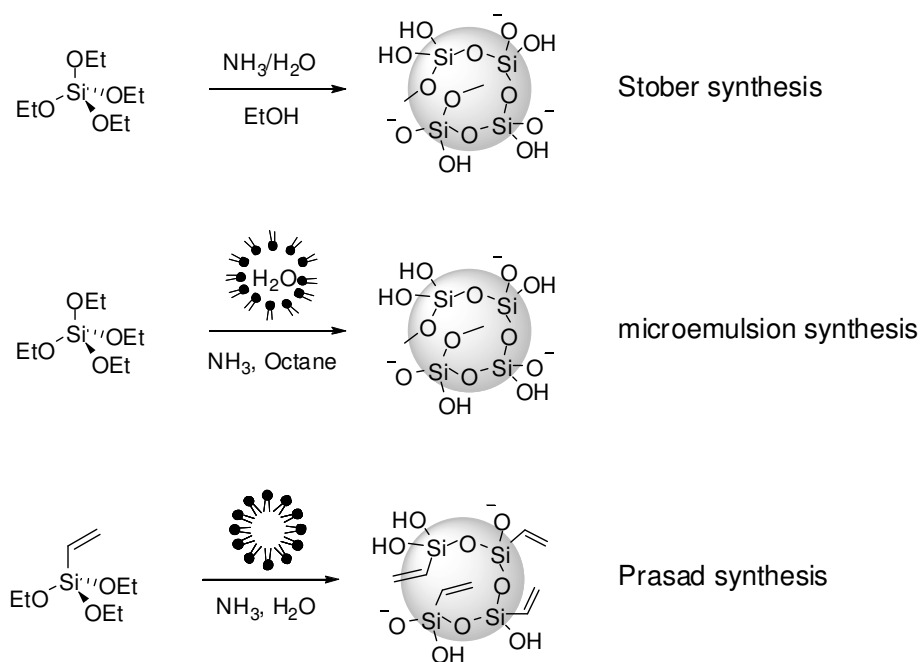


Figura 6: principali metodi di sintesi delle nanoparticelle di silice

Nel primo metodo, proposto da Kolbe nel 1956⁷⁷ e sviluppato da Stöber alla fine degli anni '60,⁷⁸ le particelle si formano per idrolisi e condensazione di tetraetilortosilano (TEOS) in soluzioni di etanolo contenenti acqua e ammoniaca. Le dimensioni finali dipendono principalmente dalle quantità di

acqua e ammoniaca aggiunte e variano tipicamente dai venti alle centinaia di nanometri.⁷⁹ Gli studi di van Blaaderen dimostrano che l'aggiunta di diversi organoalcossisilani alla miscela di reazione consente l'incorporazione di specie organiche nella matrice silicea. In alternativa la funzionalizzazione superficiale può essere realizzata facendo reagire nanoparticelle di silice preformate con organoalcossisilani.⁸⁰ Con questo metodo, detto metodo di Stöber, è quindi possibile includere all'interno delle nanoparticelle dei farmaci purchè siano dotati di gruppi trialcossisilano.⁸¹

Il secondo metodo sintetico è stato sviluppato nei primi anni '90 da Arriagada e Osseo-Asare, e successivamente da Tan. Questo protocollo prevede la polimerizzazione di TEOS catalizzata dall'ammoniaca in microemulsioni inverse di acqua in ottano stabilizzate da un tensioattivo.⁸² Le goccioline d'acqua della microemulsione agiscono come "nanoreattori" dove accrescono le particelle e la dimensione finale è controllata dal rapporto acqua/solvente organico. Con questa metodologia si ottengono particelle altamente monodisperse e perfettamente sferiche con dimensioni che dai 20 ai 100 nm.

Le molecole idrofiliche, o eventualmente delle altre nanoparticelle, se aggiunte alla miscela di reazione, vengono intrappolate dalla matrice silicea senza la preliminare funzionalizzazione con gruppi silano, permettendo la realizzazione di nanoparticelle dopate.⁸³ La funzionalizzazione della superficie e la bioconugazione sono ottenute mediante reazione con derivati organoalcossisilani oppure per modifica diretta dei gruppi silanolicci in superficie.⁸⁴

Infine, Maitra nel 2002 ha proposto la polimerizzazione di derivati organosilani lipofili, come l'octiltrietossisilano (OTE) o viniltrietossisilano (VTES), in soluzioni micellari di tensioattivi in acqua.⁸⁵ Questo metodo poi è stato ampiamente studiato da Prasad. Con questa metodologia si ottengono particelle. In questo caso si ottengono nanoparticelle di silice organicamente modificata (ORMOSIL) altamente monodisperse con diametro tra 10 e 150 nm. Una molecola lipofila aggiunta alla miscela di reazione, viene inglobata nelle micelle e rimane intrappolata nelle nanoparticelle risultanti.⁸⁶

1.6.2 Nanoparticelle di silice in PDT

Per includere un fotosensibilizzatore in una nanoparticella possono essere quindi utilizzate due strategie. La prima ottiene l'immobilizzazione dei farmaci attraverso intrappolamento fisico, coadiuvato da interazioni deboli tra il fotosensibilizzatore stesso e la matrice silicea, mentre il secondo porta alla formazione di legami covalenti tra fotosensibilizzatore e matrice silicea. Questa ultima tipologia appare più promettente, poiché evita che il farmaco possa essere rilasciato in modo indesiderato, anche se ciò richiede la funzionalizzazione della molecola dopante con una opportuna funzione di ancoraggio, in genere un gruppo trialcossisilano. Negli ultimi anni le nanoparticelle di silice sono state molto studiate come possibile *carrier* per la PDT, tuttavia gli studi biologici compiuti non sono ancora completi, poiché riguardano per la maggior parte studi effettuati *in vitro*, mentre le indagini sull'efficacia *in vivo* sono ancora nelle fasi iniziali.⁸⁷

I primi tentativi per incapsulare dei fotosensibilizzatori nelle nanoparticelle di silice comparvero nel 2003 da parte Prasad e Kopelman, e da quei lavori pionieristici molti altri potenziali vettori per PDT sono stati sintetizzati.

Una particolare attenzione ha ricevuto il protocollo di Prasad e sue varianti, con il quale sono stati incapsulati vari farmaci per PDT, alcuni dei quali hanno rivelato dei risultati interessanti. In generale, le nanoparticelle hanno preservato l'attività PDT del fotosensibilizzatore,^{86a,88} che in alcuni casi è risultata perfino superiore al farmaco libero. Questo è il caso della ftalocianina siliconica Pc4 (inserire immagine) in nanoparticelle ORMOSIL di 25-30 nm, che hanno dimostrato di poter indurre apoptosi *in vitro* in cellule tumorali di melanoma, oltre a incrementare l'accumulo della ftalocianina nei mitocondri e nei lisosomi rispetto al farmaco libero.⁸⁹ Oltre a queste caratteristiche, le nanoparticelle ORMOSIL di diversi diametri (10nm, 25nm e 60 nm) dopate con la Protoporfirina IX⁹⁰ hanno dimostrato lo stesso *uptake* cellulare e una pari attività PDT *in vitro* per ogni diametro. Le indagini *in vivo* hanno invece dato prova che i tempi di *uptake* dipendono dalle linea tumorale indagata e che i vettori silicei inducono un elevato grado di accumulo aspecifico nei tessuti sani.

Le ORMOSIL, come tutte le nanoparticelle di silice, hanno dimostrato instabilità in ambiente acquoso ad alte concentrazioni saline, ma la stabilità viene riacquisita in presenza di proteine di siero bovino al 3%. La presenza di proteine del siero nel mezzo acquoso può però indurre il rilascio del fotosensibilizzatore: questo è il caso dell' m-THPC che viene trasferito dalle nanoparticelle alle proteine nella soluzione.⁹¹ Questo studio ha evidenziato le difficoltà che possono talvolta insorgere quando si utilizza un farmaco non covalentemente legato alla matrice. Il prematuro rilascio può indurre a conclusioni errate sulle reali caratteristiche del vettore, sull'efficacia espressa dal fotosensibilizzatore nella generazione di specie citotossiche in sistemi biologici, oltre a portare ad una ridotta efficienza del trattamento e ad effetti collaterali.

Un sostanziale aumento nella resa di produzione di ossigeno di singoletto e dell'efficienza di PDT è stato ottenuto da Prasad, sintetizzando delle nanoparticelle ORMOSIL tramite copolimerizzazione tra viniltrietossilano e (3-iodopropil)-trimetossisilano.⁹² Infatti, questi atomi pesanti favoriscono l'accoppiamento spin-orbita e di conseguenza la transizione tra stati di singoletto e di tripletto, così che l'efficienza del fotosensibilizzatore HPPH è stata aumentata di 1,7 volte nella produzione di 1O_2 rispetto alla stessa nanoparticella in assenza dello iodio.

Kopelman, nel 2003, per intrappolare l'm-THPC nella matrice silicea ha proposto una variazione della sintesi di Stöber, utilizzando l'amminopropiltrirossisilano (APTES) come co-reagente insieme al tetrametilortosilicato (TMOS). L'efficacia di incapsulamento è stata superiore rispetto alle nanoparticelle di tipo Stöber, grazie al legame idrogeno tra il fotosensibilizzatore e il gruppo amminico. Anche in questo caso la produzione di 1O_2 è risultata essere superiore rispetto all'm-THPC libero.

Il fotosensibilizzatore cationico blu-metilene è stato internalizzato in nanoparticelle tipo Stöber e ORMOSIL dal gruppo di Kopelman⁹³ e in microemulsione a fase inversa da Wang.⁹⁴ I risultati per questo *carrier* sono ancora preliminari, ma dati incoraggianti provengono dalle prove *in vitro* e *in vivo* per le nanoparticelle ottenute da microemulsione in fase inversa.

Anche le nanoparticelle cave proposte da Wei hanno prodotto risultati promettenti, utilizzando il fotosensibilizzatore Ipocrellina A (figura 7).⁹⁵ Facendo uso di due differenti tipologie di sintesi hanno osservato maggiore resa quantica di produzione di $^1\text{O}_2$ rispetto al farmaco libero oltre all'accumulo e alla distruzione *in vitro* della membrana mitocondriale di cellule tumorali.

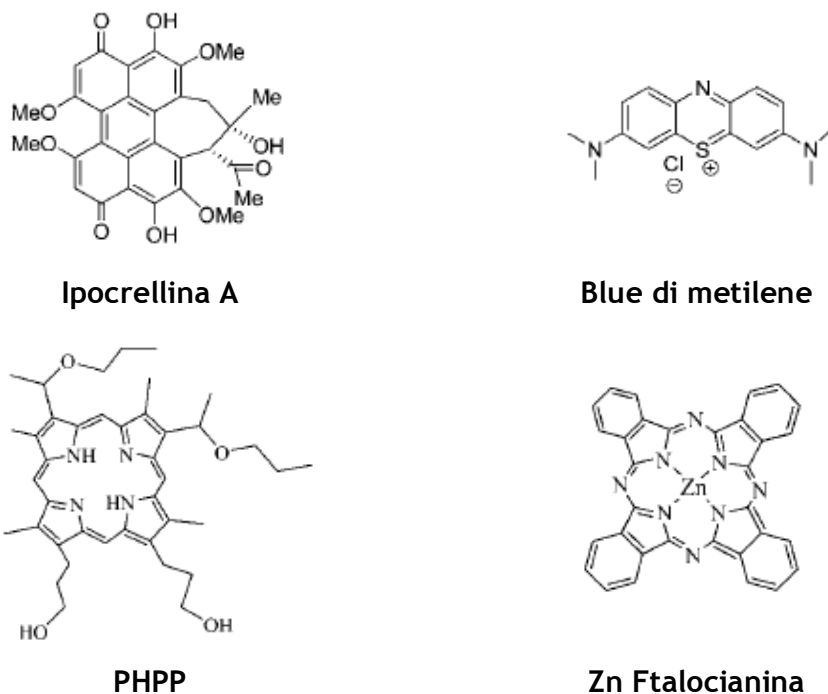


Figura 7: fotosensibilizzatori incapsulati in nanoparticelle di silice

Le nanoparticelle di silice si prestano ad essere multifunzionali, incorporando oltre ai farmaci PDT anche agenti di contrasto per la diagnostica o per essere utilizzate in terapie differenti come l'ipertermia.

Nanosistemi bi-funzionali sono stati proposti per combinare la PDT con la diagnostica. Questi vettori presentano un *core* di materiale magnetico per l'MRI e uno strato esterno di silice contenente il fotosensibilizzatore per la PDT, che può essere adsorbito anche su silice mesoporosa.⁹⁶ In generale, questi *carrier* si sono dimostrati meno efficienti nella produzione di $^1\text{O}_2$, nonostante siano stati testati diversi protocolli di sintesi delle nanoparticelle e vari agenti fotodinamici, come il blue di metilene^{93,97} e il PHPP.⁹⁸

I nanomateriali con proprietà di *up-conversion* emettono fotoni a più alta energia dopo averne assorbiti a più bassa energia, ad esempio dal vicino infrarosso (NIR) al visibile. Questa caratteristica consente di eccitare un fotosensibilizzatore utilizzando frequenze del NIR, che limitano l'assorbimento tissutale o lo *scattering* della luce e penetrano maggiormente nei tessuti. Le nanoparticelle di silice consentono di essere multifunzionali anche per questo aspetto, perché permettono di incapsulare un farmaco fotoattivo accoppiato a materiali con queste caratteristiche. Le potenzialità di questo approccio sono state dimostrate ricoprendo dei nanocristalli di $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ con uno strato di silice mesoporosa dopata con una ftalocianina metallata con zinco (figura 7), sia ricoprendo con uno strato sottile di silice mesoporosa dopata con merocianina 540 una nanoparticella PUMPs (*Photon Up-converting Nanoparticles*). Entrambe queste strategie hanno dimostrato che è possibile generare $^1\text{O}_2$ utilizzando lunghezze d'onda del NIR e produrre un effetto citotossico *in vitro* sulle cellule, confermando le potenzialità delle nanoparticelle di silice per questo modalità terapeutico.

L'eccitazione del fotosensibilizzatore indotta da assorbimento a due fotoni (TPA: *two-photon absorption*) è un altro approccio promettente per aumentare la penetrazione dei fotoni nei tessuti. Infatti, i fotosensibilizzatori possono assorbire simultaneamente due fotoni a più bassa energia, così che si possono utilizzare lunghezze d'onda del NIR per indurre l'eccitazione del fotosensibilizzatore. Due diverse strategie sono state affrontate per ottenere dei nanosistemi fotoattivi per TPA. Il primo incapsula direttamente un fotosensibilizzatore con assorbimento a due fotoni in nanoparticelle ottenute per sintesi da microemulsione inversa, mentre l'approccio proposto da Prasad descrive la duplice internalizzazione in nanoparticelle ORMOSIL del fotosensibilizzatore HPPH con un eccesso di BDSA (figura 8), molecola molto attiva nell'assorbimento di due fotoni che agisce da donatore. Infatti, grazie alla sovrapposizione tra l'emissione del BDSA e l'assorbimento dell'HPPH, si assiste al trasferimento dell'energia attraverso un meccanismo di FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Entrambi questi sistemi hanno dimostrato la generazione di $^1\text{O}_2$ e una attività PDT *in vitro* utilizzando lunghezze d'onda di eccitazione del NIR.

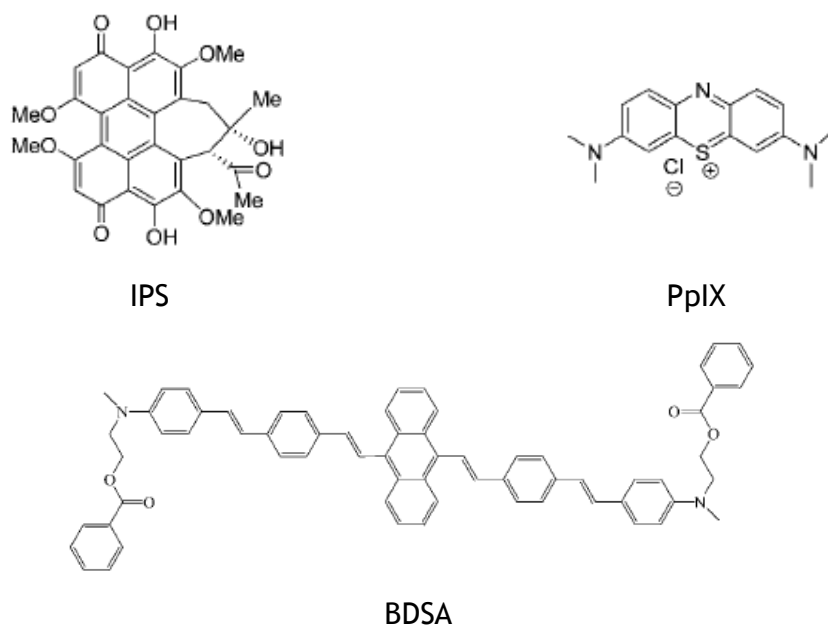


Figura 8: fotosensibilizzatori incapsulati in nanoparticelle di silice

Legando chimicamente un fotosensibilizzatore alla matrice silicea si evita l'indesiderato suo rilascio dal carrier che può comportare vari effetti avversi già descritti in precedenza.

Per legare covalentemente le molecole fotoattive sono stati utilizzati diverse tipologie di *carrier*, dalle nanoparticelle di silice pirogeniche non porose per il fullerene,⁹⁹ alle mesoporose¹⁰⁰ e alle Stöber¹⁰¹ per la PpIX. Prasad ha proposto per primo l'incorporazione covalente dell'IPS in nanoparticelle ORMOSIL,¹⁰² dimostrando che le caratteristiche spettroscopiche e funzionali del fotosensibilizzatore venivano preservate, oltre ad un'attività citotossica *in vitro* proporzionale all'*uptake* cellulare. Zhang ha proposto delle nanoparticelle di silice multi-funzionali per *imaging* e terapia PDT. La sintesi prevede la formazione di un *core* compatto di silice dopata con fluoresceina ricoperto da uno strato mesoporoso contenente un emoporfirina (HP) covalentemente legata. In questo caso l'efficienza del fotosensibilizzatore è apparsa superiore all'HP libera e la fluoresceina non è stata danneggiata dall' $^1\text{O}_2$ grazie alla protezione del *core* compatto.¹⁰³ Perciò, le caratteristiche assunte dal fotosensibilizzatore all'interno del *carrier* sono determinanti per l'efficacia dell'azione citotossica. Inoltre, la lunga serie di esempi appena proposti evidenziano che un nanovettore,

affinchè possa potenzialmente essere utilizzato nella pratica clinica, deve essere attentamente progettato. Infatti, un farmaco può mantenere o perfino incrementare la sua attività di generazione delle specie citotossiche solo se si dispone di una corretta sintesi, che possa contemporaneamente trasportarlo in alte concentrazioni (*loading*) e in forma monomeric; il vettore deve inoltre condurre il farmaco nel sito di interesse e non essere di ostacolo per l'attività citotossica dei ROS; il vettore deve aumentare considerevolmente la specificità verso i tessuti bersaglio della terapia, riducendo gli effetti collaterali, ma non deve introdurre ulteriori elementi di tossicità causati dal nanomateriale. Tutta questa serie di valutazioni devono essere compiute per ogni nanovettore che si progetta e si realizza, poiché una sola caratteristica avversa può vanificare l'utilizzo del *carrier* nella terapia.

1.7 Targeting

Il concetto di *targeting* è basato sull'uso di *carrier systems* che trasportano il farmaco selettivamente al sito d'azione. La scelta del *carrier* che deve essere usato nella strategia del *drug targeting* dipende dal tipo di cellule che devono essere raggiunte, bersagliate, da quale farmaco deve essere veicolato e, se necessario, rilasciato.

Esistono due tipi di *carriers*:

- *carriers* particellari, come liposomi, particelle lipidiche (LDL e HDL), microsfele, nanoparticelle e micelle polimeriche, che in genere contengono il farmaco all'interno;
- *carriers* solubili, come anticorpi monoclonali e loro frammenti, proteine plasmatiche, peptidi, polisaccaridi, polimeri di natura e composizione diversa.

Il *targeting* è definito di primo ordine quando il farmaco è trasportato nell'organo bersaglio, di secondo ordine se il principio attivo una volta giunto nel tessuto malato entra anche nelle cellule, di terzo ordine quando il farmaco raggiunge il bersaglio nella sua locazione subcellulare, ad esempio il nucleo.

Una volta iniettato *in vivo*, la cinetica di biodistribuzione di un vettore è influenzata da due difese biologiche che deve superare prima di centrare il tessuto bersaglio, la barriera endoteliale dei vasi sanguigni¹⁰⁴ e il sistema dei fagociti mononucleati.

La prima barriera è determinata dalla struttura della parete dei vasi sanguigni (endotelio), la quale è formata da tre strati il cui spessore diminuisce proporzionalmente al calibro del vaso. La parete dei capillari più sottili può risolversi nel solo strato più interno dato dal tubo endoteliale, formato da una membrana basale e da cellule endoteliali unite tra loro da giunzioni. Questa delimita i due compartimenti dentro e fuori del vaso (intra ed extravasale) e regola lo scambio di macromolecole e microparticelle tra di essi.

Le caratteristiche del tubo endoteliale dei capillari variano nei diversi distretti dell'organismo, diventando capillari continui, fenestrati o sinusoidali.

I capillari continui, presenti nel tessuto nervoso, muscolare e connettivo, sono dotati di una lamina ininterrotta e le cellule sono unite tra loro attraverso *tight junctions*.

I capillari fenestrati, propri di pancreas, tubo digerente, corticale del rene e organi linfatici, presentano delle fenestrature tra le cellule (pori) di dimensioni comprese tra i 40 e i 60 nm.

I capillari sinusoidali, che si trovano in organi quali fegato, milza e midollo spinale, hanno forma irregolare con ampie fenestrature (maggiori di 150 nm) e la membrana basale spesso manca o è discontinua.

Le caratteristiche dell'endotelio di un organo determinano la sua permeabilità e il meccanismo con cui avviene il trasferimento di macromolecole e di *drug-conjugates*. L'extravasazione nei tessuti normali in genere avviene per pinocitosi o, in alternativa, per passaggio attraverso le giunzioni intercellulari. Per pinocitosi le molecole di 2-10 nm vengono captate dalle cellule endoteliali, si formano delle vescicole che attraversano il citoplasma e rilasciano il contenuto nello spazio extravasale mediante rifusione con la membrana cellulare. Le particelle più grandi invece possono transitare dal sangue ai tessuti attraverso le fenestrature dei capillari fenestrati (40-60 nm) e del sistema sinusoidale (100 nm e oltre).

L'endotelio dei vasi ha caratteristiche diverse nei tessuti tumorali rispetto a quelli sani,¹⁰⁵ sia per la composizione cellulare della parete, sia nella forma della membrana basale e nelle dimensioni delle fenestrature endoteliali. Sfruttando queste differenze è possibile progettare *drug delivery systems* che direzionino il farmaco al tumore utilizzando l'effetto EPR.

L'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) è un fenomeno di direzionamento passivo verso i tumori che è stato descritto per la prima volta in letteratura 25 anni fa.¹⁰⁶ Questo effetto descrive l'abilità intrinseca di macromolecole e particelle con uno specifico diametro di accumularsi nei tessuti di tumori solidi. Il primo studio a dimostrare questo concetto ha rilevato come una proteina marcata, superiore ai 15 kDa, si accumulasse maggiormente nel tumore rispetto a molecole più piccole e fosse trattenuta per lunghi periodi di tempo. Questo fenomeno è stato attribuito alle caratteristiche uniche di un tessuto malato, come il grande numero di vasi sanguigni, il maggiore trasferimento di sostanze ai tessuti (extravasazione) e ad un basso sistema di recupero linfatico, che comporta una diminuzione significativa del recupero di macromolecole da parte del flusso sanguigno. L'importanza e il potenziale dell'effetto EPR nel *targeting* dei tumori ha aumentato l'interesse verso i fattori che mediano questo effetto. Le caratteristiche che sono state identificate come mediatrice nell'espressione del fenomeno includono l'aumento della permeabilità vascolare e i fattori di vasodilatazione, che in un tumore sono sovraespressi o presenti in grandi quantità rispetto ad un tessuto sano. Anche le differenze anatomiche nella vascolatura tumorale contribuiscono sostanzialmente, come la mancanza di uno strato di muscolo liscio intorno ai vasi sanguigni, che comporta un aumento del flusso di sangue al tumore e maggiore penetrazione delle macromolecole nei tessuti circostanti i vasi.¹⁰⁷ Altri fattori riguardano il peso molecolare, il prolungamento del tempo di circolazione delle nanoparticelle o delle macromolecole e il loro diametro.¹⁰⁸

Per aumentare l'accumulo di un sistema di *delivery* in un tessuto tumorale si può agire su questi fattori, ad esempio aumentando la pressione del sangue, che incrementa l'afflusso nei vasi sanguigni tumorali poichè non hanno il muscolo liscio, ma che allo stesso tempo diminuisce la quantità di

farmaco che giunge agli organi sani, perché la contrazione del muscolo liscio che causa la vasocostrizione e il conseguente aumento della pressione, limita anche l'extravasazione di macromolecole. In modo contrario, si può agire aumentando la vasodilatazione per allargare le porosità tra le cellule endoteliali, ad esempio utilizzando dell'ossido di azoto (NO). Anche alcuni farmaci chemioterapici proinfiammatori, che possono generare radicali superossidi e NO, possono indurre un aumento della permeabilità vascolare, perciò sono chiamati pro-EPR. Una amplificazione dell'effetto EPR si ottiene prolungando il tempo di vita nel plasma del farmaco, della proteina o del *carrier*, mascherandoli con opportuni polimeri, come il PEG. Questi conferiscono un aumento del peso molecolare, ma anche un carattere *stealth*, sopprimono l'antigenicità di alcuni farmaci, diminuiscono l'*uptake* da parte del RES.

Un efficace direccionamento passivo di una molecola o di un vettore verso un tessuto malato non si traduce in una omogenea distribuzione spaziale del farmaco nella massa tumorale, che al contrario è inomogenea e imprevedibile. Le anomalie strutturali e funzionali dei vasi sanguigni e linfatici all'interno della massa solida impediscono il corretto trasporto delle macromolecole o delle nanoparticelle.¹⁰⁹ Infatti, gli anormali gradienti di pressione idrostatica e le forze meccaniche di compressione generate dalla proliferazione cellulare incontrollata, causano il collasso dei vasi sanguigni intratumorali.¹¹⁰ Una terapia potrebbe risultare più efficace decomprimendo questi stessi vasi, a cui consegue un migliore *delivery* nel tumore, anche se potrebbe fornire una via per la formazione di metastasi. Anche altri fattori impediscono una corretta diffusione all'interno del tumore, come la distribuzione, l'organizzazione e i livelli di collagene, decorina e ialurone.¹¹¹

Per questa serie di motivi la diffusione di macromolecole o nanoparticelle varia a seconda della patologia, della localizzazione anatomica e da possibili fattori che influenzano la composizione e la struttura della matrice extracellulare.

Perciò è inerente alla progettazione di un nanosistema la manipolazione e l'ingegnerizzazione della sua superficie. La funzionalizzazione della superficie di un *carrier* con polimeri sintetici può

risolvere i problemi di aggregazione e aumentare il controllo sull'intrazione tra le particelle e con i sistemi biologici. Ad esempio, la copertura con una fosfina polidentata o la modificazione della superficie con diversi polimeri idrofilici rende i Quantum Dots solubili, dispersi e stabili anche in siero.¹¹²

La seconda barriera biologica da superare per un *carrier* è costituita dal sistema dei fagociti mononucleati, che include i monociti del sangue, i macrofagi del tessuto connettivo, degli organi linfatici e del midollo osseo, i macrofagi del polmone, le cellule di Kupffer del fegato e gli osteoclasti dell'osso. Tale sistema è una componente essenziale delle funzioni di difesa dell'organismo. I macrofagi rimuovono, fagocitando, frammenti di tessuto, ma anche micro particolato come liposomi e microsfele. L'azione fagocitaria nei confronti di particelle estranee iniettate varia a seconda delle loro dimensioni e delle caratteristiche superficiali.

1.7.1 Sistemi di targeting verso i tumori

La strategie di direccionamento verso un sito bersaglio per le patologie tumorali che creano masse solide può essere attiva oppure passiva.

Il *targeting* passivo sfrutta l'accumulo di un *carrier* per effetto EPR, senza l'aggiunta di altre componenti che aumentino la specificità verso le cellule bersaglio. Affinchè il direccionamento passivo possa indurre alla massima concentrazione del farmaco, deve essere progettato un vettore di dimensioni opportune, in modo tale che possa conficcarsi nelle fenestrate anomale presenti tra le cellule tumorali, risparmiando i tessuti sani. Inoltre, il sistema di *delivery* dovrà essere opportunamente mascherato per incrementare il tempo di circolazione nei vasi sanguigni e non essere catturato dalle cellule del sistema immunitario. Una delle tecniche più diffuse per realizzare questo tipo di direccionamento è proteggere il vettore con derivati del PEG che, riducendo la cattura da parte del reticolo endoteliale, aumentano il tempo di circolazione del *carrier*.

Il *targeting* attivo si realizza funzionalizzando la superficie del sistema di *delivery* con agenti direzionanti quali anticorpi monoclonali oppure carboidrati, sequenze peptidiche o piccole molecole come l'acido folico. La

creazione di questi sistemi permette al dispositivo di essere riconosciuto e intercettato solo dalle cellule bersaglio. In questo caso il direccionamento è dovuto all'interazione del ligando specifico con antigeni e recettori sovraespressi nelle cellule di un particolare tessuto.

Varie strategie sono state proposte per realizzare un sistema attivo di *targeting*, come la derivatizzazione con la galattosammina, che si è dimostrata utile per direccionare coniugati verso il fegato, grazie agli epatociti ricchi di asialoproteine, che hanno alta affinità per il galattosio. Un altro agente molto sfruttato nel *targeting* attivo verso tumori solidi è l'acido folico, perché molte linee cellulari tumorali sovraesprimono il recettore per il folato. Un altro ancora è la sequenza peptidica RGD (Arginina-Glicina-Acido aspartico) propria delle fibronectine e di altre proteine, che ha alta affinità per le integrine, molecole di adesione che rivestono un ruolo chiave nel processo di angiogenesi. Infine, con l'avvento dell'ingegneria genetica sono state sviluppate tecniche che sfruttano gli anticorpi monoclonali, o dei loro frammenti, per ottenere elevata selettività ed affinità verso il tessuto bersaglio.

I due metodi di direccionamento, sebbene indipendenti tra loro, possono venir combinati opportunamente per aumentare le capacità di discriminazione del sistema tra tessuti normali e patologici.

1.7.2 Anticorpi

Per la diagnosi e la terapia di patologie tumorali sono sempre più utilizzati e studiati gli anticorpi monoclonali (MAbs) specifici per antigeni associati a tumori.

L'avvento della tecnologia degli ibridomi, introdotta nel 1975 da Kohler e Milstein,¹¹³ ha permesso la sintesi di una grande quantità di anticorpi monoclonali con elevata specificità. Ciò ha consentito di sviluppare MAbs nei confronti di numerose linee cellulari tumorali, capaci di guidare il direccionamento attivo anche *in vivo*. Infatti, la *Food and Drug Administration* ha già approvato numerosi MAbs o MAbs-coniugati per l'utilizzo in terapia e nella diagnosi, ma molti altri sono in sperimentazione clinica avanzata. Gli

antigeni sfruttati finora comprendono il recettore HER2, il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), l'antigene carcinoembrionario (CEA), ma anche antigeni associati alle classi linfocitiche, chiamati *cluster designation molecule*.

Sono state proposte diverse strategie per aumentare la potenza dei MAb selettivi verso i tumori. La costruzione di anticorpi umani dell'isotipo IgG1 o IgG3 potrebbe fornire ai MAb la capacità di mediare meccanismi di citotossicità cellulare dipendente dall'anticorpo (ADCC) e citotossicità dipendente dal complemento (CDC). Tuttavia la citotossicità può essere efficace per l'eradicazione di singole cellule tumorali o di piccoli aggregati nei pazienti, ma non è sufficientemente aggressiva verso i tumori più estesi, soprattutto quando il paziente è immunocompromesso. Un'altra strategia arma direttamente il MAb con un agente citotossico come tossine, chemioterapici convenzionali o radionuclidi. Altre modalità alternative per il *targeting* con i MAb comprendono l'uso di immunoliposomi o di strategie di *pretargeting*, ad esempio utilizzando MAb bispecifici.

Nonostante le alternative siano molteplici, il successo dei MAb è stato finora limitato, poiché colpiscono anche le cellule sane, causando una tossicità che limita la dose somministrabile.

L'efficacia con cui i MAb possono indurre il direccionamento attivo *in vivo* dipende principalmente dall'antigene bersaglio, dall'anticorpo monoclonale utilizzato e dal tessuto tumorale che è da raggiungere.

1.7.3 Acido Folico

L'acido folico, noto anche come vitamina B9 o folacina, è un agente di *targeting* di significativo interesse nel campo della terapia antitumorale. Il suo recettore FR (Folate Receptor), noto come la proteina di membrana ad alta affinità per il folato, è notoriamente sovraespresso nei tessuti tumorali.¹¹⁴

FR è una glicoproteina di superficie con un peso molecolare di 38 kDa. Nell'uomo ne sono state identificate tre isoforme, denominate α , β e γ/γ' . FR- α e FR- β sono proteine di membrana ancorate al glicosil-fosfatidil-inositolo

(GPI), mentre FR- γ e FR- γ' sono forme troncate e solubili della proteina, perché prive dell'ancora di GPI.¹¹⁵ FR- α è l'isoforma a più alta affinità per il folato, con una costante di dissociazione KD ~ 0.1 nM, mentre FR- β presenta una KD più alta (KD ~1 nM) e FR- γ intermedia (KD ~ 0.4 nM).¹¹⁶

Il recettore FR ha un'elevata espressione in vari tipi di cancro umano, mentre è assente nella maggior parte dei tessuti normali, tranne che per i plessi corioidei e per la placenta oltre al polmone, tiroide e reni, anche se con livelli di espressione molto bassi.¹¹⁷ FR è frequentemente sovraespresso in cellule tumorali *in vitro* e in tumori epiteliali, in particolare nel carcinoma ovarico (90% dei casi), di cui costituisce anche un utile *marker*.¹¹⁸ Il recettore è sovraespresso anche nelle patologie oncologiche dell'endometrio, del cervello, del polmone, del seno e del rene.¹¹⁹ L'isoforma FR- α è sovraespressa nei tumori maligni epiteliali, mentre quella FR- β in sarcomi e leucemie mieloidi. Data la diffusione di questo recettore sono state riposte numerose speranze per il *targeting* attivo di patologie oncologiche. (Alcuni risultati sono stati ottenuti, tanto che alcuni *carrier* funzionalizzati con il folato sono stati approvati e commercialmente disponibili, anche se i risultati presenti in letteratura sono a volte contrastanti.)

Il recettore dell'acido folico è posizionato fisiologicamente solo nella membrana apicale delle cellule epiteliali, in una zona inaccessibile al flusso sanguigno. Perciò, un tessuto sano è normalmente protetto dall'azione di farmaci derivatizzati con acido folico, mentre il recettore diventa accessibile al flusso ematico per le cellule maligne, a causa della perdita della polarità delle cellule.

I motivi della sovraespressione di FR nei tessuti tumorali rimangono non del tutto chiare. Innanzitutto, il folato è essenziale per la sopravvivenza delle cellule perché, dopo l'attivazione a tetraidrofolato, è richiesto per numerosi processi biochimici, come la biosintesi delle basi di DNA e RNA e le reazioni di transmetilazione. Poiché l'acido folico rientra nei processi di replicazione del materiale genetico, si comprende come sia particolarmente importante per cellule in rapida divisione come quelle tumorali. Inoltre, elevati livelli di FR inducono proliferazione cellulare non solo mediando l'*uptake* del folato, ma anche generando segnali regolatori. Infatti, l'FR partecipa ad un complesso

macromolecolare che genera segnali intracellulari che modulano processi di sopravvivenza e proliferazione cellulare.¹²⁰

Le cellule, tramite specifici recettori, sono in grado di endocitare diversi tipi di macromolecole. L'internalizzazione del folato segue un processo di endocitosi attivato dal FR, mediante la formazione di vescicole non rivestite di clatrina (potocitosi). Il recettore è raggruppato in caveole ovvero piccole invaginazioni della membrana non rivestite. Queste si chiudono in risposta all'interazione tra folato e FR, creando vescicole che rimangono legate alla membrana plasmatica. La sacca vescicolare viene rapidamente acidificata intorno a pH 5, per azione di pompe protoniche situate a livello della membrana delle vescicole endosomiali. In ambiente acido, la vitamina si stacca dal suo recettore, oltrepassa la membrana della vescicola grazie ad una proteina *carrier* e passa nel citoplasma, mentre le caveole si aprono e riespongono il recettore nello spazio extracellulare.¹²¹

Sono state sviluppate due diverse strategie per il *targeting* di farmaci che sfruttano l'interazione con il recettore dell'acido folico. Il primo utilizza degli anticorpi monoclonali ed ha due grandi svantaggi, rappresentati dalle dimensioni dell'anticorpo che conferisce una bassa capacità di diffusione attraverso barriere biologiche, e dalla immunogenicità, che non consente somministrazioni ripetute. La seconda strategia sfrutta il legame di un farmaco direttamente con l'acido folico, molecola di piccole dimensioni (PM 441,4 g mol⁻¹) con bassa immunogenicità, stabile, non costosa e di pronta disponibilità, facilmente modificabile, con elevata affinità per il suo recettore e che viene endocitata molto efficacemente. È stato inoltre dimostrato che il folato se è covalentemente legato ad una macromolecola *carrier*, come il PEG, tramite il suo residuo γ -carbossilico, allora la sua affinità per FR rimane inalterata.¹²² Risulta quindi più promettente l'uso del ligando endogeno rispetto a quello di un anticorpo monoclonale.¹²³

Il *targeting* con l'acido folico è una strategia promettente sia per i farmaci che richiedono il rilascio intracellulare, perché svolgono la loro azione all'interno delle cellule bersaglio, sia per quelli che non richiedono internalizzazione poiché agiscono in superficie.¹²⁴ Nel primo caso, FR offre un percorso di endocitosi per il trasporto del farmaco nelle cellule tumorali,¹²⁵

nel secondo caso FR può agire semplicemente da marcatore tumorale, incrementando la concentrazione del farmaco sulla superficie delle cellule malate.¹²⁶

E' noto che anche la coniugazione di nanoparticelle con l'acido folico sia efficace per il *targeting* tumorale: i coniugati vengono internalizzati efficacemente dalle cellule tumorali tramite il processo già descritto di endocitosi mediata dal recettore FR.

1.7.4 Biotina

Il sistema avidina-biotina è una interessante opzione nel *targeting* di farmaci, grazie alla altissima selettività e affinità della biotina per l'avidina, così come per la streptavidina ($K_d \sim 10^{-15}$ M).

L'avidina è una glicoproteina a basso peso molecolare (66 kDa) che si trova nell'albume dell'uovo ed è chiamata così proprio per la sua forte avidità nei confronti della biotina, ovvero la vitamina H, piccola molecola di 244 Da. La biotina è una molecola solubile in acqua, viene assunta con l'alimentazione ed è molto conosciuta in ambiente biochimico, poiché è un cofattore enzimatico nelle carbossilazioni del substrato come, a titolo di esempio, nella carbossilazione del piruvato nella gluconeogenesi.

La streptavidina, una proteina di 60 kDa prodotta dallo *Streptomyces avidinii*, ha caratteristiche di affinità alla biotina simili all'avidina. Avidina e streptavidina possono intercettare fino a quattro molecole di biotina. Entrambe le proteine sono omotetrameri, cioè costituite da quattro sub-unità identiche, ciascuna delle quali possiede un singolo sito di legame per la biotina. Il sistema avidina-biotina è noto da molti anni ed è ampiamente utilizzato in immunostochimica, in saggi enzimatici e in biologia molecolare.¹²⁷

L'avidina e la streptavidina presentano delle differenze nelle proprietà biochimiche. L'avidina è altamente glicosilata,¹²⁸ infatti, circa il 10 % della sua massa è costituita da zuccheri, come glucosammina e mannosio. Inoltre, l'avidina contiene il doppio di amminoacidi basici quali lisina e arginina rispetto alla streptavidina, perciò è carica positivamente con un punto

isoelettrico vicino a 10. La streptavidina non contiene residui zuccherini e il suo punto isoelettrico è più basso, nell'intervallo tra 5 e 8. Queste differenze determinano la loro differente farmacocinetica e biodistribuzione quando sono somministrate *in vivo*. Scendendo più nel particolare, l'avidina viene rapidamente rimossa dal circolo sanguigno e si accumula nel fegato,¹²⁹ mentre la streptavidina ha un tempo di circolazione maggiore e presenta minore *binding* aspecifico per i tessuti sani. La presenza degli zuccheri nelle proteine è determinante per la velocità di clearance delle due proteine. Infatti, se l'avidina viene deglicosilata o neutralizzata, aumenta il suo tempo di vita plasmatica, mentre se la streptavidina viene funzionalizzata con galattosio, la sua velocità di clearance aumenta in modo proporzionale alla quantità di zucchero legato.¹³⁰ Sulla base del loro diverso comportamento *in vivo*, avidina e streptavidina trovano applicazione in protocolli terapeutici differenti. In radioimmunoterapia si sceglie di usare l'avidina come *clearing agent* di anticorpi biotinilati circolanti, mentre si preferisce la streptavidina per formare immunoconiugati con un anticorpo.

Streptavidina e avidina si accumulano spontaneamente nei tumori senza altri agenti di direccionamento, per questo sono utilizzate nelle terapie e nelle diagnosi oncologiche. Hnatowich ha osservato che la streptavidina radiomarcata ha maggior selettività per i tessuti tumorali rispetto a un anticorpo radiomarcato,¹³¹ inoltre può essere usata per la localizzazione di siti infetti oppure come agente di *pretargeting* seguito dalla somministrazione di una biotina radiomarcata.¹³² L'azione di *pretargeting* con streptavidina ha dimostrato di essere più efficiente rispetto ad una biotina coniugata ad un anticorpo specifico. La streptavidina ha dimostrato invece minore efficacia di accumulo rispetto all'avidina, se è somministrata per via intraperitoneale per rilevare patologie in questa zona.¹³³

Il preciso meccanismo di *binding* dell'avidina alle cellule tumorali non è ben definito, ma si ritiene sia dovuto al suo alto grado di glicosilazione e al suo punto isoelettrico. L'avidina subisce anche *uptake* cellulare, perciò potrebbe agire da vettore per il *delivery* di radionuclidi, farmaci, tossine o geni terapeutici a tumori intraperitoneali.

Il sistema avidina-biotina ha trovato interessanti applicazioni cliniche nell'immunoistochimica, nella radioimmunoterapia e nella chirurgia radioimmunoguidata.

L'immunoistochimica rileva determinate sostanze in una sezione di tessuto, avvalendosi delle interazioni tra antigene e anticorpo ed evidenziando l'immunocomplesso che viene a formarsi con metodi enzimatici o fluorescenti. La metodica può essere diretta o indiretta. Nelle metodiche dirette, per intercettare una certa molecola, si utilizza un unico anticorpo funzionalizzato con un marcatore. Nelle metodiche indirette si utilizzano due anticorpi, di cui uno individua la molecola da ricercare, mentre il secondo anticorpo si lega al primo ed è dopato con un marcatore. Un problema di questi protocolli è la scarsa sensibilità di rilevazione per il marcatore, soprattutto per il metodo diretto, poiché l'anticorpo è meno marcato, a differenza del metodo indiretto dove l'anticorpo primario può accogliere più anticorpi secondari. Il complesso biotina-avidina può essere sfruttato per ottenere una amplificazione del segnale. Infatti, ogni avidina accoglie fino a quattro molecole di biotina, quindi alla proteina è possibile legare quattro entità biotinilate differenti, come un anticorpo e tre marcatori, triplicando il segnale del dispositivo. Questo sistema è utilizzato in alcuni kit commerciali, soprattutto con l'enzima perossidasi.

La radioimmunoterapia, cui ho già accennato in precedenza, è una tecnica per il trattamento dei tumori che utilizza anticorpi monoclonali marcati con radionuclidi. La sua applicazione è limitata dalla scarsa selettività degli anticorpi radioattivi, che si accumulano soprattutto nei reni, nel fegato e nel midollo osseo, creando sensibili effetti collaterali. Il sistema avidina-biotina è stato proposto come strumento di *pretargeting*¹³⁴ basato sulla somministrazione separata dell'anticorpo monoclonale e dell'agente radioattivo, in modo tale da riuscire a caricare di radioattività solo quegli anticorpi legati alle cellule malate.

Il protocollo è suddiviso in tre fasi, in cui al paziente vengono somministrati nell'ordine:

- 1) anticorpi monoclonali biotinilati: raggiungono i tessuti bersaglio nell'arco di 24-48 ore.

- 2) Avidina: si lega all'anticorpo biotinilato. L'avidina in eccesso viene metabolizzata a livello epatico.
- 3) Biotina marcata con isotopi radioattivi: viene somministrata una volta che gli anticorpi non legati sono stati eliminati. La biotina radioattiva si lega all'avidina presente nel tumore e raggiunge in pochi minuti il suo target specifico, provocandone la distruzione. La biotina radioattiva non legata al tumore viene rapidamente eliminata attraverso i reni. (Immagine)

A questo primo protocollo terapeutico sono poi seguiti anche altri protocolli a due soli stadi, che prevedono la somministrazione prima di un anticorpo biotinilato o di un anticorpo coniugato alla streptavidina e poi rispettivamente di una streptavidina marcata o di una biotina marcata.

Finora questo tipo di radioimmunoterapia è stata applicata solo nei casi di patologie oncologiche in stato avanzato, poiché si tratta ancora di una terapia sperimentale. I tumori risultati più sensibili a questo trattamento sono quelli cerebrali, in particolare il glioblastoma, i linfomi e in alcuni casi i tumori al seno e all'ovaio.

Il sistema di *pretargeting* avidina-biotina rappresenta comunque un modello di radioimmunoterapia mirata molto promettente per la terapia del cancro e, in teoria, è applicabile a tutti i tipi di tumore per i quali siano disponibili anticorpi specifici, anche se richiede strutture idonee all'utilizzo di radioisotopi. Lo svantaggio principale di questo trattamento, comune a tutte le tecniche di *pretargeting*, sono le iniezioni ripetute a definiti intervalli di tempo. In aggiunta, l'avidina e la streptavidina possono presentare immunogenicità. Inoltre, questi protocolli non possono essere applicati se gli anticorpi subiscono veloce uptake cellulare, perché viene vanificato il direccionamento dell'agente radioattivo.

Sebbene siano necessarie ulteriori indagini, gli studi finora sostengono l'ipotesi che il sistema avidina-biotina possa aiutare il *delivery* di farmaci e di nanoparticelle per curare patologie oncologiche.

1.8 Tossicità

È già stato sottolineato che un nanomateriale ha un'area superficiale enormemente più grande rispetto allo stesso materiale in *bulk*: ciò si traduce in un elevatissimo rapporto tra area e volume. Questa particolarità conferisce ai nano-oggetti delle caratteristiche peculiari uniche, come l'elevata bioattività. Le proprietà della superficie sono fortemente modulabili se si agisce sulla forma del nanooggetto oppure sulla funzionalizzazione della superficie con opportune molecole. Tuttavia il nanomateriale o i gruppi funzionali che leghiamo alla superficie potrebbero avere effetti tossici.¹³⁵ Questo aspetto sta acquisendo sempre maggiore peso per le nanotecnologie, poiché i nanomateriali stanno invadendo ogni campo della scienza da cui derivano i numerosi prodotti commerciali ormai disponibili, che spesso sono di largo consumo e/o utilizzati per la salute. Perciò lo sviluppo di nuovi nanomateriali per applicazioni mediche deve essere accompagnato da studi di tossicità, affinché l'incremento delle prestazioni di un farmaco o di una tecnica diagnostica non siano vanificate dagli effetti collaterali indotti dal nanomateriale. Questo area della nanomedicina presenta sfide importanti, perché deve affrontare dei problemi biologici molto complessi, sia *in vitro* che *in vivo*, e la comprensione dei meccanismi con cui avvengono è solo nelle prime fasi di studio. Ciò comporta che, allo stato attuale, per uno stesso nanomateriale vengono fornite opinioni discordanti sulla sua tossicità. Si possono citare vari esempi, ma mi soffermerò solo sulle nanoparticelle di silice.

La silice stessa è ritenuta biocompatibile e questa proprietà viene spesso trasferita alle nanoparticelle. Dalle prove tossicologiche eseguite *in vitro* per le nanoparticelle di silice sono però emersi dei risultati contrastanti. Infatti, secondo Lin, sia le particelle da 15 nm che da 50 nm mostrano una citotossicità *in vitro* dose dipendente simile: la tossicità accresce con la dose e con l'aumento del tempo di esposizione.¹³⁶

L'esposizione alla silice comporta un aumento dei livelli di ROS e una riduzione della concentrazione di glutathione, indice di un incremento dello stress ossidativo. Secondo Chang, le nanoparticelle di silice sono tossiche ad

alti dosaggi e le cellule con lunghi tempi di duplicazione più lunghi sono più suscettibili agli effetti tossicologici rispetto a quelle con tempi di duplicazione più brevi.¹³⁷

Altri studi hanno osservato una significativa riduzione della vitalità cellulare solo a concentrazioni superiori a 0,1 mg/ml. Inoltre è stata riscontrata una citotossicità legata alla linea cellulare esaminata.¹³⁸

Al contrario, per nanoparticelle di silice cationiche, funzionalizzate con amminoesilamminopropiltrimetossisilano, non è stata osservata alcuna particolare tossicità.¹³⁹

2. Obiettivi del progetto di ricerca

L'ultimo decennio ha assistito, come abbiamo visto nell'introduzione, ad una vera esplosione dell'interesse verso l'applicazione delle nanotecnologie alla medicina, a tal punto che il National Institute of Health (USA) ha coniato il termine "nanomedicina" ad indicare le applicazioni nanotecnologiche in campo medico-biologico. Le possibili applicazioni dei nanosistemi in biologia e medicina sono molteplici e alcuni esempi sono già stati discussi in questa tesi. Ciò che è apparso in modo evidente nei primi studi è che la nanotecnologia offre non solo la possibilità di migliorare le tecniche correntemente in uso, ma potrebbe permettere soprattutto di sviluppare nuovi traguardi e nuove possibilità. Infatti, manipolando gli agenti terapeutici ed altri materiali su scala nanometrica, le proprietà fondamentali e la bioattività degli stessi possono venir modificate e adattate alle più svariate esigenze.

Come abbiamo visto, la terapia fotodinamica (PDT) è una modalità terapeutica per il trattamento del cancro e di altre malattie che sfrutta l'irraggiamento di un farmaco fotoattivo (un fotosensibilizzatore) con la luce e l'ossigeno tissutale. Il fotosensibilizzatore eccitato trasferisce la sua energia direttamente all'ossigeno molecolare o a substrati biologici presenti nell'ambiente cellulare, generando ossigeno in stato di singoletto e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS): queste attaccano prontamente componenti vitali delle cellule causando la morte cellulare. Si tratta quindi di una terapia che sfrutta la combinazione di elementi non tossici e, almeno nel caso della luce, facilmente direzionabili per ottenere l'effetto terapeutico solo nei tessuti malati e non nelle aree sane dell'organismo.

Diversi fotosensibilizzatori, per lo più macrocicli tetrapirrolici come porfirine e clorine, sono stati proposti per l'impiego in PDT. Alcuni dei limiti principali di questi farmaci, come la scarsa solubilità in acqua, la limitata selettività, e la tossicità al buio, potrebbero essere superati somministrando il principio attivo associato a opportuni sistemi di trasporto. Un grosso vantaggio

nella realizzazione di sistemi di trasporto per fotosensibilizzatori sta nel fatto che non vi è necessità che il farmaco venga rilasciato dal vettore, ma è sufficiente una buona permeabilità all'ossigeno per consentire la produzione e il rilascio dell'ossigeno di singoletto.

Lo scopo del mio progetto di ricerca è stato proprio la realizzazione di nuovi nanovettori per il trasporto di fotosensibilizzatori. Questi studi sono stati svolti all'interno di un progetto europeo più ampio, il progetto "Nanophoto", le cui finalità sono descritte nella prefazione di questo elaborato di tesi. In particolare il fotosensibilizzatore protagonista del progetto è la metatetraidrossifenilclorina (Foscan®), già approvato e commercializzato come farmaco antitumorale.. I vettori sui quali mi concentrerò saranno le nanoparticelle di silice. Abbiamo già evidenziato come queste stiano attraendo sempre più interesse come carrier per la PDT per i numerosi vantaggi che presentano: trasparenza alla luce, biocompatibilità, facilità di preparazione, porosità che le rende permeabili all'ossigeno.

In letteratura sono descritti vari protocolli di sintesi che portano alla preparazione di particelle con proprietà diverse in termini di densità, porosità, densità di carica superficiale. Anche l'introduzione di molecole organiche nella matrice silicea può essere effettuata in modi diversi che sfruttano l'intrappolamento o la funzionalizzazione chimica. Saranno esplorate quindi diverse metodologie di sintesi di nanoparticelle di silice contenenti fotosensibilizzatori per valutarne i vantaggi in termini di inclusione delle molecole organiche, l'eventuale modificazione delle loro proprietà fotochimiche e l'influenza delle proprietà delle particelle sulla attività biologica. Successivamente le particelle verranno funzionalizzate sulla superficie con derivati del poli(etilenglicole) (PEG), per evitarne la cattura da parte delle cellule fagocitiche del sistema immunitario oltre ad alterarne favorevolmente la farmacocinetica. La tappa successiva sarà la preparazione di nanoparticelle coniugate con ligandi specifici per recettori sovraesposti nelle cellule tumorali o con anticorpi selettivi verso le cellule tumorali stesse. Ciò permetterà di rendere più selettivo il direccionamento del fotosensibilizzatore verso il tessuto di interesse, riducendo così l'insorgenza di danni nei confronti delle cellule sane. Anche in questo caso dovranno essere

messi a punto efficaci metodi di coniugazione che permettano la facile introduzione dei ligandi scelti senza modificarne le caratteristiche. Infine, le nanoparticelle realizzate saranno sottoposte ad indagine per determinarne la struttura, le caratteristiche e l'efficacia nell'indurre la foto produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS). Al di fuori, ma strettamente connesse al mio lavoro sperimentale, vi saranno numerose indagini biologiche volte ad accertare la biocompatibilità, la tossicità, la biodistribuzione e l'efficacia terapeutica dei nano sistemi da me prodotti. I principali risultati di tali ricerche saranno riassunti in forma sommaria nell'ultime parte della tesi.

3. Risultati e Discussione

3.1.1 Sintesi di derivati trialcossilano di composti fluorescenti

Nel capitolo introduttivo di questa tesi di dottorato sono state descritte le diverse metodologie disponibili in letteratura per la preparazione di nanoparticelle di silice, che differiscono per le condizioni di reazione, per il tipo di precursori utilizzati e per le proprietà finali delle particelle ottenute. A seconda del metodo di preparazione, l'inclusione di un composto organico nelle particelle può richiedere o meno una sua modificazione chimica, per dotarlo di gruppi trialcossilano in grado di ancorare covalentemente la molecola alla matrice silicea della particella. Infine, è anche facile prevedere che le caratteristiche di un fotosensibilizzatore incluso possano essere influenzate dalle proprietà e dalla composizione della particella stessa.

Partendo da queste considerazioni, mi sono proposto, come primo stadio del mio lavoro di ricerca, di analizzare le proprietà di fotosensibilizzatori o composti fluorescenti inclusi in particelle di silice preparate con diverse metodologie, in modo da verificare il più adatto alla realizzazione del *carrier*.

Per questi studi preliminari ho ritenuto opportuno non utilizzare l'm-THPC per due motivi: in primo luogo, questa molecola è molto costosa e disponibile in scarsa quantità. In secondo luogo, poichè studi precedenti, che ho menzionato nel capitolo precedente, suggerivano che potesse essere necessario l'utilizzo di un derivato in grado di legarsi covalentemente alle particelle, in modo da garantire che i risultati ottenuti non fossero inficiati dal rilascio del fotosensibilizzatore dalle particelle, ho deciso di preparare alcuni composti fluorescenti dotati di residui trialcossilano.

Come buon candidato a fungere da modello dell' m-THPC ho individuato la 5-(p-amminofenil)-15,20-trifenil-porfirina (TPP-NH₂). Questa porfirina, infatti, è disponibile commercialmente, ma è anche facilmente

sintetizzabile e inoltre presenta caratteristiche di solubilità, proprietà fotofisiche e anche dimensioni non molto diverse da quelle dell' m-THPC. Infine, il gruppo amminico della porfirina consente la facile funzionalizzazione con un gruppo trialcossisilano, che può essere ottenuta utilizzando il derivato 3- isocianatopropiltrietossilano (APTES), disponibile in commercio.

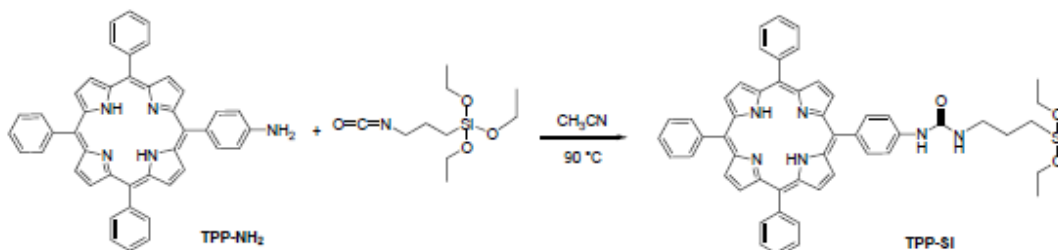


Figura 9: schema di sintesi della TPP-Si

La sintesi prevede semplicemente la reazione della TPP-NH₂ con un largo eccesso del derivato isocianato in CH₃CN, per formare il derivato ureidico TPP-Si (Figura 9). Il prodotto viene ottenuto con resa quantitativa (rispetto alla porfirina) e purificato tramite precipitazioni con *n*-esano. Questa strategia sintetica ha il vantaggio di non richiedere ulteriori purificazioni cromatografiche, che sono sempre molto difficoltose con derivati trialcossisilani, a causa dell'elevata reattività che questi presentano nei confronti delle fasi stazionarie utilizzate.

Seguendo la stessa procedura, ma utilizzando butilisocianato come reagente, ho anche preparato la TPP-butile, da utilizzare come modello di confronto nella misura delle proprietà delle nanoparticelle di silice contenenti la TPP-Si.

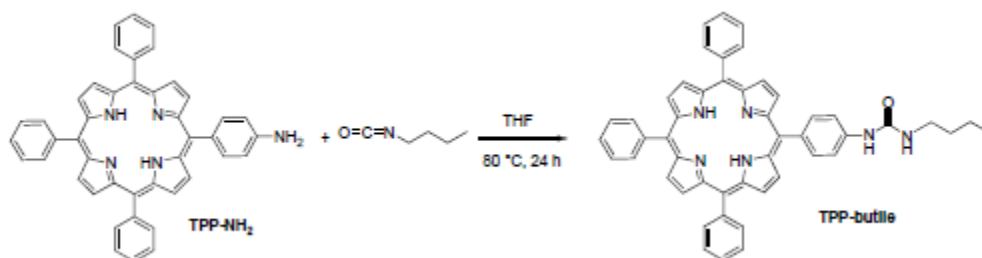


Figura 10: schema di sintesi della TPP-butile

In alcuni casi, la porfirina presenta caratteristiche non ottimali per lo studio preliminare delle proprietà delle nanoparticelle di silice. Questo si

verifica soprattutto negli studi biologici, dove gli strumenti utilizzati, quali microscopi a fluorescenza o citofluorimetro, sono solitamente ottimizzati per l'utilizzo di fluorofori con caratteristiche differenti, quali fluoresceina, rodamina e cianine. Per queste applicazioni sarebbe stato quindi utile disporre di una serie di molecole fluorescenti funzionalizzate con gruppi trialcossilano, in modo da poter scegliere i più indicati alle diverse applicazioni.

Nel laboratorio in cui ho svolto il mio lavoro di tesi era già disponibile il derivato trietossisilano della rodamina B (figura 11).

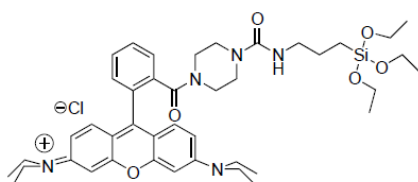


Figura 11: formula di struttura del derivato trietossisilano della Rodamina B

Ho deciso quindi di completare la serie dei composti fluorescenti preparando un derivato di una cianina: queste molecole infatti presentano un forte assorbimento nella regione del rosso e sono particolarmente indicate per l'*imaging* di fluorescenza in vivo. La scelta è caduta sul derivato IR775-Cl, disponibile commercialmente, che è stato fatto reagire in presenza di un eccesso di 3-aminopropil-trietossisilano (APTES) in DMF (figura 12).

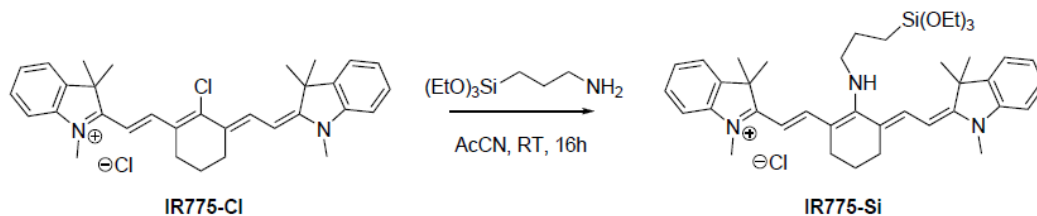


Figura 12: schema di sintesi della cianina IR775-Si

La sostituzione dell'atomo di cloro da parte del gruppo amminico porta alla formazione di un derivato contenente il gruppo trialcossilano, ma in questo caso risulta necessaria una purificazione cromatografica e la resa della reazione risulta conseguentemente molto bassa. Il composto IR775-Si presenta una banda di assorbimento a 638 nm e un'emissione centrata a 740 nm.

Poiché il fluorescente IR775-Si ha dimostrato problemi di stabilità durante la sintesi delle nanoparticelle, ho scelto un'altra cianina commerciale, la CHROMIS 678 Z-amine. Questa ha caratteristiche di assorbimento e di fluorescenza simili alla cianina IR775-Si e il suo gruppo amminico consente la facile funzionalizzazione con un gruppo trialcossilano, come nel caso della porfirina TPP-NH₂, che può essere ottenuta utilizzando il derivato 3- isocianatopropiltriectossilano (APTES).

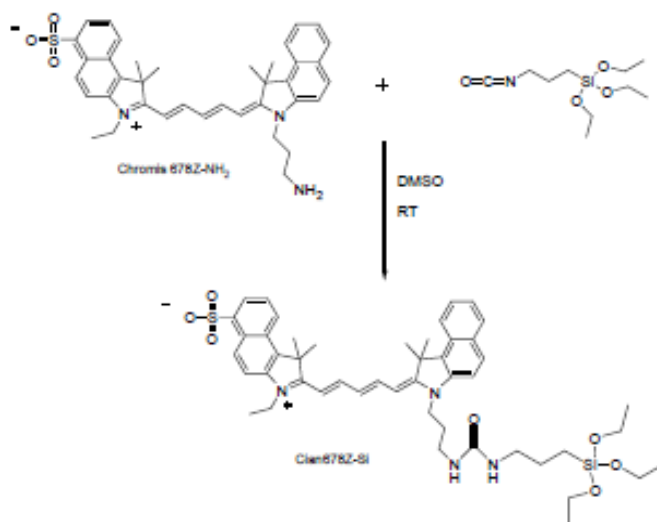


Figura 13: scema di sintesi per la cianina Cian678ZSi

La sintesi prevede la reazione della cianina con un equivalente di silano in DMSO per una notte a temperatura ambiente. Il derivato che ho chiamato cian678z-Si viene utilizzato nella sintesi delle nanoparticelle senza ulteriori purificazioni.

3.1.2 Scelta del metodo di preparazione delle nanoparticelle

Una volta realizzati i derivati fluorescenti, il passo successivo è stata la preparazione delle nanoparticelle. Come già discusso nell'introduzione, esistono sostanzialmente tre metodi per la preparazione di nanoparticelle di silice. Il primo e più utilizzato è il detto metodo di Stöber che prevede la polimerizzazione di tetraetossisilano (TEOS) in una soluzione di etanolo contenente piccole quantità di acqua e ammoniaca. In questo caso, è possibile includere composti organici all'interno delle nanoparticelle solo quando essi siano dotati di gruppi trialcossilano.

Il secondo protocollo di sintesi prevede la polimerizzazione del TEOS in microemulsioni in fase inversa stabilizzate da un tensioattivo. Questo metodo consente l'inclusione di molecole organiche idrosolubili senza una loro preliminare funzionalizzazione con gruppi trialcossilano: infatti, queste si concentrano nella "piscina" d'acqua delle micelle inverse e vengono intrappolate nella matrice silicea.

Il terzo metodo è quello studiato da Prasad e sta attraendo attenzione sempre maggiore per la sintesi di nanoparticelle di silice dopate con molecole organiche. Questo protocollo di sintesi prevede la polimerizzazione del viniltrietossisilano (VTES) in micelle di tensioattivi in acqua. In questo caso si ottengono particelle di silice organicamente modificata (ORMOSIL) ed è possibile introdurre molecole organiche idrofobiche senza una loro preliminare funzionalizzazione. Di nuovo, infatti, il composto concentrato nel nucleo idrofobico della micella viene intrappolato dalla matrice di silice.

Evidentemente, solo il primo ed il terzo metodo presentano caratteristiche adatte agli scopi del progetto, dal momento che la seconda metodica consente l'introduzione nelle particelle di silice solo di molecole idrofiliche. I due protocolli restanti presentano entrambi vantaggi e svantaggi: mentre il metodo di Prasad è molto attraente poiché non richiede la modificazione chimica delle particelle, il metodo di Stöber non prevede l'uso di tensioattivi e rende quindi molto più semplice la purificazione delle

particelle stesse. Pertanto, ho deciso di investigare entrambi i metodi di preparazione.

Nanoparticelle di silice del diametro di circa 35 nm e dopate con il derivato TPP-Si a basso loading (<0,5%) sono state preparate con il metodo di Stöber (polimerizzazione di TEOS in etanolo/acqua/ammoniaca), il metodo di Prasad (polimerizzazione di VTES in micelle di AOT/n-butanolo in acqua) ed una modificazione del metodo di Prasad, la quale prevede l'utilizzo di propil-trietossisilano (PTES) al posto del VTES. Infatti, è noto che l' $^1\text{O}_2$ dà reazione di addizione ad alcheni, perciò mi è sembrato possibile che l'uso del VTES potesse portare ad una minor generazione di $^1\text{O}_2$ da parte del fotosensibilizzatore intrappolato nelle particelle.

3.1.3 Caratterizzazione fotofisica delle nanoparticelle

Con le diverse preparazioni ho eseguito degli studi preliminari di fluorescenza, che hanno rivelato una minore resa quantica di fluorescenza per la porfirina nelle nanoparticelle di tipo Stöber. La caratterizzazione fotofisica completa è invece stata eseguita dal Prof. MacRobert, uno dei partner del progetto Nanophoto, presso i laboratori dell'University College di Londra. Sono state acquisite misure fotofisiche in stato stazionario, come ad esempio la resa quantica di fluorescenza e di produzione dell'ossigeno di singoletto, e altre risolte nel tempo atte a verificare il tempo di vita di fluorescenza e dell'ossigeno di singoletto. Queste misure hanno consentito di valutare non solo il protocollo di sintesi più adatto agli scopi del progetto, ma anche l'influenza della matrice silicea sulle proprietà del fotosensibilizzatore che è covalentemente legato ad essa. Infatti, le misure dei tempi di vita di fluorescenza sono un'immagine indiretta dello stato del fotosensibilizzatore all'interno del sistema. Tempi di vita molto brevi (*quenching*) indicano uno stato di aggregazione delle molecole del fluoroforo, mentre tempi maggiori indicano una aggregazione assente o comunque molto limitata. A titolo di esempio per tutte le misure effettuate dal Prof. MacRobert, riporto i tempi di vita di fluorescenza della porfirina TPP-Si nei diversi nanosistemi.

Vediamo dalla figura 14 che nelle nanoparticelle di tipo Stöber (sample 1) il tempo di vita di fluorescenza della porfirina inclusa sia molto breve rispetto alla porfirina libera, mentre non si notano differenze sostanziali per tutti gli altri nanosistemi sintetizzati con la procedura proposta da Prasad.

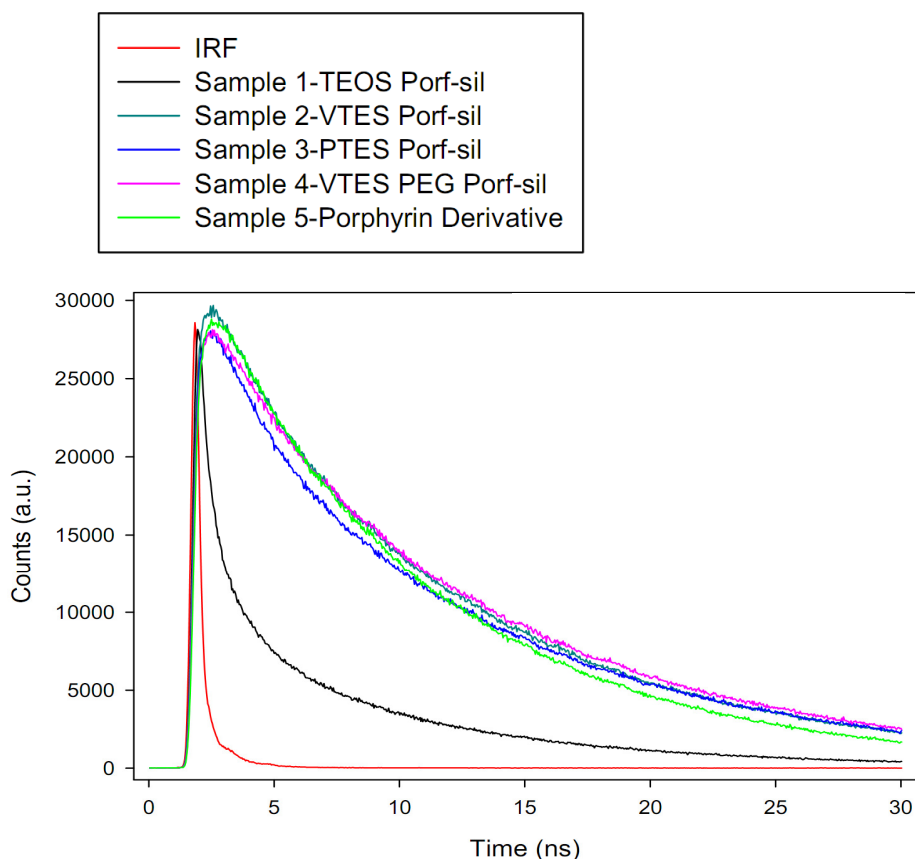


Figura 14: tempi di vita di fluorescenza per la porfirina TPP-Si in diverse nanoparticelle di silice.

Queste misure indicano una aggregazione del fotosensibilizzatore nelle nanoparticelle di tipo Stöber anche a basso loading del dopante. L'aggregazione causa anche una diminuzione sostanziale della resa di produzione di $^1\text{O}_2$ e ciò induce a considerare questo protocollo di sintesi inadatto agli scopi del progetto. Al contrario la procedura di Prasad sembra preservare le caratteristiche del dopante porfirinico, indice di un suo incapsulamento in forma monomerica o debolmente aggregata. Sulla base di questi risultati ho scelto la metodologia di sintesi di Prasad per sintetizzare i miei nanovettori.

3.2 Nanoparticelle PEGilate

3.2.1 Sintesi del precursore PEG-Si

Una volta identificata la procedura migliore per sintetizzare i miei *carrier*, l'attenzione è stata spostata sulla funzionalizzazione della loro superficie con il polietilenglicole (PEG). Infatti, le nanoparticelle di silice iniettate *in vivo* sono rapidamente fagocitate dalle cellule del sistema immunitario, poiché i gruppi silanolici deprotonati sulla superficie, che da una parte conferiscono alle particelle stabilità colloidale per le interazioni elettrostatiche repulsive, ma dall'altra attirano le opsonine del sistema immunitario e attivano i processi di difesa dell'organismo. Inoltre la repulsione tra superfici delle particelle cariche negativamente dipende dalla costante dielettrica del solvente, per cui la stabilità colloidale viene meno in presenza di sali disciolti, come nel caso dei fluidi biologici, e le nanoparticelle precipitano. La somma di tutti questi fattori fa sì che il vettore venga rapidamente eliminato dalla circolazione del sangue, senza avere il tempo necessario per raggiungere il suo tessuto *target*. Per questo motivo è necessario dotare il nanovettore di un *coating* che aumenti la stabilità delle particelle in ambiente biologico e prevenga la cattura da parte del RES. Per ottenere un simile risultato solitamente vengono utilizzati dei polimeri derivati del polietilenglicole (PEG) o degli zwitterioni, che impediscono o quanto meno limitano l'assorbimento delle proteine. Le procedure di letteratura fanno uso di derivati trialcossilano che reagiscono con la superficie delle particelle preformate. Questo approccio ha dimostrato dei limiti, poiché in molti casi la percentuale di ricopertura è bassa, oppure vengono utilizzate condizioni di reazione (temperatura elevata, presenza di acidi) incompatibili con la presenza di un fotosensibilizzatore.

Analizzando le caratteristiche della sintesi di Prasad ho progettato una diversa strategia di PEGilazione: con questa reazione la formazione della particelle avviene probabilmente per polimerizzazione di goccioline di VTES, la cui superficie è stabilizzata dal tensioattivo. Normalmente si utilizza un

tensioattivo anionico (AOT), ma possono essere utilizzati anche surfattanti neutri, quali il *Brij* o il *Tween*. Questi ultimi non sono altro che catene di PEG (che costituisce la testa idrofilica) dotate a un'estremità di una catena alchilica (che costituisce la coda idrofobica).

Mi è quindi sembrato plausibile che un derivato del PEG (che chiamerò PEG-Si), funzionalizzato ad un'estremità con un residuo idrofobico contenente un gruppo trialcossisilano, potesse presentare caratteristiche simili ad un tensioattivo e posizionarsi nell'interfaccia acqua/fase organica delle microemulsioni. Con questo approccio la catena polimerica può legarsi alla superficie contemporaneamente alla formazione della nanoparticella.

Per esplorare questa ipotesi ho sintetizzato il derivato PEG-Si (figura 15) per reazione di PEG₂₀₀₀-NH₂ con un eccesso di 2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano a refluxo in diclorometano in presenza di una base, seguita da una purificazione per precipitazione del prodotto a freddo in EtOH/MTBE.

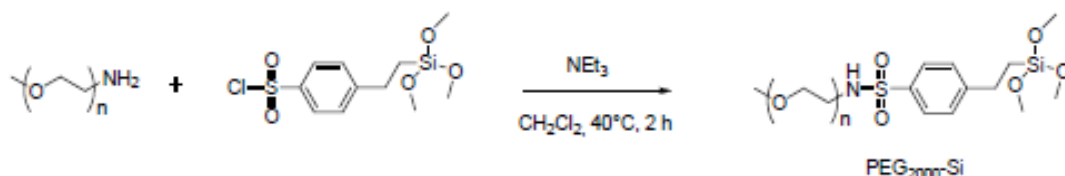


Figura 15: schema di sintesi per il PEG₂₀₀₀-Si

L'uso del derivato trimetossisilano permette di introdurre nella molecola di PEG un residuo (il gruppo (2-trietossisilil)etil-fenile) in grado di conferire un carattere discretamente idrofobico ad una delle estremità del polimero. La reazione, messa a punto con il derivato monoammina del PEG₂₀₀₀, può essere utilizzata anche per polimeri analighi di lunghezza superiore o inferiore (PEG₇₅₀, PEG₅₀₀₀).

3.2.2 Sintesi di PEG₂₀₀₀-NH₂

Il PEG₂₀₀₀-NH₂ utilizzato per la sintesi del derivato PEG₂₀₀₀-Si è disponibile in commercio, ma presenta costi decisamente elevati ed

incompatibili con preparazioni su larga scala. Perciò ho investigato una procedura che consentisse la sintesi di questa molecola a partire dal precursore PEG-monometil etere (anche in questo caso mi sono concentrato sul derivato con $PM=2000 \text{ g mol}^{-1}$), dal momento che questi derivati sono disponibili in grandi quantità e a costi molto inferiori. Un primo tentativo è stato effettuato inserendo un gruppo azide sul PEG₂₀₀₀ precedentemente attivato al terminale alcolico con p-toluensolfonil cloruro. I primi due passaggi della reazione sono stati condotti senza particolari difficoltà, ma la riduzione dell'azide, tentata sia mediante idrogenazione catalitica con H₂ in presenza di Pd/C, che mediante reazione con trifenilfosfina, non ha dato risultati soddisfacenti a causa della difficoltà di purificazione del grezzo ottenuto.

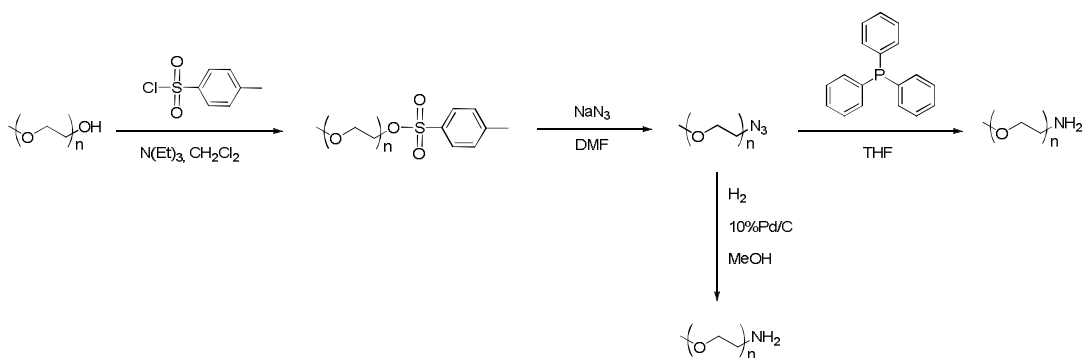


Figura 16: schema di sintesi per il PEG₂₀₀₀-NH₂ (primo tentativo)

Come seconda strategia sintetica, ho tentato la sintesi di Gabriel delle ammine primarie. In questo caso, il PEG₂₀₀₀ viene attivato di nuovo con p-toluensolfonil cloruro e il tosilato così ottenuto viene fatto reagire con potassio ftalimide. La deprotezione finale con idrazina monoidrato porta quindi alla formazione del composto desiderato in buone rese (figura 17).

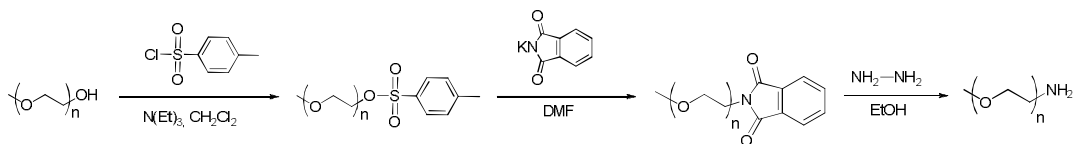


Figura 17: schema di sintesi per il PEG₂₀₀₀-NH₂ (secondo tentativo)

3.2.3 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle PEGilate

Il derivato PEG₂₀₀₀-Si potrebbe essere quindi utilizzato come co-surfattante nella sintesi di Prasad per ottenere nanoparticelle PEGilate. Tuttavia il protocollo originale utilizza come tensioattivo l'AOT, che è particolarmente tossico e che richiede una lunga dialisi della preparazione per essere rimosso. Per questo motivo nel gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi è stata perfezionata la sintesi di nanoparticelle ORMOSIL, testando diversi tensioattivi, in particolare Tween (già utilizzato da Prasad) e vari tipi di Brij, in diverse condizioni di reazione, variando la temperatura o le concentrazioni dei reagenti.

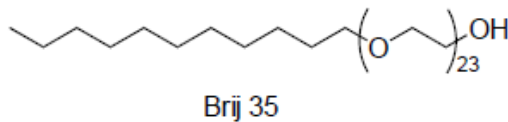


Figura 18: formula di struttura del tensioattivo Brij 35

I risultati migliori, in termine di controllo dimensionale, si sono ottenuti utilizzando il Brij 35 (in concentrazione 5 mM) e mantenendo controllata la temperatura a 30°C. In queste condizioni, variando la quantità aggiunta di silano (VTES) nella sintesi è possibile modificare la dimensione finale delle nanoparticelle, con un controllo dimensionale tra i 10 e i 200 nm. La sintesi è comunque valida anche per ottenere nanoparticelle nude.

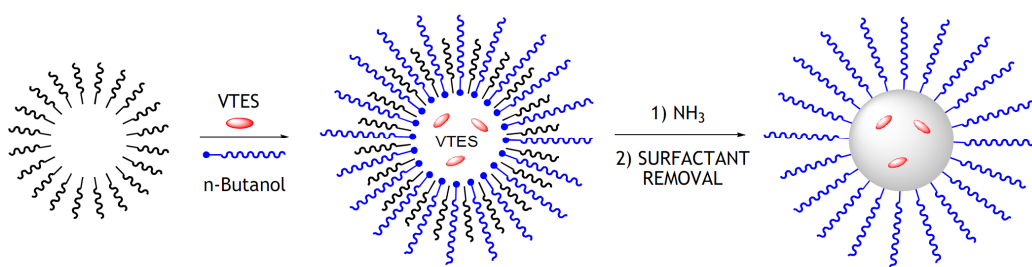


Figura 19: schema di sintesi delle nanoparticelle PEGilate

L'utilizzo del Brij 35 come surfattante agevola anche la purificazione della preparazione, infatti la concentrazione del tensioattivo può essere abbattuta aggiungendo alla preparazione dei *beads* di polistirene che adsorbono le catene alchiliche del tensioattivo. Una successiva breve dialisi permette di eliminare il tensioattivo (concentrazione residua $<1\mu\text{M}$) e i residui rimanenti dalla preparazione.

Le nanoparticelle che si ottengono utilizzando il derivato PEG₂₀₀₀-Si sono apparse ricoperte solidamente da uno strato di PEG₂₀₀₀. Infatti esse si sono rivelate stabili all'aggregazione sia in soluzione acquosa che salina, dove le nanoparticelle nude sono instabili. Inoltre la presenza di siero bovino non altera il loro diametro idrodinamico misurato con la tecnica del *Dynamic Light Scattering* (DLS), indice di assenza o di limitata interazione tra le particelle e le proteine del siero. Le particelle possono essere private del solvente e ridissolte in acqua, anche questa caratteristica assente nelle particelle di silice o di ORMOSIL non ricoperte, a causa della formazione di legami covalenti Si-O-Si interparticella. Una conferma visiva della avvenuta PEGilazione proviene anche dalle immagini TEM (figura 20): si nota infatti come particelle prodotte in assenza del derivato PEG-Si mostrino una forte tendenza ad aggregare, e forse anche a fondersi sotto il raggio elettronico, mentre quelle con il *coating* di PEG sono ben separate.

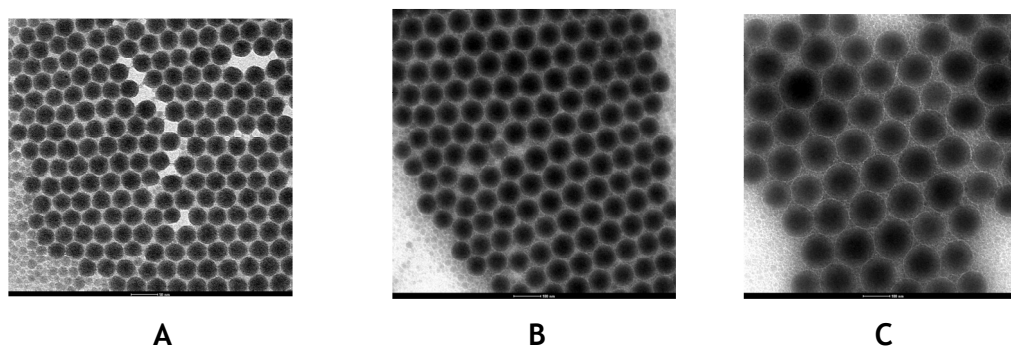


Figura 20: immagini TEM di nanoparticelle PEGilate da:
A) 30nm, B) 50nm C) 100nm

L'acquisizione di spettri $^1\text{H-NMR}$ con una sequenza LEDBP (filtro di diffusione) ha permesso di dimostrare ulteriormente la presenza del PEG sulla superficie delle nanoparticelle. Questa particolare sequenza permette infatti

di osservare nello spettro NMR solamente i segnali dei protoni delle specie con basso coefficiente di diffusione (nanoparticelle) grazie alla rimozione dei segnali relativi alle specie con coefficiente elevato (molecole). La presenza nello spettro $^1\text{H-NMR}$ dei soli protoni etilenici e del metile terminale del residuo del PEG sono un indice dell'effettiva presenza del *coating* sulla nanoparticella (figura 21).

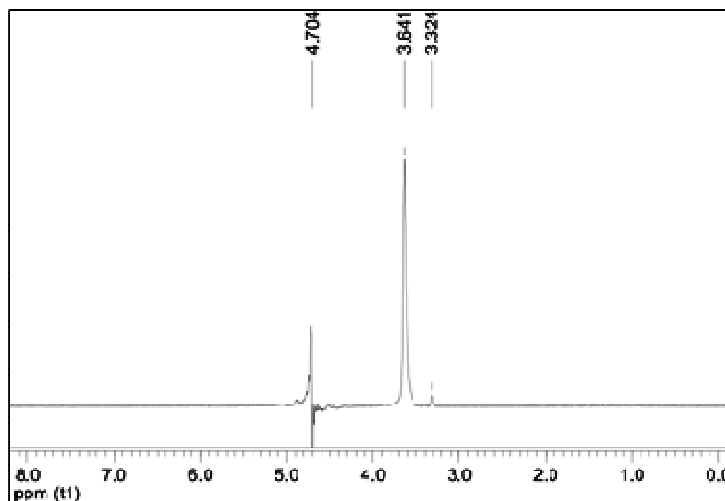


Figura 21: spettro $^1\text{HNMR}$ LEDBP “diffusion filter” di nanoparticelle PEGilate

Ad un'analisi attenta dello spettro si può notare l'assenza dei segnali aromatici ed alifatici del residuo p-etilen-solfonile legato covalentemente al PEG. Ciò può essere correttamente spiegato supponendo che questa parte della molecola sia molto vicina alla matrice silicea o inglobata all'interno della stessa. Ciò limita notevolmente la mobilità del residuo tanto da rendersi invisibile all'NMR.

Perciò, per verificare la presenza del gruppo p-etilenbenzensolfonammidico ho sfruttato la tecnica UV-vis, che mostra per un campione di nanoparticelle PEGilate una banda di assorbimento a 205 e 230 nm, tipica delle solfonammidi. Lo spettro registrato per le nanoparticelle è sostanzialmente identico al profilo ottenuto per il composto modello TEG-solfonammide, confermando così la presenza dei gruppi benzensolfonammidici nelle nanoparticelle.

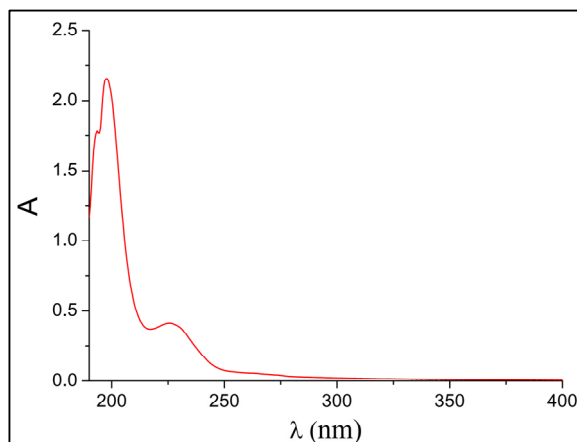


Figura 22: spettro UV-Vis di nanoparticelle PEGilate

Infine, alcuni campioni di nanoparticelle sono stati sottoposti ad analisi termogravimetrica (TGA), con lo scopo di quantificare la copertura di PEG. Grazie a questa tecnica si misura la perdita di peso del campione in seguito all'aumento della sua temperatura. Normalmente la pirolisi della componente organica avviene a temperature comprese tra i 200 e i 900 °C, mentre nessuna degradazione coinvolge il residuo inorganico di silice. Perciò è stato possibile quantificare il materiale organico presente nelle nanoparticelle. Infatti, osservando i profili di due analisi TGA di un campione di nanoparticelle PEGilate del diametro medio di 65 nm, eseguiti rispettivamente in atmosfera di aria e di azoto (figura 23), si osserva come in aria la decomposizione del materiale organico avvenga da circa 150 °C, per proseguire fino ai 700 °C, dopo i quali il campione non subisce alcuna perdita di peso significativa poiché è diventato silice. Il residuo non pirolizzato corrisponde al 43% in peso del campione. Con questo dato è possibile effettuare qualche semplice calcolo, infatti, tenendo conto che ogni atomo di silicio prima della pirolisi ha covalentemente legato un gruppo vinilico, questi vengono a contare per il 18% del peso del campione. Perciò, la percentuale in peso di PEG legata alle particelle risulta essere del 38%, dunque un valore molto elevato e mai raggiunto con nanoparticelle di silice. Un calcolo approssimativo effettuato utilizzando per la silice ORMOSIL il valore stimato di densità di 1.5 mg/mL porta a calcolare che l'area occupata da ogni singola molecola di PEG sulla superficie della particella è pari a 0.6 nm² e sulla

superficie di ogni particella di queste dimensioni vi siano 7600 molecole di PEG. La presenza di due diversi tipi di gruppi organici, le catene di PEG esposte all'esterno e quindi più facilmente pirolizzabili e i gruppi vinilici localizzati all'interno delle nanoparticelle, è confermata dall'analisi TGA in azoto, dove si distinguono chiaramente due differenti temperature di pirolisi del materiale organico, rispettivamente a 400 (temperatura tipica di pirolisi del PEG) e 1000 °C.

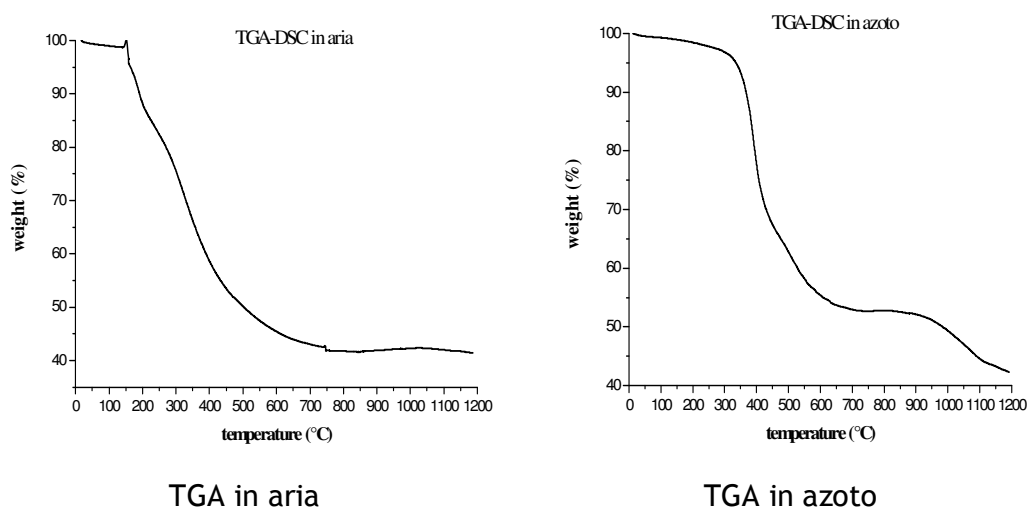


Figura 23: TGA in atmosfera di aria e azoto per nanoparticelle PEGilate da 65 nm.

Eseguendo degli spettri NMR allo stato solido di nanoparticelle prive di alcuno strato protettivo ho potuto indagare la natura della matrice silicea organicamente modificata. In particolare ero interessato a valutare il grado di polimerizzazione delle nanoparticelle raggiunto durante la sintesi. Per ottenere una simile valutazione mi sono avvalso dell'aiuto del Dott. Rastrelli con il quale ho eseguito una serie di esperimenti NMR allo stato solido sui nuclei di ^{29}Si , ^1H e ^{13}C . Inoltre utilizzando questa particolare sequenza di impulsi ho osservato quali segnali protonici accoppiavano con i segnali del ^{13}C , in modo da poter assegnare i diversi picchi dello spettro protonico. Gli spettri ottenuti da nanoparticelle ORMOSIL da 90 nm sono riportati nella figura 24. In particolare dallo spettro del ^{29}Si si può evincere come il grado di polimerizzazione del VTES sia estremamente elevato ovvero che la grande maggioranza degli atomi di silicio ha tre coordinazioni con altrettanti atomi di

silicio, attraverso ponti ossigeno (segnale a 70 ppm, detto T3). La quarta coordinazione è ovviamente occupata dal gruppo vinilico. Una piccola frazione di atomi di silicio manca di una coordinazione a ponte e ha quindi un gruppo idrossi: ciò si può valutare dal piccolo segnale a 80 ppm (detto T2).

Questo è confermato dallo spettro ^{13}C , che evidenzia la sola presenza dei gruppi vinilici (e quindi l'assenza di gruppi etossi residui) e di una piccola quantità di tensioattivo residuo (figura 24). Lo spettro protonico consente di rivelare la presenza di una notevole quantità d'acqua anche nel campione liofilizzato (figura 25).

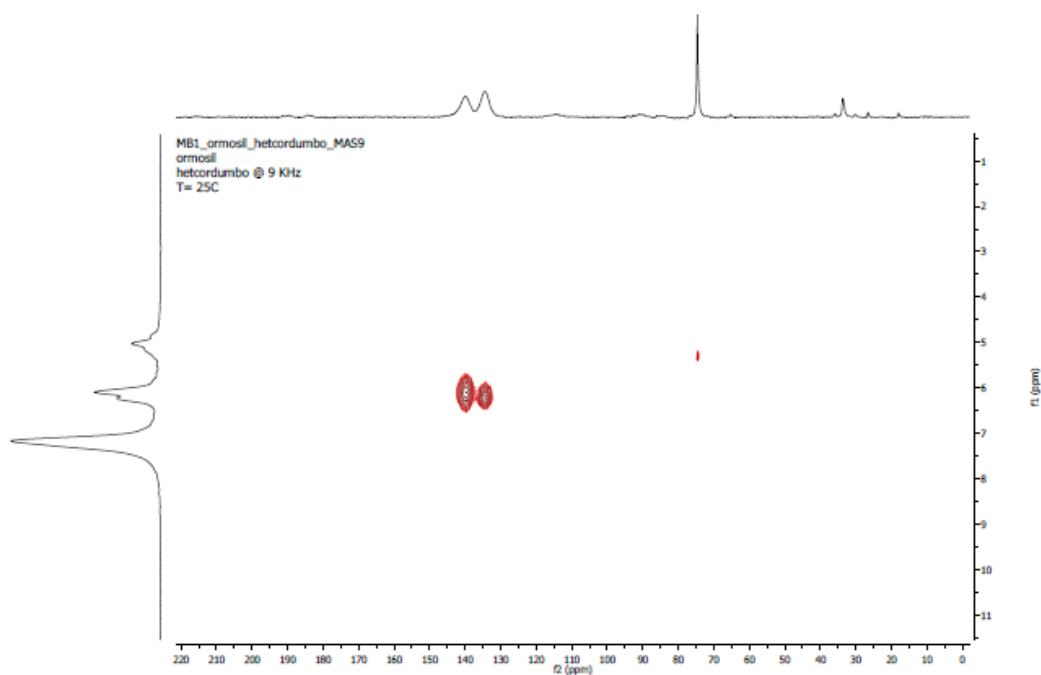


Figura 24: spettro NMR allo stato solido tra ^{29}Si e ^1H

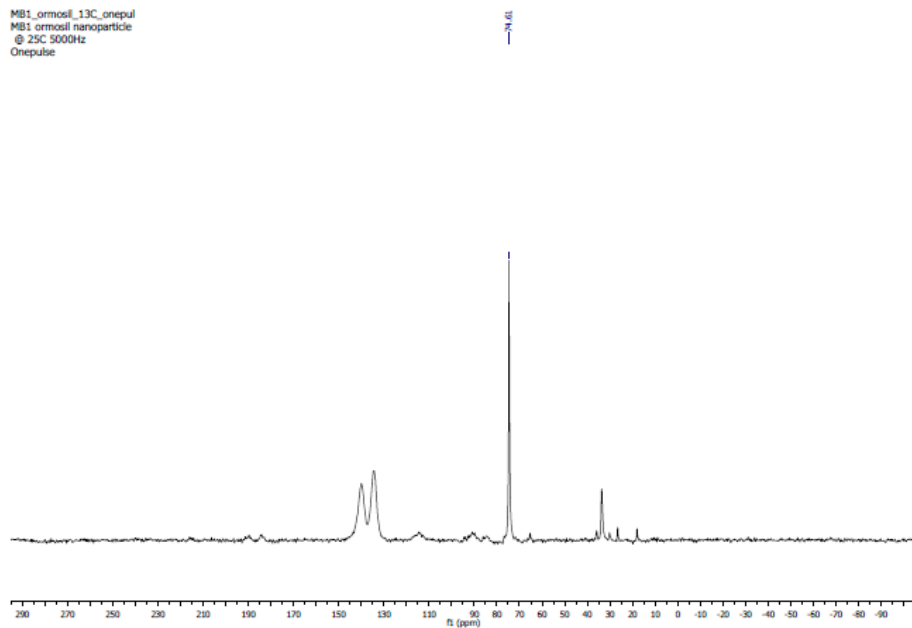


Figura 25: spettro ^{13}C Nmr allo stato solido di nanoparticelle PEGilate

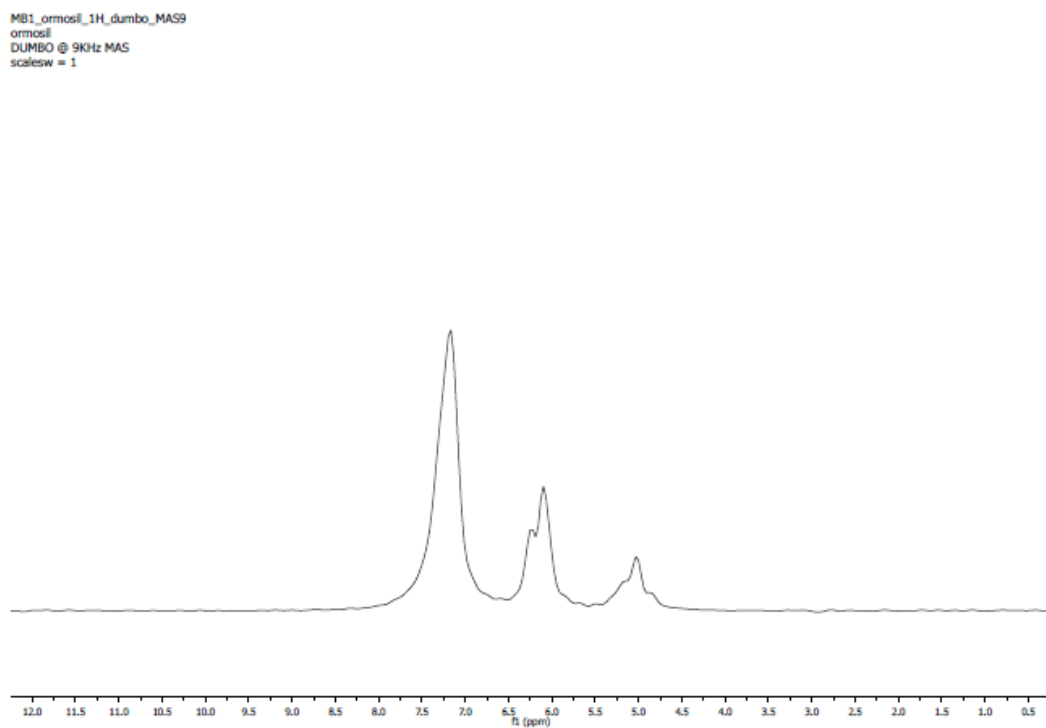


Figura 26: spettro ^1H NMR allo stato solido di nanoparticelle PEGilate

Un così alto grado di polimerizzazione concorda con la più bassa carica superficiale delle nanoparticelle di tipo ORMOSIL rispetto a quelle di silice amorfa. Infatti il potenziale zeta delle nanoparticelle di silice pura è

notevolmente più basso (intorno ai -27mV) rispetto a quello delle ORMOSIL che si aggira intorno a poche unità negative di mV. Questo trova spiegazione nell'alto grado di polimerizzazione delle nanoparticelle organicamente modificate che non consente di avere molti silanoli in superficie, al contrario delle nanoparticelle di pura silice che sono ricoperte di silanoli superficiali che si deprotonandosi e portano ad una netta carica superficiale negativa.

3.3 Nanoparticelle per il targeting attivo

La seconda parte del progetto di dottorato prevedeva la realizzazione di nanoparticelle direzionate con agenti di *targeting* attivi verso le cellule tumorali. Questo scopo del progetto è di notevole importanza perché assume una doppia finalità, quella di amplificare l'accumulo nei tessuti bersaglio, ma anche di stimolare nella cellula l'*uptake* e l'internalizzazione del vettore, affinché il farmaco possa svolgere la sua azione citotossica. Infatti, i *carriers* provvisti del solo *coating* di PEG sono scarsamente intercettati da tutti i tipi di cellule, sia sane che malate. In alternativa, la terapia dovrebbe essere rivolta esclusivamente verso la distruzione della vascolarizzazione del tumore, grazie all'accumulo preferenziale nei tessuti malati per solo effetto EPR. Avevo quindi bisogno di preservare le proprietà *stealth* del nanosistema e contemporaneamente funzionalizzare la superficie PEGilata con opportuni agenti di *targeting*. Per ottenere questo risultato ho esplorato due diverse strategie: la sintesi di un derivato del PEG con i vertici della catena funzionalizzati rispettivamente con un derivato trimetossisilano (come nel caso del PEG-Si) e dal lato opposto con l'agente di *targeting*, oppure la preparazione di nanoparticelle PEGilate con gruppi reattivi, disponibili per una successiva funzionalizzazione delle nanoparticelle.

3.3.1 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle funzionalizzate con FOL-PEG₂₀₀₀-Si

Il più semplice, famoso e utilizzato agente di *targeting* per cellule tumorali è l'acido folico. Le sue caratteristiche sono state ampiamente discusse nell'introduzione di questa tesi, ma si può velocemente comprendere l'interesse per utilizzare questa vitamina come agente direzionante, considerando che il recettore dell'acido folico è sovraespresso in molte linee cellulari tumorali, che la molecola è poco costosa ed è relativamente facile da modificare.

La prima strategia studiata per realizzare nanoparticelle funzionalizzate con questa vitamina è stata sintetizzare un derivato simile al PEG₂₀₀₀-Si che contenesse l'acido folico all'estremità opposta al gruppo trialcossisilano: in questo modo, l'aggiunta come co-tensioattivo del derivato FOL-PEG₂₀₀₀-Si alla miscela di reazione avrebbe condotto alla funzionalizzazione delle nanoparticelle. La sintesi di FOL-PEG₂₀₀₀-Si parte dalla diammina simmetrica NH₂-PEG₂₀₀₀-NH₂, che per poter essere derivatizzata in modo asimmetrico con l'acido folico deve essere protetta ad un'ammina con BOC. Ciò permette anche di evitare la formazione di prodotti più complessi difficilmente separabili. La reazione viene condotta facendo reagire il NH₂-PEG₂₀₀₀-NH₂ con un leggero eccesso di Boc₂O in diclorometano e il derivato monoprotetto si isola con discrete rese per purificazione cromatografica su SiO₂. Successivamente, il derivato BOC-NH-PEG₂₀₀₀-NH₂ viene coniugato con l'acido folico in presenza di DCC, NHS e trietilammina in DMSO. Si procede dunque allo sblocco del gruppo protettore BOC con TFA in diclorometano e alla successiva funzionalizzazione con 2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano che fornisce il composto desiderato.

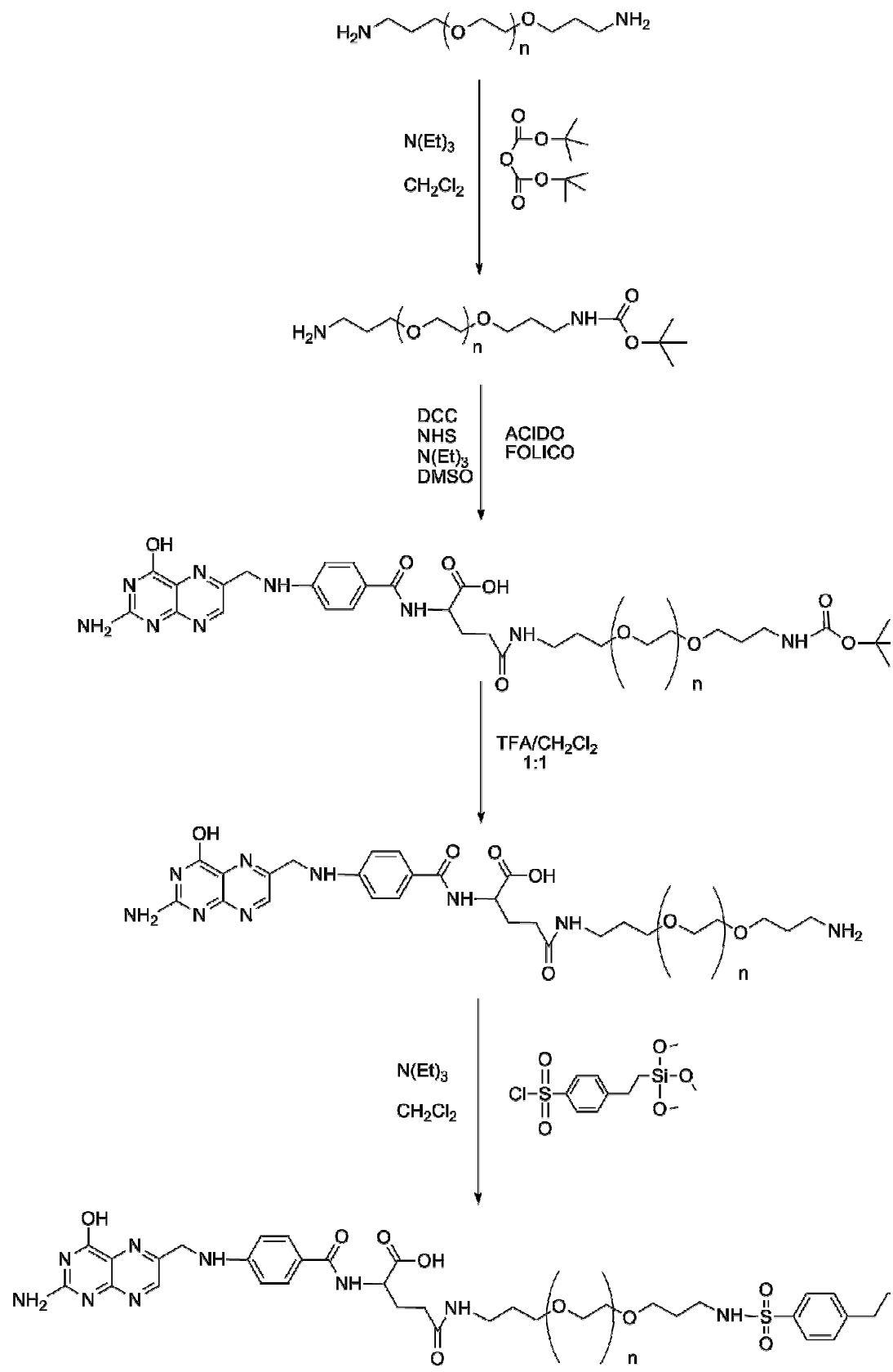


Figura 27: schema di sintesi del derivato FOL-PE2000-Si

Per preparare delle nanoparticelle di silice funzionalizzate con acido folico è sufficiente utilizzare il precursore FOL-PEG₂₀₀₀-Si come co-tensioattivo durante la sintesi dei nanovettori, aggiungendolo alla preparazione insieme al PEG-Si. Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate tramite spettroscopia UV-Vis, in cui lo spettro della soluzione di nanoparticelle presenta le classiche bande di assorbimento dell'acido folico, rispettivamente a 280 e 350 nm.

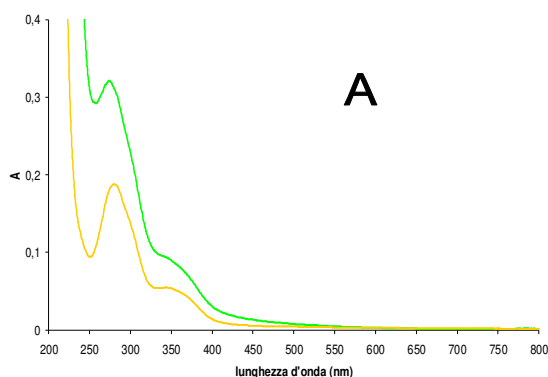


Figura 28: spettro di assorbimento dell'acido folico (linea gialla) sovrapposto allo spettro di assorbimento di nanoparticelle funzionalizzate con il 10% di folato

3.3.2 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle con ammine libere

La procedura appena descritta per realizzare nanosistemi funzionalizzati con acido folico presenta evidenti limiti di applicabilità, sia per la realizzazione dei derivati del PEG coniugati con l'agente direzionante, la cui sintesi ha presentato notevoli difficoltà anche nel caso di una molecola semplice come l'acido folico, sia per la tipologia di agenti di *targeting* che si possono utilizzare. La via sintetica è molto laboriosa, va modificata ogni volta che si sostituisce la molecola direzionante ed è valida solo per piccole molecole idrofiliche, ma diventa inapplicabile quando vengono scelte grandi biomolecole, come le proteine e gli anticorpi.

Un approccio molto più flessibile ed efficiente l'ho ottenuto preparando delle nanoparticelle con dei gruppi reattivi sulla loro superficie, capaci di coniugare un agente di *targeting* successivamente alla realizzazione della particella. Il vantaggio di questa procedura è duplice, poichè l'agente direzionante può essere legato al *carrier* subito dopo la sua formazione, prima della purificazione della preparazione, oppure le nanoparticelle possono essere purificate ed essere derivatizzate in un secondo momento. Il gruppo amminico è particolarmente adatto a questo scopo per la disponibilità commerciale di molti agenti di *cross-linking*, basati su esteri attivi dell'O-idrossisuccinimide, che reagiscono velocemente e quantitativamente con gruppi amminici.

3.3.3 Sintesi di nanoparticelle con ammine libere

L'introduzione di gruppi amminici nello strato superficiale delle particelle richiede solo la sintesi del derivato NH₂-PEG-Si da utilizzare come co-tensioattivo nella sintesi dei nanovettori, alla pari del PEG-Si. In questo modo in un unico passaggio si ottengono delle nanoparticelle di silice già caricate con il fotosensibilizzatore, protette con un denso strato di PEG e derivatizzate con il gruppo funzionale desiderato. La reazione di sintesi del derivato NH₂-PEG-Si viene condotta semplicemente facendo reagire il PEG-bis-(3-amminopropil etero) con 2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano a refluxo in diclorometano. Dopo un paio d'ore la reazione è terminata, si allontana il solvente e si utilizza il prodotto senza ulteriori purificazioni. Il derivato tuttavia è poco stabile e, anche se è conservato al freddo, va utilizzato entro pochi giorni, poichè il gruppo amminico libero ancora presente nel prodotto catalizza la polimerizzazione del gruppo trimetossisilano.

Per limitare questo problema ho apportato una modifica alla procedura sintetica, al fine di ridurre i tempi necessari alla sintesi e alla caratterizzazione del prodotto, in modo da poterlo preparare ed utilizzare velocemente al bisogno. La sintesi ottimizzata prevede la preparazione del derivato NH₂-PEG-Si per aggiunta di un equivalente di 2-(4-

clorosulfonilfenil)etiltrimetossisilano ad una soluzione di PEG-bis-(3-amminopropil)etere) in DMSO, anziché diclorometano, a 40°C per due ore. La miscela di reazione, che contiene essenzialmente NH₂-PEG-Si e DMSO, può essere utilizzata direttamente nella sintesi delle nanoparticelle senza bisogno di purificazione, poiché il DMSO non influenza la formazione delle particelle se presente in modeste quantità. Inoltre si è osservato che il derivato NH₂-PEG-Si si conserva più a lungo quando si trova in soluzione solidificata di DMSO a 4°C. Utilizzando come solvente per la reazione DMSO deuterato si può caratterizzare direttamente il prodotto via NMR senza isolarlo.

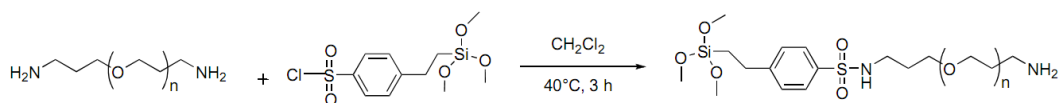


Figura 29: sintesi del derivato NH₂-PEG2000-Si in diclorometano

La soluzione in DMSO viene utilizzata tal quale nella sintesi delle particelle senza ulteriori purificazioni, aggiungendola contemporaneamente all'ammoniaca, dopo 30 minuti dall'aggiunta di tutti gli altri componenti. Utilizzando polimeri PEG-bis(ammina) di diversa lunghezza è possibile inoltre modulare l'esposizione delle ammine rispetto al *coating* di PEG e valutare se il diverso posizionamento influenzi la successiva coniugazione, nonché l'efficacia del *targeting*. La purificazione della preparazione si ottiene, come per i nanovettori con solo PEG-Si, aggiungendo dei *beads* polistirenici rimuovere il surfattante e con una successiva dialisi.

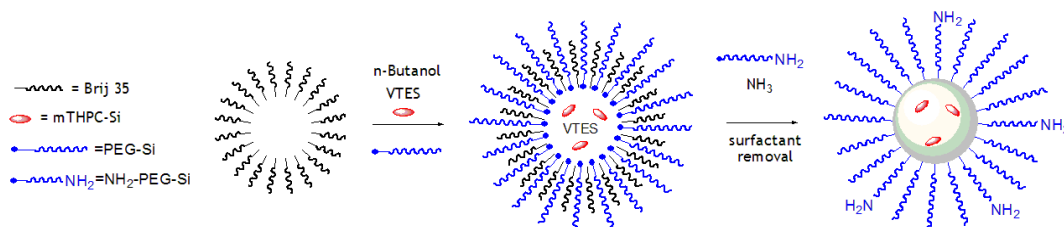


Figura 30: schema di sintesi per le nanoparticelle con ammine libere in superficie

3.3.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle con ammine

Ottenute le nanoparticelle, era necessario trovare un saggio per verificare e quantificare le ammine primarie. Il metodo doveva dimostrare una sufficiente sensibilità, poiché in alcune preparazioni la concentrazione delle ammine potrebbe presentarsi molto bassa, nell'ordine del μM o inferiore. La risoluzione del problema l'ho trovata nel test della Fluorescamina.

Questa particolare molecola è estremamente reattiva a temperatura ambiente nei confronti delle ammine primarie e dalla reazione risulta un composto fluorescente, mentre il prodotto di idrolisi non è fluorescente e si forma con una cinetica più lenta. Infatti, a seconda delle ammine primarie usate, la cinetica della reazione di idrolisi è dalle 10 alle 100 volte più lenta, perciò, aggiungendo il dovuto eccesso di fluorescamina al campione, è possibile evidenziare e misurare le ammine presenti anche in una soluzione acquosa.

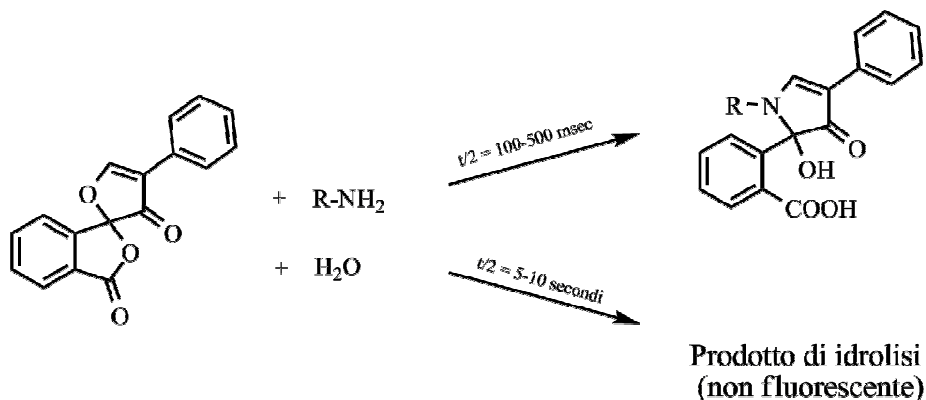


Figura 31: schema di reazione della fluorescamina

Il prodotto fluorescente assorbe a 390 nm e emette fluorescenza a 475 nm. Per ottenere una misura quantitativa dalla misura ho registrato una retta di taratura, scegliendo la propilammina come molecola di riferimento. Le misure sono state effettuate in tampone borato a pH 9 (0,2M), facendo reagire la propilammina con un eccesso di almeno 10 volte di fluorescamina ($200 \mu\text{M}$) sciolta in DMSO. La retta di taratura così costruita ha permesso di misurare quantitativamente i gruppi amminici presenti nei campioni di nanoparticelle. È importante far notare che la reazione con la fluorescamina

indica non solo che i gruppi amminici sono presenti nelle particelle, ma anche una prima prova che essi sono disponibili per reagire con opportuni elettrofili. Il test può essere effettuato anche su sistemi già funzionalizzati con la molecola *target* se questa non contiene ammine primarie, per valutare il grado di funzionalizzazione attraverso il calcolo delle ammine residue.

3.4. Funzionalizzazione con piccole biomolecole

3.4.1 L'acido folico

La prima strategia di sintesi di vettori direzionanti con acido folico richiedeva come abbiamo visto la macchinosa sintesi del precursore FOL-PEG-Si. Il nuovo approccio, pensato per ottenere in modo più agevole e flessibile le nanoparticelle funzionalizzate, richiede che l'agente di *targeting* che si vuole coniugare al nanovettore sia opportunamente attivato, per poter reagire con il gruppo funzionale reattivo della particella. Per coniugare l'acido folico con le ammine è stato preparato il derivato folato-OSu per esterificazione del carbossile in γ della vitamina, eseguendo la reazione in DMSO per una notte a temperatura ambiente in presenza di due equivalenti di N-idrossisuccinimide (NHS), di N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) e NEt₃.

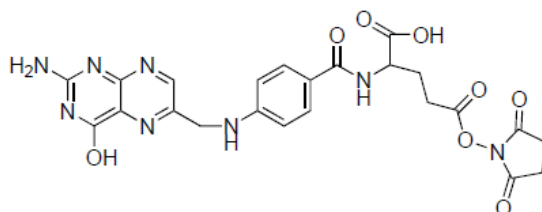


Figura 32: formula di struttura folato-OSU

L'acido folico viene derivatizzato soprattutto all'acido carbossilico in γ per la maggiore reattività che presenta rispetto allo stesso gruppo funzionale in α , derivato che viene riscontrato solo in percentuali modeste. La

miscela di reazione viene filtrata e il prodotto è precipitato in MTBE, poi si prepara una soluzione in DMSO che viene usata direttamente per la funzionalizzazione delle nanoparticelle. Rispetto alle moli di NH₂-PEG-Si che vengono utilizzate per derivatizzare i nanosistemi, vengono aggiunti alle preparazione venti equivalenti dell'estere attivo dopo almeno due ore dall'aggiunta dell'ammoniaca.

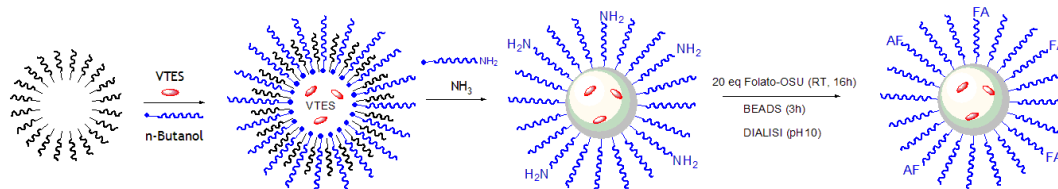


Figura 33: schema di sintesi nanoparticelle con acido folico

Dopo aver lasciato reagire per qualche ora la purificazione della preparazione procede come per le nanoparticelle con la sola copertura di PEG, aggiungendo dei *beads* polistirenici ore per rimuovere il surfattante e con una successiva dialisi con acqua. La presenza della vitamina sul *carrier* viene sempre osservata con la spettroscopia UV-Vis, come per le nanoparticelle funzionalizzate con FOL-PEG-Si.

3.4.2 Biotina

La biotina è un agente di *targeting* estremamente interessante grazie all'altissima selettività e affinità che presenta per le proteine avidina e streptavidina ($K_d \approx 10^{-15} M$). Le opportunità terapeutiche e diagnostiche offerte dai coniugati biotina-avidina sono già utilizzate in alcune pratiche mediche, in modo particolare per alcuni trattamenti di radioimmunoterapia. Questa modalità terapeutica offre spunti molto interessanti anche per una eventuale applicazione della tecnica nel direzionamento di vettori in terapia oncologica.

Per ottenere la coniugazione della biotina alle nanoparticelle funzionalizzate con gruppi amminici ho proceduto attivando il gruppo carbossilico trasformandolo nell'estere attivo dell'N-idrossisuccinimide (biotina-OSu).

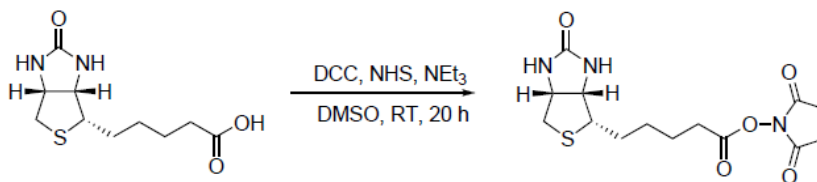


Figura 34: schema di sintesi della Biotina-OSU

La biotina è stata sciolta in DMSO e fatta reagire con di NHS e DCC a temperatura ambiente per una notte. La miscela va filtrata e il prodotto precipitato in MTBE a freddo: poi viene utilizzato nella preparazione delle nanoparticelle aggiungendolo come soluzione in DMSO.

Come nel caso dell'acido folico, la biotina viene aggiunta alla preparazione di nanoparticelle due ore dopo l'aggiunta dell'ammoniaca in un rapporto molare di 20:1 rispetto alle ammine. La purificazione ha inizio dopo qualche ora con le stesse modalità descritte in precedenza per gli altri tipi di *carriers*.

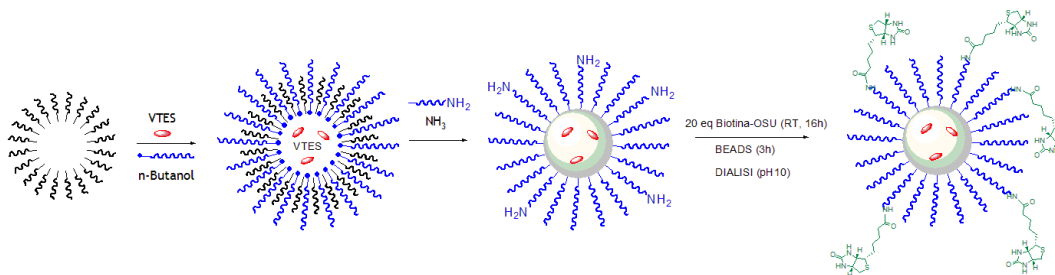


Figura 35: schema di sintesi nanoparticelle biotinilate

La prima verifica dell'effettiva coniugazione della biotina l'ho eseguita con il test della fluorescamina, che ha evidenziato la funzionalizzazione di una percentuale prossima alla totalità dei gruppi amminici della particella, grazie al grande eccesso di estere-OSU utilizzato. Da prove di coniugazione con un eccesso inferiore di reattivo aggiunto (10 equivalenti) ho stimato che circa un terzo dei gruppi amminici presenti sulle particelle non reagisce con il derivato attivato della biotina.

Per raccogliere altre prove dell'avvenuta biotinilazione ho fatto uso di reagenti particolari adatti a rilevare selettivamente la presenza della biotina.

Come primo test ho effettuato l'*EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel*. Il reagente commerciale che ho utilizzato per questo prova è un gel di

colore rosa composto da streptavidina legata covalentemente a *beads* di agarosio. Queste microsferine sono capaci di captare macromolecole biotinate e di abatterle dalla soluzione in seguito a centrifugazione. Il *binding* delle particelle ai *beads* è praticamente irreversibile data l'alta costante di affinità del complesso streptavidina-biotina. Perciò si è potuto osservare l'abbattimento dell'assorbanza dei campioni di nanoparticelle dopati con il fluoroforo mTHPC, grazie alla precipitazione delle nanoparticelle biotinate coniugate con i *beads*.

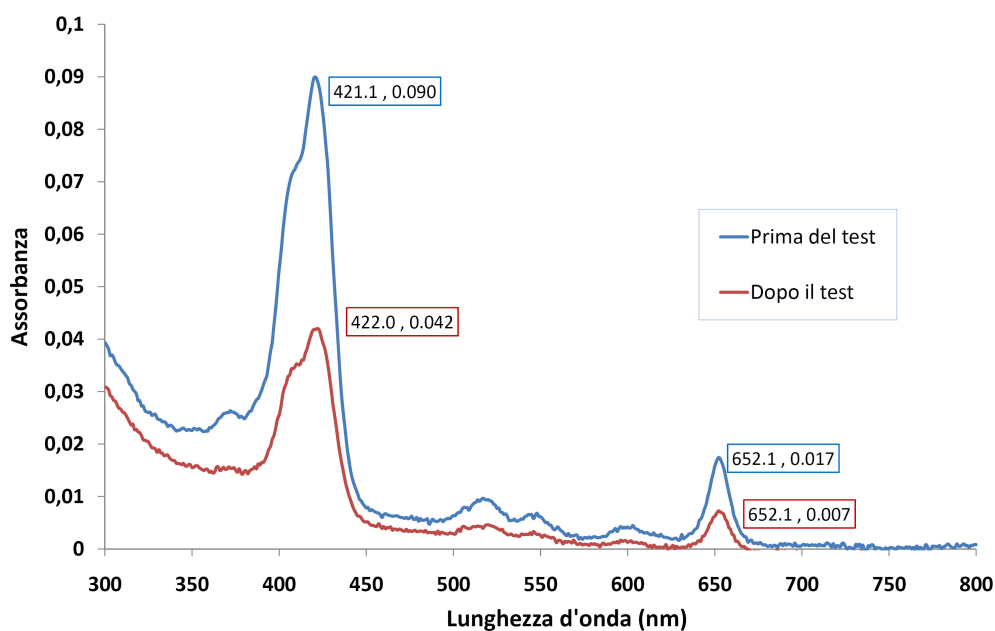


Figura 36: Test EZview Red Streptavidin Affinity Gel.

La figura 36 mostra lo spettro di assorbimento della soluzione di nanoparticelle prima e dopo l'incubazione con i *beads* di agarosio. Questa preparazione in particolare contiene nanoparticelle funzionalizzate con ammine al 10% e poi biotinate. La differenza tra l'assorbimento prima e dopo il trattamento, indicano una precipitazione di oltre la metà delle nanoparticelle, testimoniando l'effettiva coniugazione tra le nanoparticelle e la biomolecola.

Ho effettuato un ulteriore test sulle nanoparticelle biotinate utilizzando il prodotto commerciale HABA/Avidin, che contiene 0.45 mg/ml di avidina e 0.3 mmol/L di HABA (4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid). Il

saggio si basa sulla più alta affinità della biotina per l'avidina rispetto all'HABA: la biomolecola scalfa in proporzioni stechiometriche il colorante HABA coordinato all'avidina e permette di quantificare la biotina. Infatti, tale processo è accompagnato da un cambiamento dell'assorbanza a 500 nm, poiché il colorante legato all'avidina esprime maggiore assorbimento rispetto all'HABA libero. Dalle specifiche tecniche che accompagnano il reattivo analitico, affinché il test sia significativo, i campioni dovrebbero contenere circa 0.08 $\mu\text{mol/ml}$ di biotina e ciò dovrebbe risultare in una variazione di A_{500} di 0.1-0.4 unità. Una variazione superiore indica la presenza di una concentrazione di biotina superiore all'avidina, perciò il test perde di validità, sottostimando la concentrazione. È di seguito riportato un grafico relativo al test HABA/Avidina effettuato su un campione di nanoparticelle funzionalizzate al 30% (figura 37).

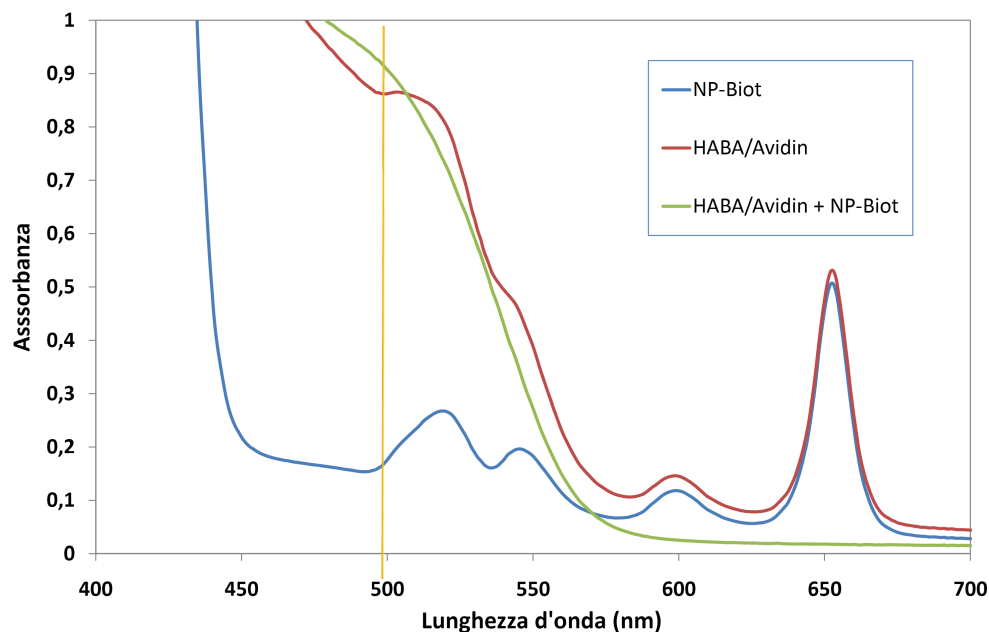


Figura 37: test HABA-avidina

La linea rossa indica lo spettro della soluzione reagente HABA/Avidina, la linea verde è la stessa soluzione a cui è stata aggiunta la preparazione di nanoparticelle, mentre la linea blu è relativa al bianco, ovvero allo spettro di assorbimento della preparazione di nanoparticelle registrato prima del saggio. Applicando la formula riportata sotto al grafico, che tiene conto anche dei

fattori di diluizione, e conoscendo il coefficiente di estinzione molare a 500nm per l'HABA, è possibile calcolare la concentrazione di biotina. Nelle preparazioni esaminate ho riscontrato concentrazioni dell'ordine delle decine di $\mu\text{mol/L}$ (30-60 μM).

Dopo questi esperimenti ho preparato una diversa formulazione di nanoparticelle per esporre maggiormente i gruppi amminici, ovvero la biotina. In questo caso ho scelto per il *coating* una combinazione di PEG₇₅₀ e NH₂-PEG₂₀₀₀-Si, in modo da rendere più esposta al solvente la biotina attraverso uno spaziatore più lungo. Anche questa volta le preparazioni a diverso grado di biotinilazione sono state sottoposte ai test precedentemente illustrati. Nel caso del test dell'*EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel* l'aggiunta della soluzione di nanoparticelle ai *beads* ha comportato un'immediata precipitazione, dovuta probabilmente al *cross-linking* tra la streptavidina legata alle microsfere di agarosio e le nanoparticelle coniugate con la biotina, rendendo impossibile la seconda acquisizione dello spettro. Tuttavia la rapida cattura delle nanoparticelle è un evidente segnale dell'efficace biotinilazione delle nanoparticelle e dell'esposizione delle biomolecole.

Anche con il test HABA/Avidina non si è potuto calcolare la concentrazione di biotina delle preparazioni, a causa dell'immediata precipitazione di aggregati avidina-nanoparticelle dovuti al *cross-linking*. Dal comportamento di questo tipo di nanoparticelle biotinilate si può dedurre che nel primo tipo di *carriers*, in cui il PEG di rivestimento era della stessa lunghezza del PEG derivatizzato con gruppi amminici, la biotina era in parte mascherata dal denso strato di PEG e questo evitava la formazione di aggregati avidina-nanoparticelle.

3.4.3 Coniugazione con anticorpi

Il *targeting* di nanovettori con anticorpi è una delle modalità di direccionamento più promettenti nel *drug delivery*.

Per realizzare la coniugazione delle nanoparticelle con un anticorpo monoclonale ci si è avvalsi della collaborazione del Prof. Colombatti dell'Università di Verona, uno dei *partner* del progetto Nanophoto, che da

tempo si occupa della sintesi e purificazione dell'anticorpo monoclonale D2B attivo contro il PSMA (*prostate specific membrane antigen*), un antigene associato al tumore alla prostata.

Per prima cosa ho sintetizzato e purificato delle nanoparticelle con gruppi amminici liberi, ottenendo diverse preparazioni con differente esposizione dei gruppi reattivi rispetto al *coating* di PEG.

La strategia adottata per ottenere i coniugati nanoparticelle-anticorpo (NP-Ab) prevede tre passaggi (figura 38): prima vengono derivatizzati separatamente sia le nanoparticelle che gli anticorpi con opportuni agenti di *cross-linking*, poi si fanno reagire insieme i due elementi.

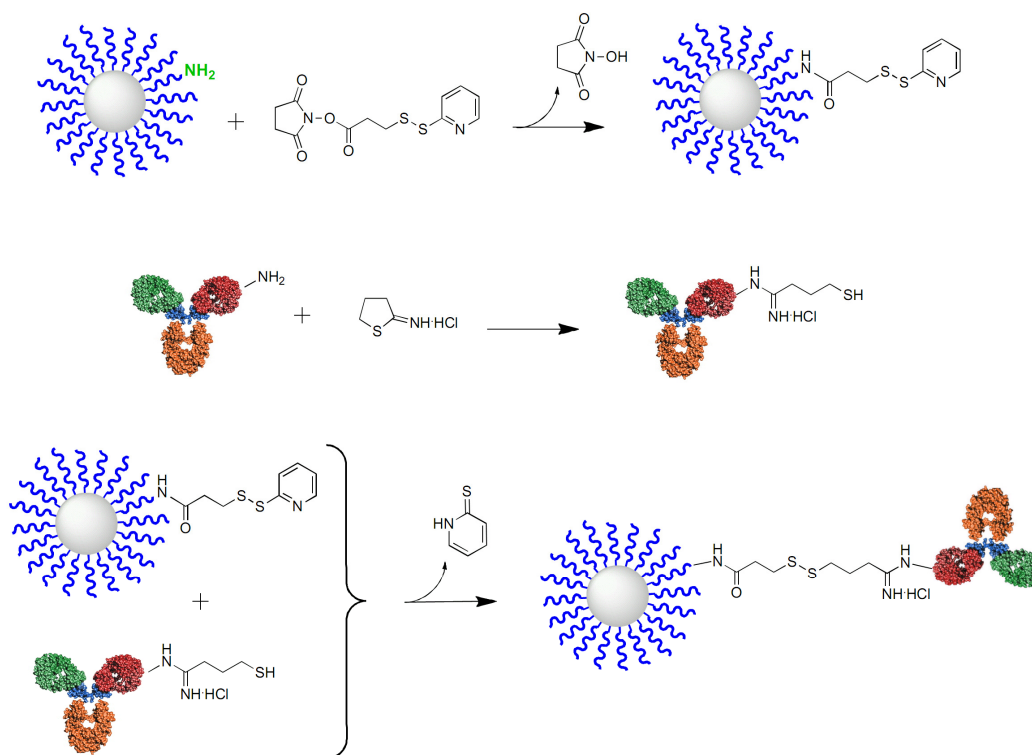


Figura 38: schema di coniugazione delle nanoparticelle con anticorpi

Gli amminogruppi presenti sulla superficie delle nanoparticelle, quantificati con il test della fluorescamina, vengono attivati con l'SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato). Questo estere attivato permette di convertire il gruppo amminico in un disolfuro. La reazione avviene per aggiunta di 10 equivalenti di SPDP rispetto alla ammine, si lascia reagire per

un'ora a T ambiente e poi per una notte a 4° C. Il prodotto viene purificato con cromatografia su colonna per gel filtrazione. L'anticorpo D2B viene invece derivatizzato con 2-imminotiolano (2-IT) (rapporti molar MAb:2-IT = 1:2,5) trasformando in tioli da uno fino a tre gruppi amminici liberi dell'anticorpo. Il prodotto viene purificato ancora una volta tramite colonna cromatografica per gel filtrazione.

Una volta attivato sia il *carrier* che l'anticorpo si ottiene la loro coniugazione incubando in tampone PBS + EDTA 10 mM a temperatura ambiente per 2 giorni sotto dialisi: in queste condizioni avviene una reazione di scambio disolfuro con eliminazione di piridin-2-tione e la formazione del coniugato NP-Ab, che viene purificato tramite colonna per gel filtrazione. L'avvenuto attacco dell'anticorpo alle nanoparticelle è stato verificato con analisi FACS (analisi di citometria a flusso).

3.5 Studi di rilascio dell'mTHPC

La parte discussa fino a questo punto ha riguardato principalmente il perfezionamento delle procedure di sintesi delle particelle, partendo dal protocollo originale di sintesi delle ORMOSIL proposto da Prasad, la sintesi dei precursori per ottenere nanovettori *stealth* e funzionalizzati con agenti direzionanti, oltre alle caratterizzazioni che hanno riguardato il *coating* superficiale dei nanovettori. Nella sezione successiva concentrerò invece l'interesse verso l'interno della nanoparticella, in particolar modo approfondirò gli aspetti riguardanti lo stato del fotosensibilizzatore inglobato nella matrice silicea, che si aggiungono alle caratterizzazioni fotofisiche preliminari che mi avevano condotto a scegliere il protocollo di sintesi di Prasad.

Una caratteristica interessante della sintesi di Prasad è di permettere di intrappolare un drogante idrofobico, nel mio caso il fotosensibilizzatore m-THPC, senza una preliminare modificazione chimica della molecola. Esperimenti effettuati in precedenza nel laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di ricerca, avevano però evidenziato come, in presenza di proteine del

siero, il fotosensibilizzatore fosse velocemente rilasciato dalle nanoparticelle. La fuga della molecola era probabilmente dovuta sia alla capacità delle proteine del siero di interagire con l'm-THPC, che alla loro nota affinità per la superficie delle nanoparticelle di silice. Utilizzando nanoparticelle PEGilate, nutro la speranza che la copertura, sfavorendo l'interazione delle nanoparticelle con il siero, potesse impedire o quantomeno rallentare il rilascio del drogante. Per valutare l'uscita dell'm-THPC dal vettore ho utilizzato un esperimento di *Energy Transfer*, includendo all'interno della nanoparticella, insieme all'm-THPC, il fluoroforo cianina IR775-Si (figura 39).

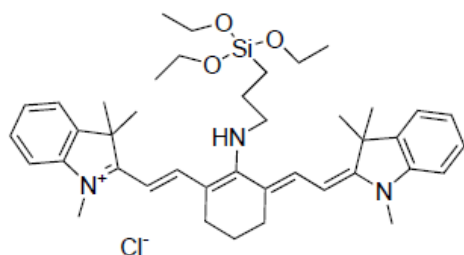


Figura 39: formula di struttura della cianina IR775-Si

Il composto IR775-Si ha uno spettro di assorbimento perfettamente sovrapposto con quello di emissione della clorina, perciò se i due composti sono sufficientemente vicini (circa 4-5 nm) l'energia di eccitazione viene trasferita dall'm-THPC all'IR775-Si. La cianina non può essere rilasciata perché è covalentemente legata alla matrice silicea grazie al suo gruppo trialcossisilano. Ciò che si osserva sperimentalmente è che all'eccitazione della clorina corrisponde l'emissione della cianina, cui l'energia di eccitazione è stata trasferita.

Quindi, quando i due cromofori sono inclusi nella nanoparticella, il trasferimento di energia è attivo, ma se l'm-THPC viene rilasciato il trasferimento si interrompe e ciò può essere rilevato dall'esame degli spettri di assorbimento ed emissione della cianina.

Gli esperimenti sono stati svolti sottoponendo a fluorimetria le nanoparticelle, contenenti m-THPC e IR775-Si, e osservando l'intensità del picco di assorbimento della banda di Soret della clorina negli spettri di emissione della cianina, allo scopo di verificare l'eventuale fuoriuscita del fotosensibilizzatore in presenza di concentrazioni diverse di siero fetale di

bue (3%, 10%, 50%) in terreno di cultura MEM (*Modified Eagle Medium*) e alla temperatura di 37°C, simulando perciò condizioni ambientali *in vitro* e *in vivo*. I risultati ottenuti sono riportati nella figura 40.

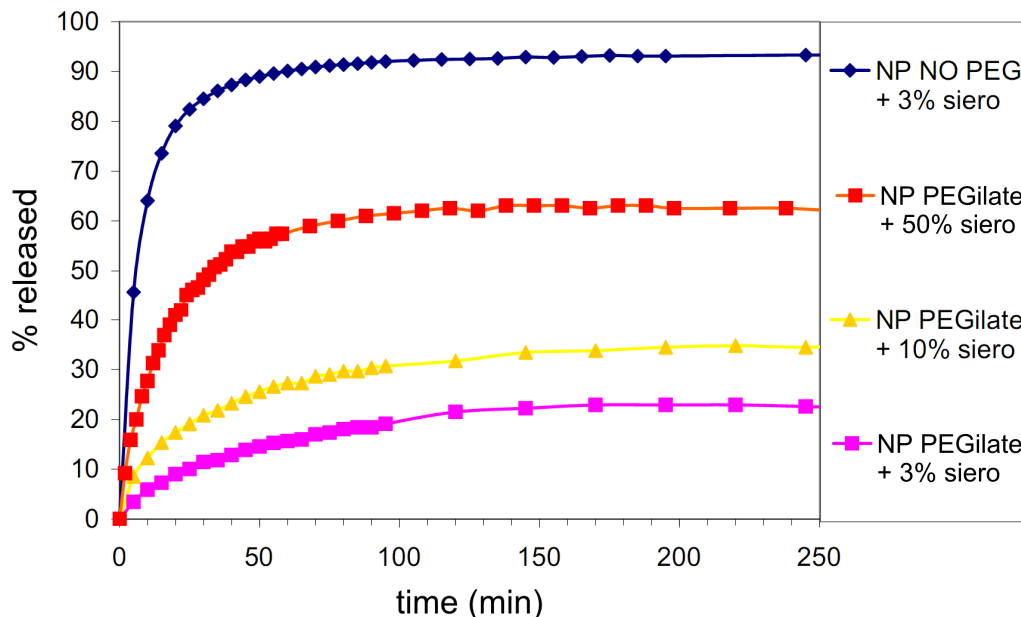


Figura 40: cinetica di rilascio dell'mTHPC dalle nanoparticelle a diversa concentrazione di siero

Gli esperimenti hanno verificato come la presenza della copertura del PEG alle nanoparticelle rallenti effettivamente il rilascio dell'm-THPC in presenza di proteine del siero. Tuttavia, la fuga della molecola non viene completamente impedita: parte del fotosensibilizzatore esce ancora dalla nanoparticella a causa dell'effetto di assorbimento esercitato da alcune proteine del siero. Inoltre, la conclusione più importante e preoccupante che si ricava dal grafico di figura 40, è che il rilascio diventa sempre più consistente e veloce all'aumentare della percentuale di siero presente in soluzione. Questo aspetto è fortemente limitante poiché *in vivo* il siero è ovviamente presente in quantità pari al 100% e contiene una quantità di proteine superiore a quelle presenti nel siero fetale di bue utilizzato. In queste condizioni, si osserverebbe un rilascio completo e veloce del fotosensibilizzatore dalle nanoparticelle, anche se queste sono densamente ricoperte di PEG.

Come è stato già descritto nel capitolo introduttivo, la soluzione più sicura per evitare il rilascio del farmaco dal *carrier* risiede nella sua modificazione chimica con un gruppo trialcossisilano, al fine di poterlo ancorare covalentemente alla matrice silicea: questa soluzione era già stata adottata per i fluorofori descritti in precedenza. L'm-THPC dispone di ben quattro ossidrilici fenolici, che si prestano alla loro modificazione chimica, senza tuttavia alterare le proprietà fotofisiche della molecola, dal momento che gli anelli benzenici periferici non sono coniugati con l'anello pirrolico centrale. Il derivato m-THPC-trietossisilano (m-THPC-Si) è stato sintetizzato ponendo a reagire l'm-THPC in THF con un eccesso di 3-isocianatopropil-trietossisilano in presenza di trietilammina. L'analisi di spettrometria di massa mostra che il derivato è una miscela dei quattro derivati distinguibili dal loro grado di funzionalizzazione. Per verificare se effettivamente il grado di funzionalizzazione non compromettesse le caratteristiche fotochimiche e fotofisiche del fotosensibilizzatore ho messo a punto due procedure, allo scopo di ottenere come prodotto nel primo caso una miscela composta prevalentemente dal derivato monosilano (mTHPC-monoSi), mentre nel secondo procedimento si ottiene come esclusivo risultato il derivato tetrasilano (mTHPC-tetraSi). I metodi di sintesi si differenziano soltanto per la quantità di isocianato e NEt_3 che vengono aggiunti alla miscela di mTHPC in THF: 2,5 equivalenti per ottenere la miscela con prodotti scarsamente derivatizzati, 4 equivalenti per ottenere il prodotto mTHPC-tetraSi. Questo ultimo composto sarebbe più comodo da utilizzare, perché eviterebbe la presenza, seppur minima, di fotosensibilizzatore non funzionalizzato che si osserva nella miscela di prodotti poco derivatizzati.

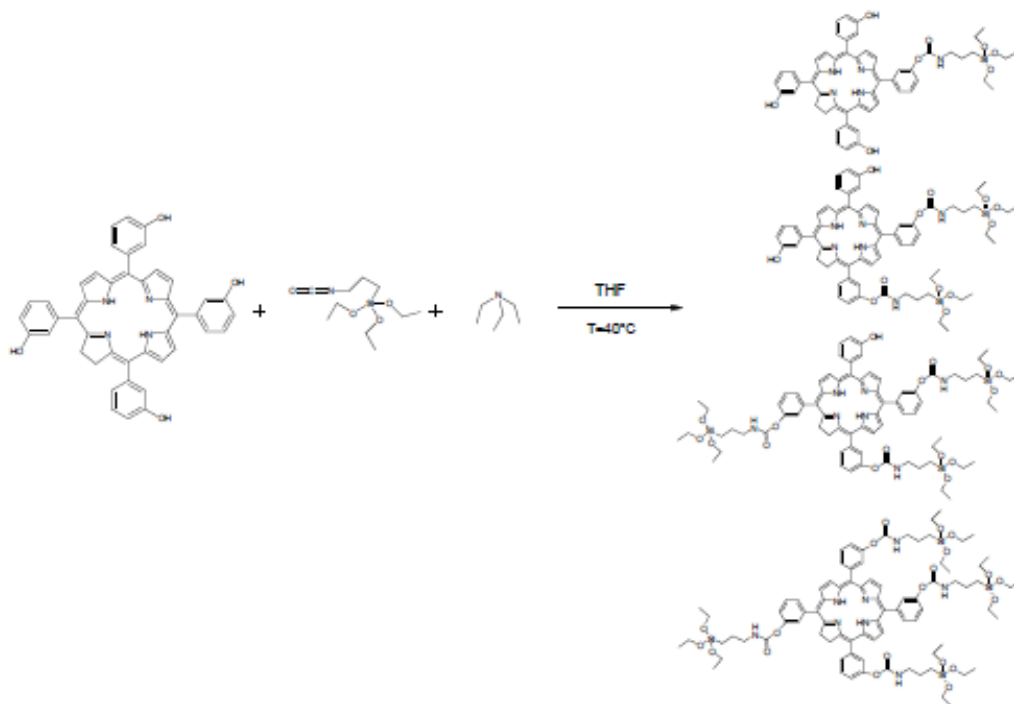


Figura 41: schema della formazione della miscela di derivati dell'mTHPC

Presso l'unità Londinese del Prof. MacRobert sono state effettuate delle misure atte ad esplorare eventuali differenze fotofisiche tra i due prodotti sintetizzati. Poichè l'mTHPC non è solubile in acqua, il solvente utilizzato per le misure deve essere organico. In metanolo, i tempi di vita di fluorescenza sono risultati simili per l'mTHPC e per la molecola poco derivatizzata, mentre la resa di produzione di ossigeno di singoletto subisce un leggero calo del 5%, che aumenta al 10% nel caso dell'mTHPC-tetraSi.

Alla luce di questi risultati sono state sintetizzate diverse preparazioni di nanoparticelle, che si distinguono per diametro, *loading* e grado di funzionalizzazione del fotosensibilizzatore. Su questi campioni è stata misurata l'intensità di fluorescenza ($\lambda_{ecc}=633\text{nm}$, $\lambda_{em,max}=654\text{nm}$) in H_2O e in CH_3OH , mantenendo costante la concentrazione del fluoroforo a $1\mu\text{M}$. I risultati sono riassunti nel grafico sottostante (figura 42).

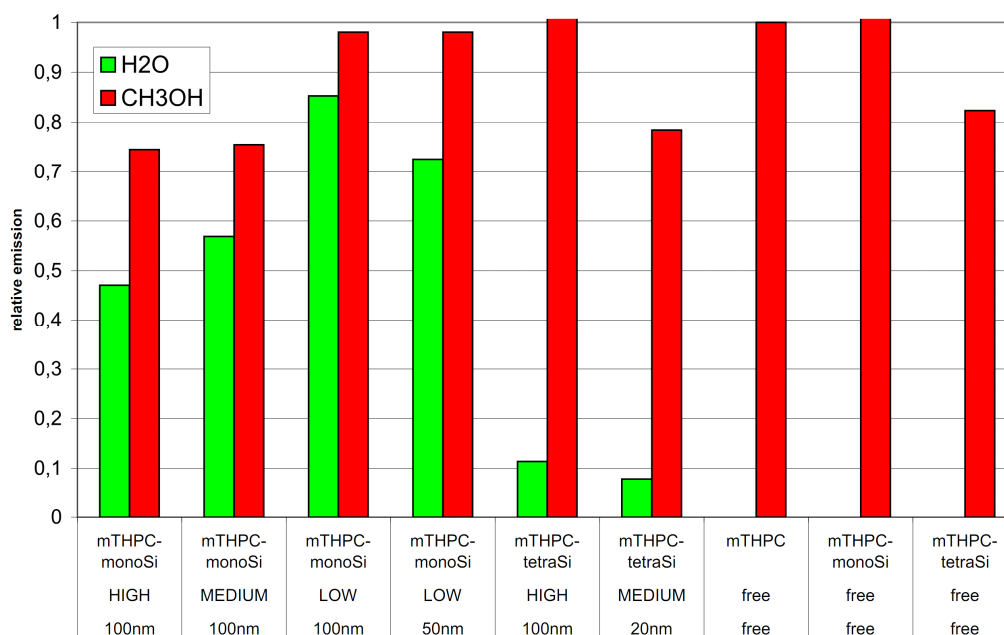


Figura 42: rese di fluorescenza normalizzate di diverse nanoparticelle distinguibili per loading, diametro e grado di funzionalizzazione del fluoroforo.

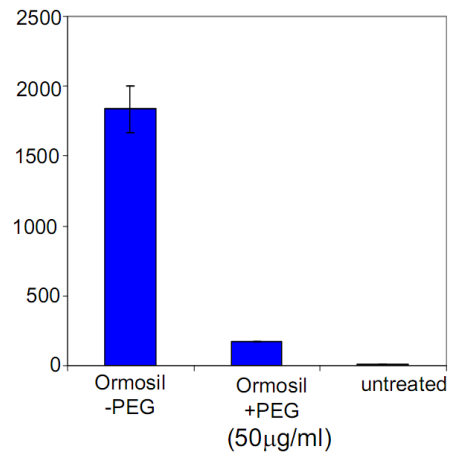
Poichè il fluoroforo libero non è solubile in acqua, anche le misure di intensità di fluorescenza per le nanoparticelle sono state acquisite anche nel mezzo organico, per poter valutare le differenze di emissione nei due casi. Dalle rilevazioni per le nanoparticelle a basso *loading* in CH₃OH, si può concludere che non si osservano particolari differenze di emissione rispetto alla molecola libera. Vi è invece un parziale smorzamento dell'emissione con l'aumentare del *loading*, indice di una parziale aggregazione del fotosensibilizzatore. I dati raccolti sono in linea con le misure effettuate dal Prof. MacRobert, che osserva in CH₃OH una popolazione di fluoroforo aggregata quando la nanoparticella è ad alto loading (sopra l'1%). Il *quenching* di fluorescenza è più evidente quando le nanoparticelle si trovano in solvente acquoso e cresce all'aumentare della concentrazione di clorina nella nanoparticella, seguendo l'andamento osservato in CH₃OH. Uno smorzamento molto elevato lo si denota nel caso di una nanoparticella ad alto *loading* dopata con mTHPC-tetraSi. Viceversa non si scorgono particolari differenze nelle intensità rilevate per nanoparticelle di eguale loading ma di diverso diametro, sia in CH₃OH che in H₂O.

3.6 Risultati biologici

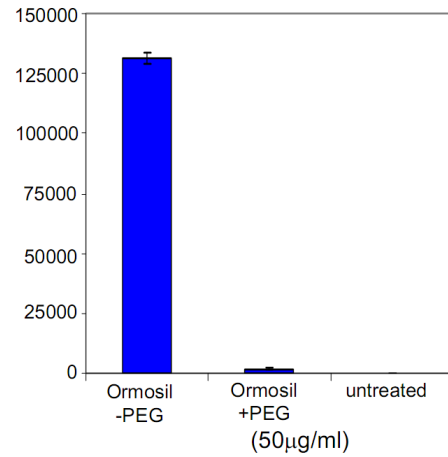
I *partner* del progetto Nanophoto hanno condotto approfondite indagini biologiche *in vitro* e *in vivo*. Per le nanoparticelle PEGilate, questi studi hanno esaminato a fondo le proprietà *stealth* delle nanoparticelle nei confronti delle cellule del sistema immunitario, hanno valutato l'*uptake* verso diverse linee cellulari sia sane che tumorali oltre agli aspetti di citotossicità dei nanovettori, mentre le indagini *in vivo* si sono soffermate sulla farmacocinetica e l'attività PDT delle nanoparticelle dopate con il fotosensibilizzatore. Per le nanoparticelle dotate di agenti direzionanti è stato verificato, oltre alla preservazione delle capacità *stealth* dei nanosistemi, soprattutto il riconoscimento selettivo da parte di specifiche linee cellulari tumorali e l'eventuale maggior *uptake* indotto su queste cellule.

In questa ultima parte della discussione esporrò alcuni dei dati più significativi ottenuti dai *partner* del progetto, ma che evidenziano anche la bontà delle scelte sintetiche e delle strategie adottate per ottenere le nanoparticelle.

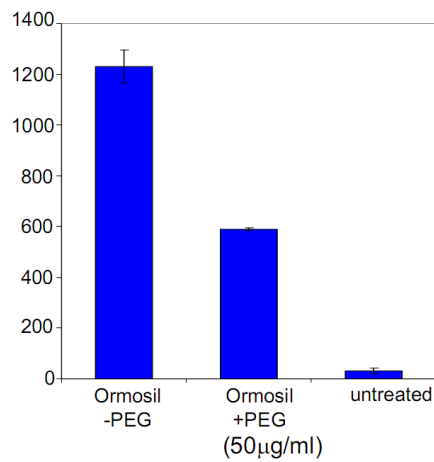
Le cellule fagocitiche del sistema immunitario sono unità biologiche deputate alla ricognizione e alla cattura degli agenti esogeni presenti nell'organismo, quindi sono le prime ad adottare e ad attivare le difese immunitarie nei confronti di eventuali molecole o *carriers* che vengono riconosciuti e intercettati. Il Prof. Papini, presso il CRIBI di Padova, ha ottenuto degli importanti risultati dalle incubazioni *in vitro* di diverse nanoparticelle con i macrofagi, i dendriti e i monociti. La figura 43 evidenzia chiaramente come le nanoparticelle ORMOSIL nude vengano molto fagocitate, mentre lo strato di PEG protegge i *carriers* dall'*uptake*, soprattutto dai dendriti, che al contrario sono estremamente sensibili verso le nanoparticelle non funzionalizzate.



A



B



C

Figura 43: uptake di nanoparticelle PEGilate e non PEGilate. A) macrofagi B) cellule dendritiche C) Monociti

La proprietà *stealth* delle nanoparticelle è stata verificata non solo per le cellule del sistema immunitario, ma anche per tutte le altre linee cellulari testate. Un esempio è riportato nel grafico di figura 44, in cui sono riassunti i dati ottenuti da misure di citofluorimetria per la linea cellulare A549 (carcinoma polmonare), misure eseguite dalla Dott.ssa Reddi del dipartimento di Biologia di Padova.

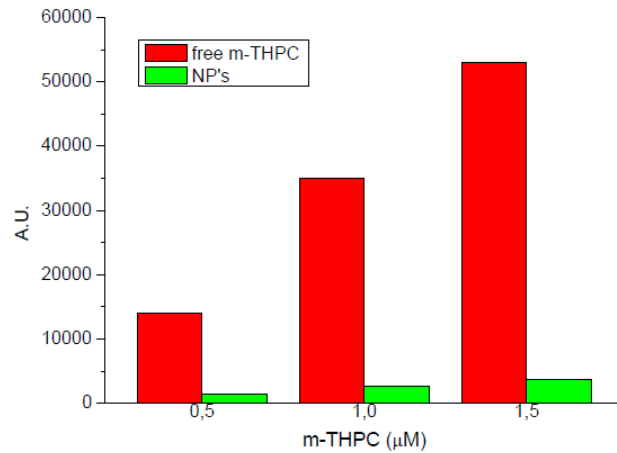


Figura 44: uptake cellulare della A549 verso le nanoparticelle PEGilate rispetto al mTHPC libero.

Le barre indicano il differente *uptake* delle cellule per l'm-THPC libero, rispetto alle nanoparticelle PEGilate con l'm-THPC-Si. E' evidente come il sistema di trasporto presenti evidenti caratteristiche di invisibilità anche nei confronti di cellule non appartenenti al sistema immunitario.

Nei laboratori del Prof. MacRobert presso l'UCL di Londra sono stati eseguiti studi di farmacocinetica in topi nei quali era stato impiantato un fibrosarcoma. La valutazione della biodistribuzione del farmaco nell'animale ha riguardato il fotosensibilizzatore libero e trasportato da differenti *carriers*: liposomi e nanoparticelle PEGilate di diverse dimensioni (20nm e 100nm). Le evidenze sperimentali sono riassunte nella figura 45.

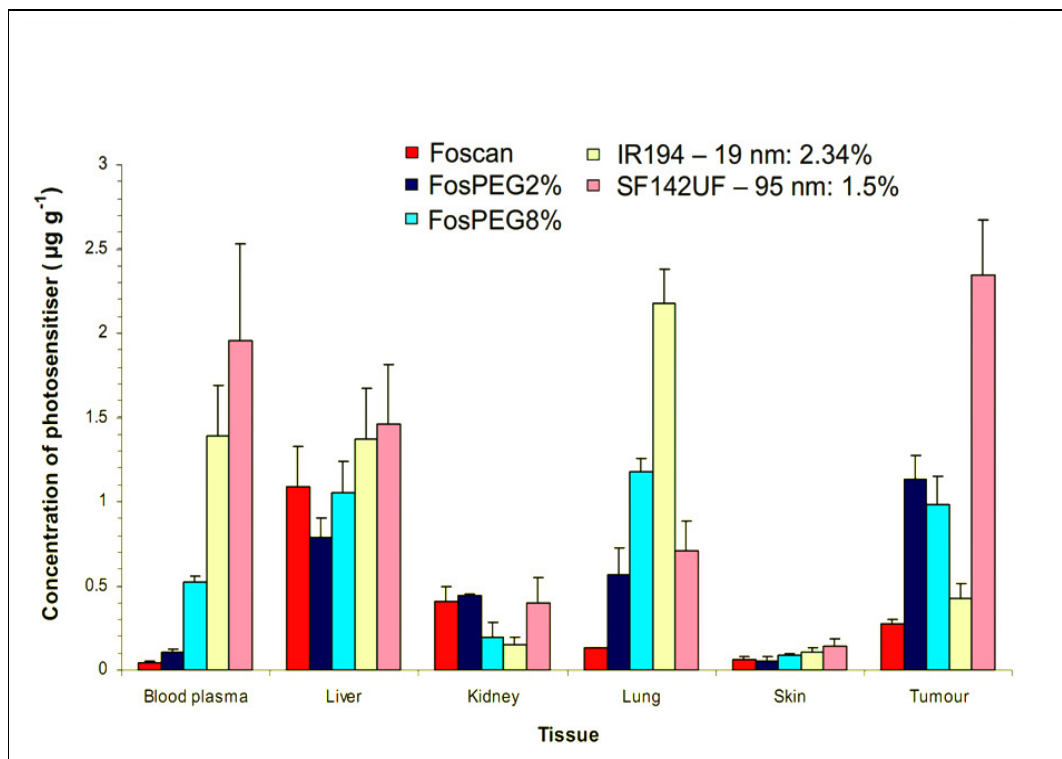


Figura 45: biodistribuzione in vivo di diversi carrier dopati con mTHPC rispetto al farmaco commerciale

Dal grafico possiamo apprezzare l'accumulo riscontrato in diversi tessuti e nel sangue dopo 24 ore dall'iniezione di 0,3 mg/Kg di mTHPC. Il primo risultato evidente è l'alta concentrazione nel sangue di nanoparticelle, indicazione che anche nel sistema *in vivo* il denso *coating* di PEG consente al vettore di non subire *clearance* da parte delle cellule del sistema immunitario. L'alto tempo di circolazione del *carrier* conduce ad un ottimo risultato di accumulo nel tumore per effetto EPR, ma solamente per le nanoparticelle da 100nm. La concentrazione di farmaco raggiunta nel tessuto malato è di circa 8 volte superiore rispetto al fotosensibilizzatore libero.

I risultati più interessanti per il *targeting* attivo delle nanoparticelle sono stati ottenuti dal Prof. Colombatti presso l'Università di Verona, utilizzando i nanovettori coniugati con l'anticorpo monoclonale D2B, specifico per le cellule di un tumore prostatico. In particolare ha studiato l'*uptake* delle nanoparticelle direzionate dall'anticorpo su diverse linee cellulari, PSMA positive e negative, mediante analisi citometrica. In figura 46 sono riportati gli istogrammi relativi alle misure effettuate su cellule PSMA negative (la riga in alto) e PSMA positive (la riga sotto) utilizzando anticorpi marcati con

fluoresceina. Il dato citofluorimetrico è espresso da un'istogramma dove l'ascissa riporta l'intensità di fluorescenza e l'ordinata il numero di cellule responsabili del segnale. La prima colonna riguarda l'analisi delle sole cellule ed agisce da controllo, mentre la seconda mostra i risultati sulle cellule incubate 24h a 4°C in presenza dell'anticorpo D2B e infine la terza colonna illustra i dati ottenuti su cellule incubate 24h a 4°C con nanoparticelle coniugate con l'anticorpo D2B.

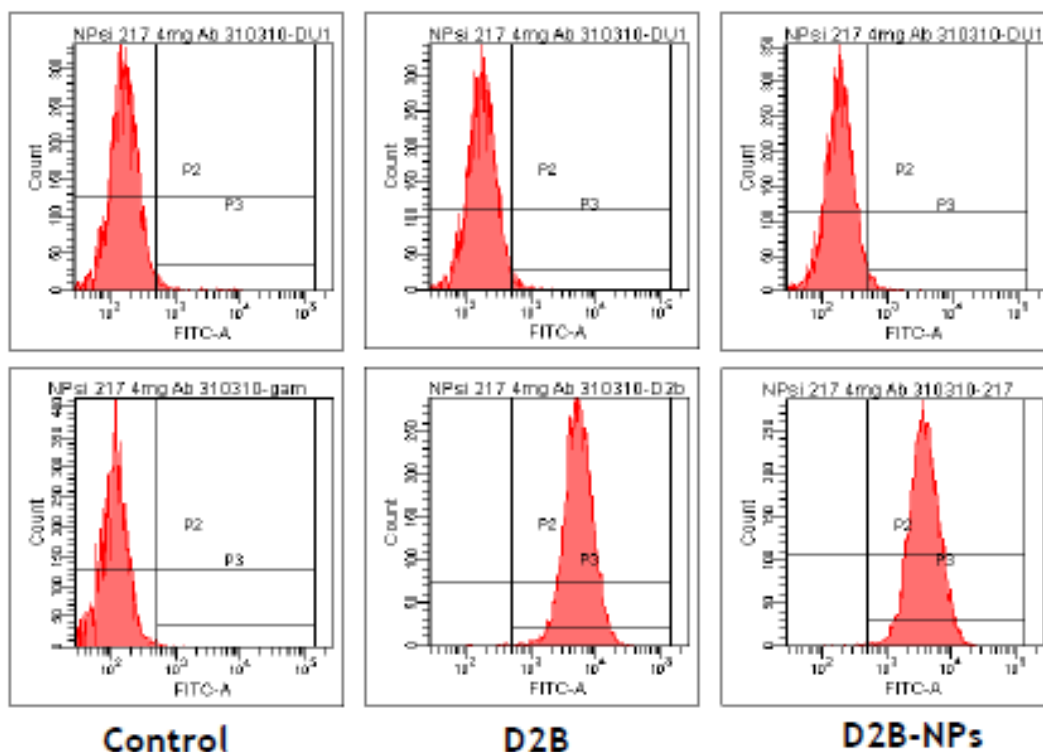


Figura 46: l'*uptake* delle nanoparticelle direzionate dall'anticorpo su diverse linee cellulari, PSMA positive e negative, mediante analisi citometrica

Per comprendere correttamente i dati esposti dalla figura 46 osserviamo che nella prima riga, relativa alle cellule DU 145 che sono PSMA negative, l'intensità di fluorescenza non varia rispetto al controllo, mentre nella riga più in basso l'intensità della radiazione data dalle cellule LNCaP, che sono PSMA positive, aumenta di cento volte rispetto al controllo. Questo avviene sia con l'incubazione del solo anticorpo monoclonale in forma libera, sia nel caso delle nanoparticelle coniugate all'anticorpo. Questo risultato dimostra che l'anticorpo D2B è effettivamente legato alla superficie

delle nanoparticelle, inoltre l'analisi dà prova che solo le cellule LNCaP presentanti l'antigene PSMA riconoscono tale anticorpo e perciò legano le nanoparticelle e le internalizzano per l'effetto direzionante della coniugazione.

Il destino intracellulare delle nanoparticelle coniugate all'anticorpo MAb D2B è stato valutato in via preliminare mediante microscopia confocale, osservando la fluorescenza dell'mTHPC. Le figure relative agli esperimenti di microscopia confocale (figura 47) mostrano rispettivamente l'immagine delle cellule LNCaP, l'immagine delle stesse cellule incubate per 24 ore a 37°C con un campione di nanoparticelle funzionalizzate con gruppi amminici ma non ancora coniugate, e infine l'immagine delle cellule incubate per lo stesso tempo e nelle stesse condizioni con un campione di nanoparticelle coniugate con l'anticorpo.

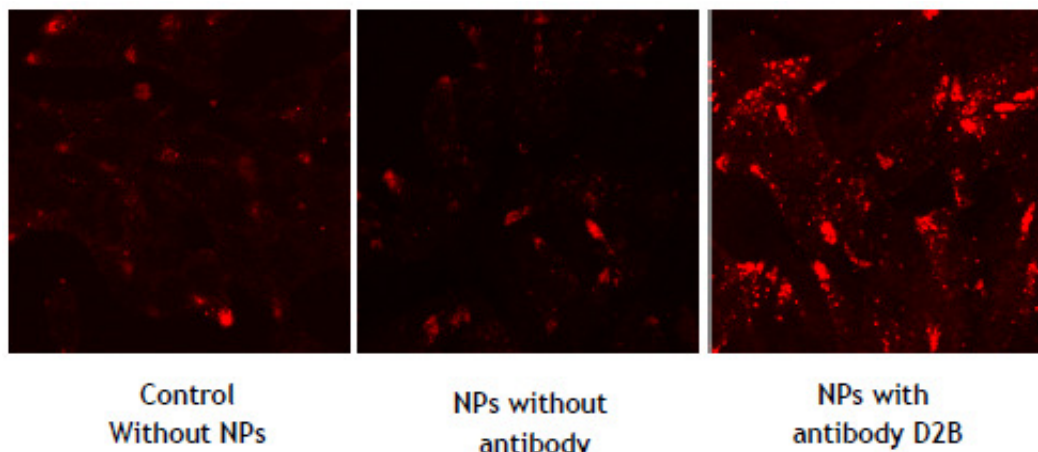


Figura 47: immagini microscopia confocale di nanoparticelle dopate con mTHPC- Si e coniugate con l'anticorpo D2B

Nell'immagine centrale di figura 47 relativa ai *carriers* non coniugati si osserva un fievolissimo segnale di fluorescenza, indice di una internalizzazione molto bassa. Di tutt'altro aspetto è l'immagine a destra relativa ai vettori coniugati con l'anticorpo, in cui si possono chiaramente identificare le nanoparticelle all'interno delle cellule, dimostrando il ruolo positivo dell'anticorpo nel *targeting*.

Altre considerazioni possono essere dedotte da quest'ultima immagine di microscopia, relativamente alla localizzazione e alla forma della

fluorescenza data dai *carriers* all'interno delle cellule. Infatti, questa presenta un aspetto puntiforme ed è localizzata in una zona ben precisa della cellula, al lato del nucleo, presumibilmente coincidente con il reticolo endoplasmatico. Ciò indica che il coniugato anticorpo-nanoparticella è presente in vescicole e non diffuso nell'intero compartimento citoplasmatico, suggerendo che l'internalizzazione possa avvenire per endocitosi. Inoltre in modo indiretto ciò indica anche che la fluorescenza è data dalle nanoparticelle contenenti mTHPC e non da farmaco libero, poiché esso sarebbe distribuito in tutto il citoplasma.

L'efficacia del *targeting* con anticorpi è stata valutata anche dal Prof. Papini, che ha coniugato le nanoparticelle con l'Erbibix[®] (NP-Erb), un anticorpo monoclonale anti-EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) ovvero che agisce coniugandosi al recettore inibendone l'attività. Il nanosistema ottenuto è stato incubato con linee cellulari che esprimevano un diverso grado del recettore EGFR. In figura 48 sono riportate le immagini di microscopia confocale ottenute dall'incubazione a diversi tempi delle nanoparticelle NP-Erb con la linea cellulare A431 (che esprime fortemente l'EGFR) e HeLa (che non esprime l'antigene). Le immagini raccolte a tempi diversi permettono di osservare il *binding* cellulare per i tempi brevi (15 minuti) mentre per i tempi più lunghi (2 ore) si apprezza l'*uptake* delle cellule. Dall'esame delle figure si può apprezzare che solamente le cellule A431 esprimono il *binding* delle nanoparticelle, con la localizzazione dei nanosistemi sulla membrana plasmatica e in qualche endosoma, mentre le cellule prive del recettore (HeLa) non hanno permesso nessun tipo di riconoscimento dell'anticorpo e quindi nessuna nanoparticella si è legata alla cellula, tanto che non è stata nemmeno acquisita l'immagine. L'analisi delle figure acquisite dopo 2 ore di incubazione riflette la situazione osservata a tempi brevi, ma in questo caso possiamo apprezzare anche la localizzazione delle nanoparticelle dentro alle cellule. Infatti la linea cellulare A431 presenta un forte *uptake* delle nanoparticelle che sono localizzate negli endosomi dentro alla cellula, mentre l'immagine confocale delle HeLa è molto debole, tanto che il segnale delle nanoparticelle si confonde con la luminescenza di fondo delle cellule. Inoltre le immagini di microscopia confocale hanno indicato che l'*uptake* delle NP-

Erb è proporzionale all'espressione del recettore EGFR per le diverse linee cellulari indagate. Dei risultati pressochè identici all'Erbitux[®] sono stati ottenuti coniugando l'anticorpo monoclonale EGF (*Epithelial Growth Factor*) alle nanoparticelle, provandole con le stesse linee cellulari (dati non riportati).

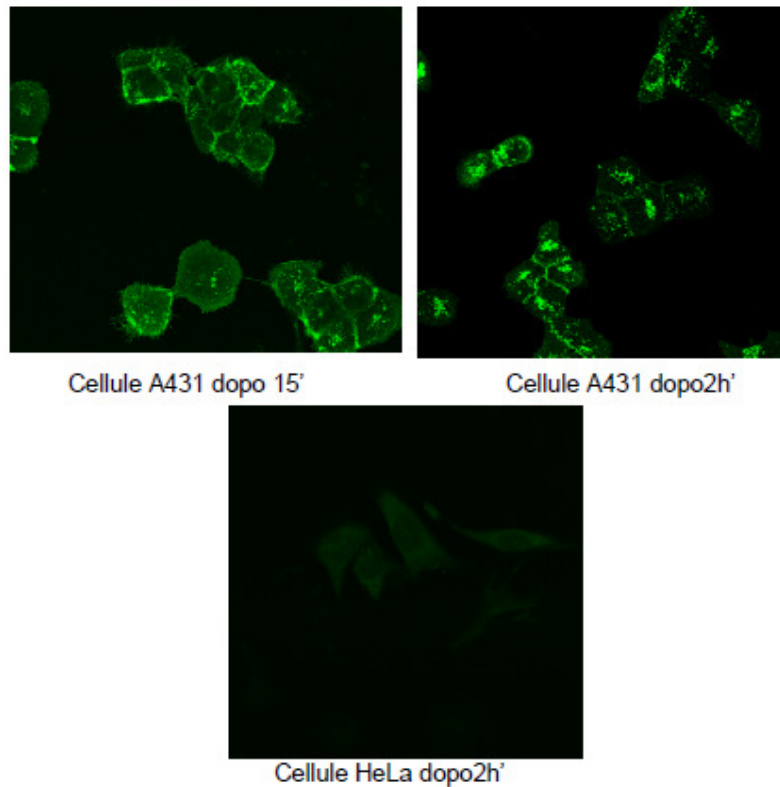


Figura 48: microscopia confocale di nanoparticelle coniugate con anticorpo antiEGFR incubate con differenti linee cellulari

Presso i laboratori di Padova del Prof. Papini e della Dott.ssa Reddi sono state eseguite numerose prove di citotossicità dei nanosistemi PEGilati sulle cellule appartenenti a linee cellulari sia sane che tumorali, inoltre è stata indagata l'eventuale interferenza delle nanoparticelle sui tempi di coagulazione del sangue.

Per quanto riguarda questo ultimo aspetto, ci si può rendere conto dalla figura 49 come le nanoparticelle di tipo ORMOSIL, sia dotate del *coating* di PEG che "nude", non modificano sostanzialmente il tempo di coagulazione del sangue intero, anche ad alte concentrazioni (100µg/mL). Al contrario, il fenomeno avviene molto rapidamente nel caso siano utilizzate delle nanoparticelle di pura silice amorfa (SAS). Queste inducono il fenomeno con

tempi simili all'ecarina, un enzima isolato dal veleno di una particolare specie di vipera, il quale attiva la protrombina che induce la rapida coagulazione del sangue.

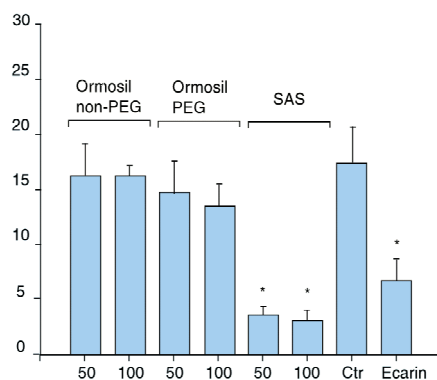


Figura 49: tempo di coagulazione del sangue intero

Alle medesime conclusioni si giunge analizzando la cinetica di coagulazione per il sangue impoverito di piastrine (figura 50). In questo caso la calcinazione è indotta dall'attivazione di meccanismi differenti dal precedente, tuttavia i *carrier* di silice ORMOSIL non influiscono sulla cinetica di coagulazione, mentre questa è bruscamente velocizzata dalla presenza di nanoparticelle di silice pura.

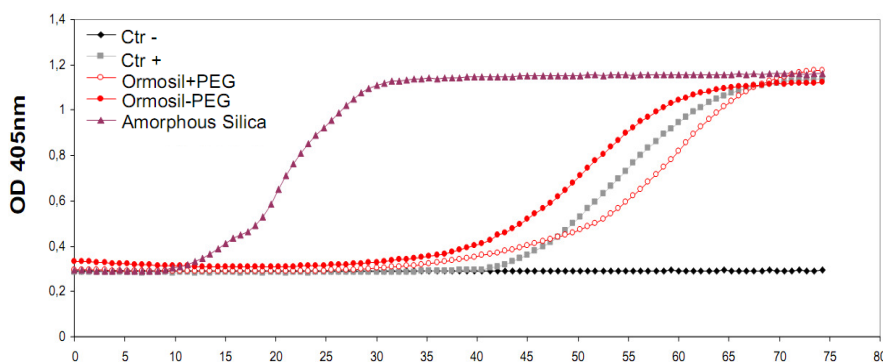


Figura 50: cinetica di coagulazione del Plasma

Un altro particolare meccanismo di attivazione della coagulazione del sangue è la produzione di *Tissue Factor* (TF). La sintesi di questo fattore da parte di alcune cellule del sangue è un fenomeno stimolato dalle

nanoparticelle ORMOSIL, mentre nanosistemi di silice pura non inducono questo meccanismo di coagulazione. In figura 51 sono riportati i dati ottenuti dall'espressione del TF dai monociti, i quali sono particolarmente stimolati dalle nanoparticelle ORMOSIL nel produrre TF. Anche in questo caso la protezione della superficie della nanoparticella ORMOSIL con il *coating* di PEG limita fortemente l'espressione del fattore. Questa è un'ulteriore prova della scarsa interazione delle proteine o di altri fattori con la superficie delle nanoparticelle.

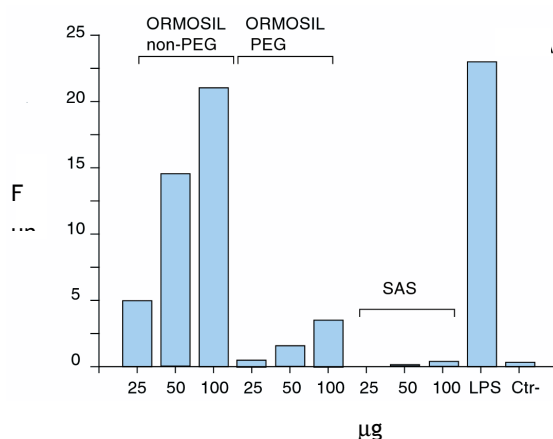


Figura 51: espressione del Fissue Factor

Tuttavia le nanoparticelle PEGilate inducono in alcuni casi un effetto citotossico. Ciò è quanto è stato riscontrato dalla Dott. Reddi, che ha incubato, insieme a due linee cellulari, le A549 (cellule tumorali) e le CCD-34Lu (cellule normali), delle nanoparticelle di 70 nm con *coating* di PEG₂₀₀₀. La figura 52 evidenzia come le nanoparticelle esprimano una forte citotossicità per la linea cellulare tumorale, mentre le cellule sane muoiono solo in piccola percentuale se incubate con alte concentrazioni di nanoparticelle per lungo periodo (48h). Perciò, non solo le nanoparticelle possono indurre tossicità cellulare, ma questa dipende anche dalla linea cellulare esaminata. Ulteriori indagini (di cui non riporto una discussione dettagliata) hanno attribuito la citotossicità all'aumento intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'incremento dei ROS viene indotto dalle nanoparticelle internalizzate, nonostante l'*uptake* dei nanovettori sia molto modesto per la presenza del *coating* di PEG. La generazione dei ROS viene metabolizzata in modo differente dalle due linee cellulari: ciò significa che

anche le cellule tumorali, notoriamente più resistenti verso lo *stress* ossidativo, possono essere più sensibili a questo meccanismo citotossico. Ma l'aspetto più interessante riguarda un secondo meccanismo citotossico, che viene attivato esternamente alla cellula, a causa dell'interazione delle nanoparticelle con dei recettori della membrana cellulare. Il *binding* delle nanoparticelle PEGilate attiva dei meccanismi che inducono una risposta infiammatoria nella cellula. La diversa citotossicità osservata per le due linee cellulari indagate potrebbe perciò anche dipendere dai diversi recettori di membrana attivati. Poiché le interazioni con i recettori sono solitamente mediate da specifiche proteine, ciò indicherebbe che la PEGilazione abbatte l'adsorbimento delle proteine sulla superficie delle nanoparticelle ma non lo elimina completamente, tanto da permettere l'interazione tra i recettori di membrana e le proteine adsorbite sul *carrier* e attivare così dei processi infiammatori nella cellula.

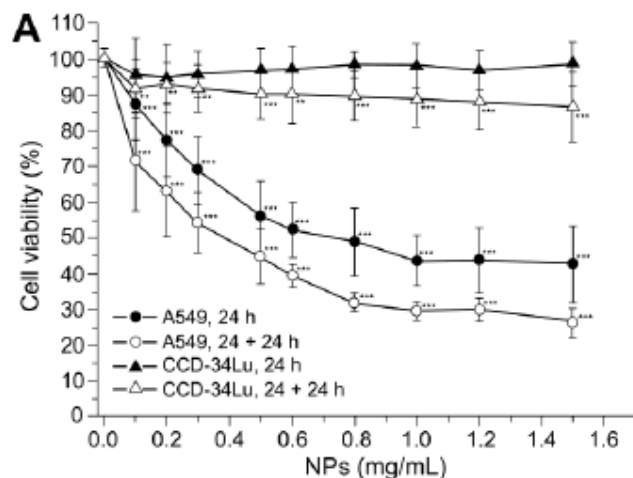


Figura 52: citotossicità delle nanoparticelle PEGilate verso una linea cellulare tumorale e una sana.

4. Conclusioni

Durante il triennio del mio dottorato di ricerca mi sono concentrato sulla sintesi di nanovettori di silice ORMOSIL che potessero trovare applicazionee nella terapia fotodinamica. L'utilizzo di un nanovettore per trasportare il fotosensibilizzatore può risolvere alcuni peculiari problemi dei farmaci fotodinamici, in particolare le farmacocinetiche imprevedibili, lo scarso accumulo nel tessuto bersaglio e la fotosembilizzazione di tessuti esposti alla luce solare, come occhi e pelle. Perciò gli obiettivi primari del mio progetto di dottorato erano di produrre nanoparticelle di silice caricate con il fotosensibilizzatore mTHPC, capaci di preservare le caratteristiche del farmaco, ma allo stesso tempo dotare il nanovettore di una ricopertura di polietilenglicole (PEG), affinché il nanosistema potesse esserre utilizzato anche in ambiente biologico. Le nanoparticelle di silice "nude" sono infatti instabili verso l'aggregazione in condizioni fisiologiche e vengono rapidamente fagocitate dalle cellule del sistema immunitario, ed è noto che i derivati del PEG agganciati alla superficie di nano sistemi di questo e di altri tipi possono risolvere questi problemi schermando la nanoparticella dall'interazione con le proteine presenti in abbondanza nei fluidi biologici.

Per raggiungere questo primo traguardo ho vagliato le possibilità di sintesi delle nanoparticelle tra quelle presenti in letteratura. La scelta è ricaduta sulle nanoparticelle ORMOSIL, che avevano dimostrato di poter incapsulare il fotosensibilizzatore in forma monomeric. Partendo dalla sintesi originale proposta da Prasad (in cui il viniltrietossisilano polimerizza all'interno di micelle stabilizzate da un tensioattivo), ho contribuito a perfezionare il protocollo, per giungere ad una sintesi capace di dare *one-pot* nanoparticelle densamente PEGilate, dopate con una qualsiasi molecola idrofobica e purificabili molto più velocemente. La chiave della procedura risiede nel preparare come precursore un derivato del PEG, con un gruppo trimetossisilano al vertice della catena, capace di conferire al polimero le caratteristiche di un surfattante. In questo modo il derivato del PEG si va ad

inserirsi nell'interfaccia olio/acqua della microemulsione in cui avviene la formazione della nanoparticella e vi rimane intrappolato durante la polimerizzazione nella giusta posizione.

Il *coating* di PEG₂₀₀₀ si è dimostrato molto efficiente nel proteggere le nanoparticelle, tanto che sono diventate stabili in soluzioni fisiologiche, hanno carattere *stealth in vitro* nei confronti delle cellule del sistema immunitario e non stimolano i fattori di coagulazione del sangue oltre ad avere una tossicità ridotta rispetto alle ORMOSIL. Queste caratteristiche di invisibilità sono evidenti anche *in vivo*, infatti la concentrazione delle nanoparticelle nel sangue nelle cavie è ancora molto elevata dopo 24 ore: ciò ha permesso ai nanovettori da 100 nm di aumentare la concentrazione del farmaco nel tumore di circa 8 volte grazie ad un efficiente effetto EPR.

Una delle caratteristiche della sintesi di Prasad è la spontanea incapsulazione di molecole idrofobiche nella matrice silicea. Queste possono però fuoriuscire dalle nanoparticelle estratte dalle proteine del siero. Lo strato di PEG in questo caso ha dimostrato di rallentare e limitare la fuga dell'mTHPC dal nanovettore, ma di non essere in grado di bloccarla. Perciò il fotosensibilizzatore è stato legato alla matrice silicea, funzionalizzando con un gruppo tretossisilano uno degli ossidrilici fenolici della molecola. Poiché il farmaco possiede 4 gruppi fenolici è possibile ottenere miscele di prodotti distinguibili dal diverso grado di funzionalizzazione. Questo ha richiesto una attenta indagine per verificare se un maggiore legame con la matrice silicea non conducesse ad una minore attività di generazione di specie citotossiche. Ciò è stato possibile sintetizzando il farmaco tetra-funzionalizzato e una miscela di molecole a minore grado di funzionalizzazione, poi sono stati preparati diversi campioni di nanoparticelle distinguibili per diametro, loading e grado di funzionalizzazione. Le prime misure di fluorescenza sono state condotte in solvente organico per poter confrontare le nanoparticelle con il farmaco libero, in questo caso è emerso che il grado di funzionalizzazione non altera l'emissione del mTHPC mentre vi è una piccola diminuzione di resa quantica di fluorescenza all'aumentare del loading. Per determinare eventuali differenze di resa in ambiente biologico, le misure successive sono state condotte in acqua e queste hanno rivelato un quadro più problematico: da una

parte una più marcata diminuzione della fluorescenza all'aumentare del loading, nel caso del fotosensibilizzatore meno funzionalizzato. D'altra parte la molecola a maggiore grado di coniugazione con la matrice silicea ha invece indicato un forte quenching della fluorescenza in acqua, per probabile aggregazione della molecola.

Il protocollo di sintesi delle nanoparticelle si è dimostrato anche molto flessibile e utile per affrontare la seconda fase del progetto, che richiedeva la coniugazione dei nanovettori con agenti direzionanti. La prima strategia adottata richiedeva la sintesi di un derivato dell'agente di targeting per coniugazione con una catena di PEG funzionalizzata con un gruppo trietossisilano. Questa strategia si è rivelata molto complicata e inefficiente. Il secondo approccio ha invece condotto, sempre in un unico passaggio di sintesi, a nanovettori con gruppi funzionali liberi sulla superficie di PEG, disponibili per essere funzionalizzati. Il gruppo reattivo studiato è stato un'ammina, ottenuta partendo da un derivato PEG-diammina funzionalizzando una sola di esse con un gruppo trimetossisilano. Di nuovo il derivato ottenuto ha caratteristiche di surfattante e va a posizionarsi sulla superficie della particella esponendo i gruppi reattivi. Va peraltro sottolineato che questa stessa strategia potrebbe essere utilizzata per altri derivati del PEG b, capaci di esporre gruppi funzionali differenti dall'ammina, come gli acidi carbossilici. Il gruppo reattivo può essere sfruttato direttamente nell'ambiente di reazione di sintesi delle particelle per legare piccole molecole organiche, come l'acido folico e la biotina, modificate come esteri attivi, oppure la preparazione può essere purificata e conservata per funzionalizzare i gruppi reattivi in un secondo momento.

Dei risultati preliminari molto promettenti sono stati ottenuti dagli esperimenti di riconoscimento attivo *in vitro* con nanoparticelle coniugate con anticorpi monoclonali, come anti-PSMA e anti EGF, e con ligandi selettivi come l'EGF, che hanno dimostrato di riconoscere selettivamente l'antigene di una cellula e di stimolare l'*uptake*.

In definitiva, questo lavoro di tesi mi ha permesso di mettere a punto ed esplorare le potenzialità di un nano vettore per la terapia fotodinamica che può essere preparato con facilità, possiede ottime proprietà stealth. Ciò

nonostante, la strada da percorrere per giungere ad un vero e proprio nano-farmaco è ancora lunga. Dovrà infatti essere testata l'efficacia in vivo nell'indurre fototossicità verso i tumori, il feto a lungo termine delle particelle, la reale possibilità di produzione in larga scala. Inoltre, i dati ottenuti nel corso del mio lavoro sperimentale evidenziano alcune criticità che dovranno essere affrontate: la prima è la necessità di una modificazione del foto sensibilizzate per evitarne il rilascio, che richiederà una nuova procedura di approvazione della molecola da parte delle autorità regolatorie, il secondo è la perdita di efficienza di emissione della luce del l'm-THPC all'aumentare del loading nelle particelle, che implica che la dose attiva presente nella preparazione particellare è intrinsecamente bassa, infine vi sono le stesse proprietà stealth, che fanno sì che la particelle si possa efficacemente accumulare nel tumore, ma che non entri nelle cellule malate. Quest'ultima caratteristica fa sì che essa dovrebbe essere in grado di esercitare esclusivamente un danno di tipo vascolare, meno efficace nella cura della malattia. D'altra parte i problemi di penetrazione nelle cellule potrebbero essere superati dalla coniugazione con agenti di targeting.

Spero però che i risultati preliminari ottenuti in questo lavoro di tesi possano indicare che la lunga strada la nanomedicina deve ancora percorrere valga la pena di essere esplorata.

5. Parte Sperimentale

5.1 Strumentazione

Spettroscopia UV-VIS: lo spettrofotometro impiegato per la registrazione degli spettri UV-VIS è un Varian Cary 50 gestito con software Cary WinUV, dotato di lampada allo xenon impulsata e portacelle termostatato a circolazione d'acqua. Per le analisi sono state utilizzate cuvette con cammino ottico di un centimetro.

Dynamic Light Scattering (DLS): le misure DLS sono state effettuate con uno strumento ZetaSizer NanoS della Malvern che utilizza un laser operante a 633 nm e misura l'intensità di luce diffusa a 176°. Per le analisi sono state utilizzate cuvette in plastica con cammino ottico di un centimetro in un portacelle termostatato con un sistema Peltier.

Ultrafiltrazione: per gli esperimenti di ultrafiltrazione sono stati utilizzati apparati di filtrazione Millipore® da 50 ml con membrane Amicon® in cellulosa rigenerata di 44 mm. Le membrane hanno un *cut-off* di 10.000 Dalton e un diametro medio dei pori di circa 3 nm.

Spettroscopia di fluorescenza: il fluorimetro utilizzato per la registrazione degli spettri di fluorescenza è un Varian Cary Eclipse, gestito con software Cary Eclipse, dotato di lampada allo xenon impulsata e portacelle termostatato a circolazione d'acqua. Per le analisi sono state usate cuvette di quarzo con cammino ottico di un centimetro.

Spettrometria di risonanza magnetica nucleare: lo spettrometro utilizzato è un Bruker AC 250F operante a 250 MHz per spettri protonici. I chemical shift sono riferiti al tetrametilsilano utilizzato come standard interno. La

simbologia utilizzata per descrivere i segnali spettrali è la seguente: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, m = multipletto, bs = allargato.

Spettrometria di Massa: le analisi ESI-MS sono state effettuate con lo strumento LC/MSD Trap-SL & XCT della Agilent Technologies.

Esperimenti ed immagini TEM: gli esperimenti di Microscopia Elettronica in Trasmissione sono stati effettuati al Dipartimento di Biologia “Vallisneri” dell’Università di Padova. Le immagini sono state ottenute con un microscopio a trasmissione elettronica Fei Tecnai 12, operante a 100 kV.

Centrifuga: nel work-up delle sintesi si è utilizzata la centrifuga Thermo Scientific IEC CL 10, che può raggiungere i 4000 rpm; nella caratterizzazione delle nanoparticelle e in alcuni test su di esse si è utilizzato il concentratore rotativo a vuoto RVC 2-25, che può raggiungere i 1350 rpm.

5.2 Solventi, soluzioni e prodotti commerciali

Acqua milliQ: preparata utilizzando acqua deionizzata ($R > 18 \text{ M}\Omega$) filtrata con sistema MILLI-Q della Millipore® ($\text{H}_2\text{O MQ}$), è stata impiegata negli esperimenti di ultrafiltrazione e nella preparazione delle soluzioni per le misure spettrofotometriche.

m-THPC: fornita dalla Biolitec AG (Jena, Germania).

PBS (Phosphate Saline Buffer): soluzione acquosa di sali inorganici, contenente NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Gel di silice: per la cromatografia su strato sottile (TLC) sono state utilizzate lastrine di gel di silice in vetro Merck 60 F₂₅₄ (0.25mm) e Machery-Nagel di gel di silice in poliestere (0.25mm).

Prodotti commerciali forniti dalla Sigma-Aldrich® o dalla Fluka®:

2-(4-clorosolfonilfenil) etiltrimetossisilano, 50% soluzione in CH₂Cl₂

3-isocianatopropil-trietossisilano

Acido borico

Acido folico

Amberlite IRA-96: resina a scambio anionico debolmente basica (4,7meq/g)

Bio-Beads Biorad SM-2: resina polistirenica

Biotina

Brij 35: tensioattivo

DCC

Fluorescamina (Product Number F9015)

mPEG-NH₂

NHS

PEG-bis-(3-aminopropil etero)

Propilammia

VTES (viniltrietossisilano)

EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel (Product Number E5529)

Si tratta di una sospensione di streptavidina in PBS a pH 7.2 contenente 50% (v/v) di glicerolo e 15ppm di Kathon® CG/IPCII, un conservante antimicrobico.

Ligand density: 0.8-2 mg di streptavidina per ml di gel

Binding capacity: circa 10 µg di biotina per ml di gel

HABA/Avidin Reagent (Product Number H2153)

Una volta ricostituita con 10 ml di acqua deionizzata la soluzione (pH circa 7.3) risulta così composta:

0.3mM HABA (4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid)

0.45 mg/ml avidin

0.3 M NaCl

0.01 M HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-NN-[2-ethanesulfonic acid], un tampone con pKa = 7.5)

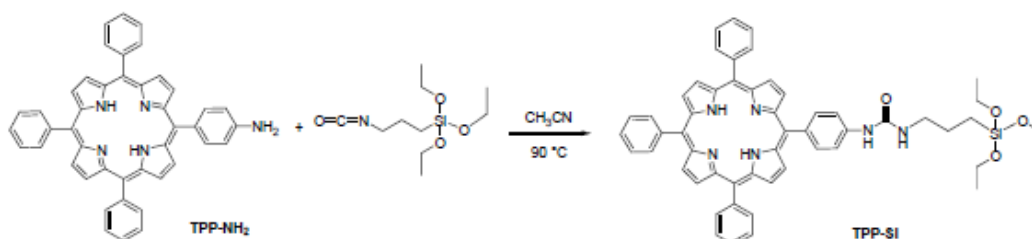
0.01 M MgCl₂

0.02% Sodium azide (come conservante)

I solventi e i reagenti commercialmente disponibili sono stati usati senza ulteriore purificazione.

5.3 Sintesi dei precursori fluorescenti

5.3.1 Sintesi di *N*-(3-trietossisililpropil)-*N'*-[4-(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea (TPP-Si)



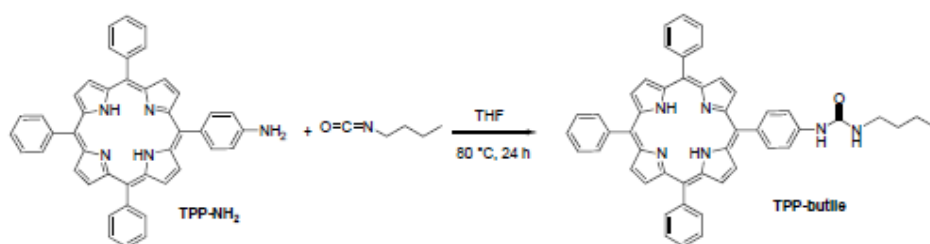
	<i>PM</i>	<i>mg</i>	<i>mmol</i>	<i>mL</i>	<i>d(g/ml)</i>	<i>eq</i>
5-(4-amminofenil)- 10,15,20- trifenilporfirina	629.75	50	0.08			1
3-isocianatopropil- trietossisilano	247.37	198	0.8	0.198	1.002	10
CH ₃ CN				8		

In una fiala da 25 mL, oscurata alle pareti e munita di ancoretta magnetica, si introducono 50 mg (0.08 mmol) di 5-(4-amminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina disciolti in 6 mL di CH₃CN anidro. Si aggiungono quindi, goccia a goccia, 198 µL (0.8 mmol) di 3-trietossisililpropilisocianato disciolti in 2 mL di CH₃CN anidro e si lascia decorrere la reazione a 90 °C per 24 ore, seguendone il decorso mediante TLC (eluente EtPet/EtOAc 2:1, R_F = 0.22). Si rimuove il solvente a pressione ridotta e si riprende il solido viola con poco diclorometano. Si aggiungono quindi 60 mL di n-esano per precipitare un solido viola, che sedimenta dopo 20 minuti di centrifugazione a 4000 rpm. Il

surnatante viene rimosso e la procedura viene ripetuta tre volte, fino ad ottenere 52 mg di **1** sotto forma di solido viola scuro (resa 74%) dopo la rimozione del solvente residuo a pressione ridotta.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ -2.78 (s, 2H, NH); 0.77 (t, 2H, J = 7.5 Hz, SiCH₂); 1.27 (t, 9H, J = 7 Hz, CH₃CH₂O); 1.80 (qn, 2H, J = 7.5 Hz, SiCH₂CH₂); 3.88 (q, 6H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂O); 7.73 (m, 11H, ArH); 8.18 (m, 8H, ArH); 8.87 (m, 8H, ArH).

5.3.2 Sintesi di *N*-butil-*N'*-[4-(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea (TPP-butile)



	PM	mg	mmol	mL	d(g/ml)	eq
5-(4-amminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina	629.75	25	0.08			1
1-butilisocianato	99.13	80	0.8	0.09	0.890	20
THF				4		

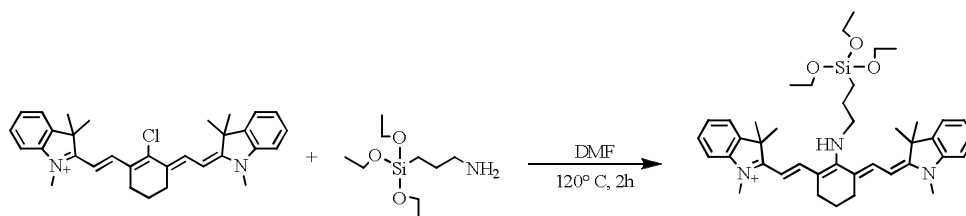
In una fiala da 10 mL, oscurata alle pareti e munita di ancorotta magnetica, si introducono 25 mg (0.04 mmol) di 5-(4-amminofenil)-10,15,20-trifenil-21,23H-porfirina disciolti in 3 mL di CH₃CN anidro. Si aggiungono quindi, goccia a goccia, 90 µL (0.8 mmol) di 1-butilisocianato disciolti in 1 mL di THF anidro e si lascia decorrere la reazione a 80 °C per 24 ore, seguendone il decorso mediante TLC (eluente EtPet/EtOAc 2:1, R_F = 0.3). Si aggiungono 30 mL di n-esano per precipitare un solido viola, che sedimenta dopo 10 minuti di centrifugazione a 4000 rpm. Il surnatante viene rimosso e la procedura viene ripetuta 4 volte, fino ad ottenere 14 mg di **2** sotto forma di

solido viola scuro (resa 48%) dopo la rimozione del solvente residuo a pressione ridotta.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ -2.43 (s, 2H, NH); 1.00 (t, 3H, $J = 7.25$ Hz, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$); 1.25 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$); 3.37 (m, 2H, $J = 6$ Hz, $\text{NH}(\text{CO})\text{NHCH}_2$); 7.72 (m, 11H, ArH); 8.19 (m, 8H, ArH); 8.84 (m, 8H, ArH).

ESI-MS (MeOH + 0.1 %), m/z: 729.4 (M + H^+)

5.3.3 Sintesi IR755-Si



	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
IR-775 cloruro	519.55	50	0.1			1
APTES	221.37	85.2	0.38	0.09	0.946	4
DMF				20		

In un pallone da 50 ml, munito di agitatore magnetico, di refrigerante a bolle e oscurato alle pareti, si sciolgono 50 mg (0.1 mmol) di IR-775 cloruro in 20 ml di DMF anidra e si lascia reagire, in atmosfera di azoto e alla temperatura di 120° C, con 90 μL (0.38 mmol) di APTES. Si segue la reazione tramite TLC (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 10:1). Dopo 2 ore si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si esegue una colonna cromatografica flash su gel di silice (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 10:1) che fornisce 13 mg di prodotto sotto forma di solido blu (resa 21 %).

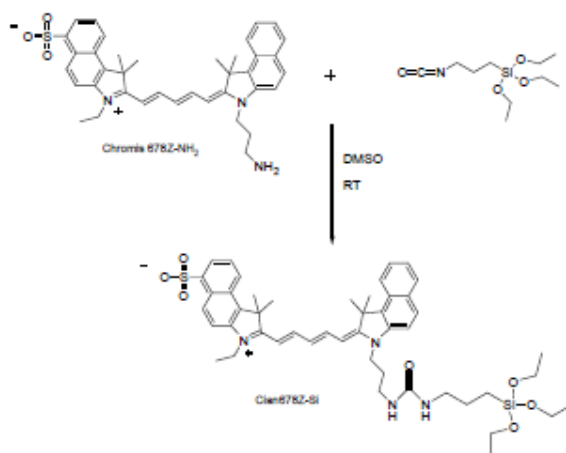
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 0.64 (t, 2H, $J = 8.25$ Hz, SiCH_2), 1.20 (t, 9H, $J = 7$ Hz, OCH_2CH_3), 1.39 (m, 2H, SiCH_2CH_2), 1.71 (bs, 12H, indolo- $(\text{CH}_3)_2$), 1.79 (qn, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -cicloesano), 2.08 (m, 2H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.48 (t, 4H, $J = 6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -cicloesano), 3.29 (s, 6H, NCH_3), 3.80 (q, 6H, $J = 7$ Hz, OCH_2CH_3), 5.46 (d, 2H, $J = 12.75$ Hz, indolo- CHCH), 6.80 (d, 2H, $J = 8$ Hz, indolo- CHCH), 7.09 (t, 2H, $J = 6.75$ Hz, ArH), 7.23 (m, 6H, ArH), 10.44 (bs, 1H, NH).

ESI-MS ($\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\%$ HCOOH): m/z 669 ($\text{M} + \text{H}^+$).

UV-Vis (EtOH): λ_{max} (nm) 628.

Fluorescenza (EtOH): λ_{exc} (nm) 627, λ_{em} (nm) 738.

5.3.4 Sintesi di Cian678z-Si



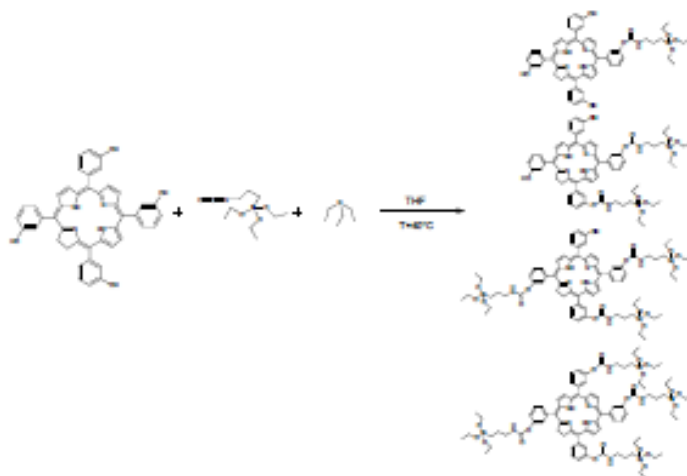
	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
CHROMIS 678 Z-amine	619,83	3,84	0,0062			1
3-isocyanatopropil-trietossisilano	247,37	1,53	0,0062	$1,53 \cdot 10^{-3}$	0.946	4
DMSO				1		

In un pallone da 10 mL, dotato di agitazione magnetica e oscurato alle pareti, sono stati sciolti 3,84 mg di CHROMIS 678 Z-amine in 1 mL di DMSO. Alla soluzione vengono aggiunti 1,53 μL del derivato trietossisilano e viene

lasciata in agitazione per 20h a temperatura ambiente. Il prodotto non subisce ulteriori purificazioni e viene caratterizzato con ESI-MS

ESI-MS(H₂O+AcCN+HCOOH 0.1%) m/z: 621, 784, 868, 952 (M+H⁺)

5.3.5 Sintesi *m*THPC-monoSi e *m*THPC-tetraSi



	PM	mg	mmol	μl	d(g/ml)	eq
m-THPC	680.75	17	0.025			1
3-isocianatopropil-trietossilano	247.37	15.4	0.062	15.4	1	2.5
N(Et) ₃	101.19	6.3	0.062	8.6	0.727	2.5
THF				100		

In una fiala da 300 μl, munita di agitatore magnetico e oscurato alle pareti, si sciolgono 17 mg (0.025 mmol) di *m*THPC in 100 μl di THF e si lascia reagire a 40 °C per una notte con 15.4 μl (0.062 mmol) di 3-isocianatopropil-trietossilano in presenza di 8.6 μl (0.062 mmol) di trietilammina. Si segue la reazione tramite TLC (eluente etere di petrolio/isopropanolo 3:1, R_f_{*m*THPC-Si} = 0.3, R_f_{*m*THPC-2Si} = 0.4, R_f_{*m*THPC-3Si} = 0.5). Si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si ottiene il prodotto sotto forma di solido color violaceo.

Si scioglie il prodotto in una quantità nota di DMSO anidro e si determina per via spettrofotometrica la concentrazione di mTHPC-Si nella soluzione ($\epsilon_{650} = 38300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

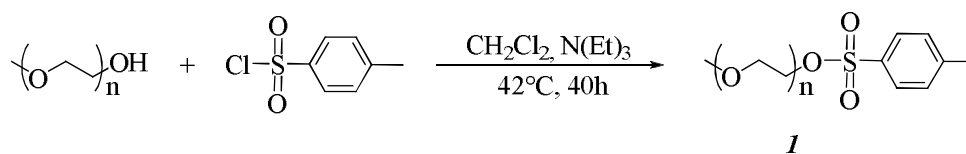
UV-Vis (Toluene): λ_{max} (nm) 420, 518, 545, 601, 654.

ESI-MS ($\text{CH}_3\text{CN} + 0.1 \% \text{HCOOH}$): m/z 928.7 ($M_{\text{mTHPC-Si}} + \text{H}^+$), 1175.8 ($M_{\text{mTHPC-2Si}} + \text{H}^+$), 1422.7 ($M_{\text{mTHPC-3Si}} + \text{H}^+$).

Per ottenere la sintesi del derivato mTHPC-tetraSi è sufficiente aggiungere 4 equivalenti del derivato 3-isocianatopropiltrirossilano anziché 2.5. Anche in questo caso il prodotto non necessita di ulteriori purificazioni e si eseguono le stesse caratterizzazioni del derivato mTHPC-monoSi.

5.4 Sintesi PEG₂₀₀₀-NH₂

5.4.1 Sintesi di PEG₂₀₀₀-tosilato



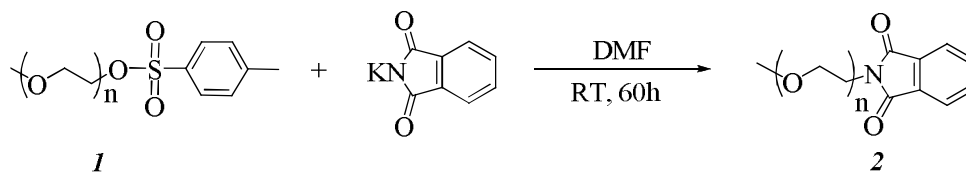
	<i>PM</i>	<i>g</i>	<i>mmol</i>	<i>ml</i>	<i>d(g/ml)</i>	<i>eq</i>
<i>PEG₂₀₀₀ monometil etere (MPEG₂₀₀₀)</i>	<i>2000</i>	<i>15</i>	<i>7.5</i>			<i>1</i>
<i>Cloruro di toluen-4-solfonile</i>	<i>190.64</i>	<i>14.3</i>	<i>75</i>			<i>10</i>
<i>N(Et)₃</i>	<i>101.19</i>	<i>7.59</i>	<i>75</i>	<i>10.45</i>	<i>0.726</i>	<i>10</i>
<i>CH₂Cl₂</i>				<i>35</i>		

In un pallone da 100 ml, munito di agitatore magnetico e refrigerante a bolle, si sciolgono 15 g (7.5 mmol) di MPEG₂₀₀₀ in 35 ml di diclorometano e si

aggiungono quindi 14.3 g (75 mmol) di cloruro di toluen-4-solfonile e la trietilammina. Si lascia reagire in atmosfera di azoto e alla temperatura di 42 °C per 40 ore. Terminata la reazione (controllata tramite NMR), la miscela di reazione viene filtrata sotto vuoto su gooch. Il filtrato viene lavato 4 volte con HCl 1 M e si concentra la fase organica all'evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con 5 ml di diclorometano e si procede alla precipitazione del prodotto da un eccesso di etere etilico freddo (300 ml per 2 volte). Il precipitato viene recuperato tramite filtrazione sotto vuoto su gooch ed essiccato. Si ottengono 12.21 g di prodotto sotto forma di solido bianco (resa 76 %).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 2.44 (s, 3H, ArCH₃); 3.37 (s, 3H, OCH₃); 3.63 (m, ~180H, (OCH₂CH₂)_n); 4.15 (t, 2H, J = 5 Hz, CH₂OTs); 7.33 (d, 2H, J = 8.25 Hz, ArH); 7.79 (d, 2H, J = 8.25 Hz, ArH).

5.4.2 Sintesi di mPEG2000-ftalimide



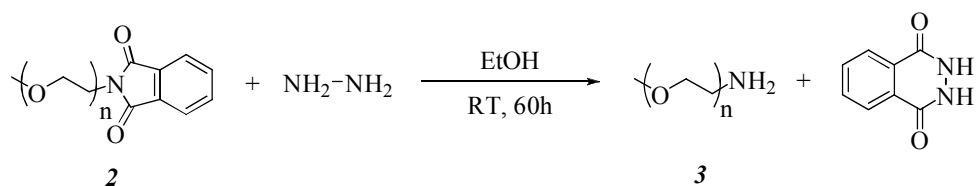
	PM	g	mmol	ml	d(g/ml)	eq
1	2154.19	5	2.32			1
K-ftalimide	185.23	2.58	13.92			6
DMF				10		

In un pallone da 50 ml, munito di agitatore magnetico, si sciolgono 5 g (2.32 mmol) del composto **1** in 10 ml di DMF e si lascia reagire, in atmosfera di azoto e a temperatura ambiente, con 2.58 g (13.92 mmol) di K-ftalimide. Dopo 60 ore, terminata la reazione (controllata tramite NMR), si allontana il solvente all'evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con 10 ml di diclorometano e si procede alla filtrazione sotto vuoto su gooch utilizzando

anche uno strato di celite. Il filtrato viene concentrato all'evaporatore rotante e si ottengono 3.66 g di prodotto sotto forma di solido bianco (resa 74 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 3.37 (s, 3H, OCH_3); 3.63 (m, $\sim 180\text{H}$, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$); 3.9 (t, 2H, $J = 6$ Hz, CH_2N); 7.72 (m, 2H, ArH); 7.82 (m, 2H, ArH).

5.4.3 Sintesi di *mPEG*₂₀₀₀-NH₂

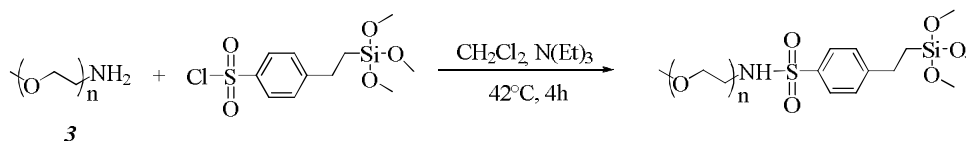


	<i>PM</i>	<i>g</i>	<i>mmol</i>	<i>ml</i>	<i>d(g/ml)</i>	<i>eq</i>
2	2129.08	3.66	1.72			1
<i>NH₂NH₂·H₂O al 50%</i>	32.05	0.11	3.44	0.2	1.029	2
<i>EtOH</i>				10		

In un pallone da 50 ml, munito di agitatore magnetico, refrigerante a bolle e tubo CaCl_2 , si sciolgono 3.66 g (1.72 mmol) del composto **2** in 10 ml di EtOH e si lascia reagire alla temperatura di 78°C con 0.11 g (3.44 mmol) di idrazina monoidrato. Si segue la reazione tramite TLC (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1). Dopo 60 ore si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si riprende il residuo con 10 ml di diclorometano. Si filtra sotto vuoto su gooch ed il filtrato viene concentrato all'evaporatore rotante. Si procede con la precipitazione da 300 ml di etere etilico freddo, si recupera il precipitato tramite filtrazione sotto vuoto su gooch e si essicca. Il grezzo viene purificato con cromatografia a scambio ionico (FS Amberlite Ira-402, eluente metanolo) e si ottengono 2.85 g di prodotto sotto forma di solido bianco (resa 83 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 3.35 (s, 3H, OCH_3); 3.62 (m, $\sim 180\text{H}$, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$).

5.5 Sintesi di mPEG2000-Si



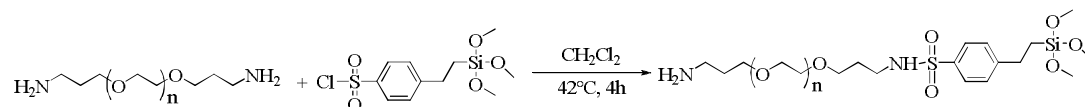
	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
mPEG ₂₀₀₀ -NH ₂	2000	1050	0.525			1
2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano;50% soluzione in CH ₂ Cl ₂	324.85	341	1.05	0.682		2
IRA 96 (4,7meq/g)		500	2,35			4.5
N(Et) ₃	101.19	53	0.525	0.073	0.727	1
CH ₂ Cl ₂				10		

In un pallone da 25 ml, munito di agitatore magnetico, si sciolgono 1050 mg (0.525 mmol) di mPEG₂₀₀₀-NH₂ in 10 ml di diclorometano e si aggiunge in eccesso la resina IRA 96, precedentemente lavata con CH₂Cl₂. Si munisce il pallone di refrigerante a bolle e tubo CaCl₂ e si fa reagire alla temperatura di 42° C con 682 µl (1.05 mmol) di 2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano in presenza di 73 µl (0.525 mmol) di trietilammina. Si segue la reazione tramite TLC (eluente CH₃Cl/MeOH 15:2) sviluppando con ninidrina. Dopo 2 ore si allontana la resina e si elimina il solvente all'evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con la minima quantità di EtOH e si precipita il prodotto da circa 100 ml di terbutil metil etere freddo. Il precipitato viene recuperato per centrifugazione a 4000 rpm ed essiccato. Si ottengono 1070 mg di prodotto sotto forma di solido bianco granuloso (resa 89%).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 0.96 (m, 2H, CH₂Si); 2.76 (m, 2H, CH₂CH₂Si); 3.09 (m, 2H, CH₂NHSO₂); 3.35 (s, 3H, OCH₃); 3.61 (m, ~190H, (OCH₂CH₂)_n e 3 SiOCH₃); 5.29 (bs, 1H, NHSO₂); 7.31 (d, 2H, J = 8.25 Hz, ArH); 7.74 (d, 2H, J = 8.25 Hz, ArH).

Si è preparato anche il mPEG₇₅₀-Si usando il reagente commerciale di partenza mPEG₇₅₀-NH₂.

5.6 Sintesi di NH₂-PEG₂₀₀₀-Si



	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
PEG ₂₀₀₀ -bis-(3-aminopropiletere)	2000	100	0.05			1
2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano; 50% soluzione in CH ₂ Cl ₂	324.85	16.2	0.05	0.032		1
CH ₂ Cl ₂				2		

In un pallone da 10 ml, munito di agitatore magnetico, si sciolgono 100 mg (0.05 mmol) di PEG₂₀₀₀-bis-(3-aminopropiletere) in 2 ml di diclorometano. Si munisce il pallone di refrigerante a bolle e tubo CaCl₂ e si lascia reagire alla temperatura di 40° C con 32 µl (0.05 mmol) di 2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano. Si segue la reazione tramite TLC (eluente CH₂Cl₂/MeOH 10:1). Dopo 3 ore si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si ottiene il prodotto sotto forma di solido bianco con resa del 99%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.00 (m, 2H, CH₂Si); 1.71 (m, 2H, CH₂CH₂NHSO₂); 2.04 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂); 2.79 (m, 2H, CH₂CH₂Si); 3.06 (t, 2H, CH₂NHSO₂); 3.31 (t, 2H, CH₂NH₂); 3.65 (m, ~190H, (OCH₂CH₂)_n e 3 SiOCH₃); 5.62 (bs, 1H, NHSO₂); 7.34 (d, 2H, J = 8.5 Hz, ArH); 7.78 (d, 2H, J = 8.5 Hz, ArH).

Variante in DMSO:

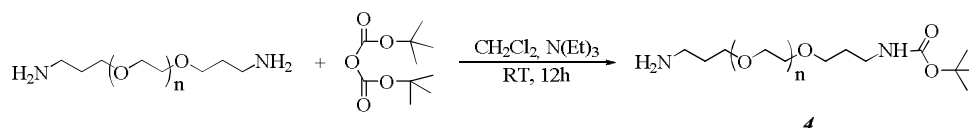
	PM	mg	mmol	µl	d(g/ml)	eq
PEG ₂₀₀₀ -bis-(3-aminopropiletere)	2000	50	0.025			1
2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossilano;50% soluzione in CH ₂ Cl ₂	324.85	8.1	0.025	16		1
DMSO				500		

In un pallone a goccia da 10 ml, munito di agitatore magnetico e tubo CaCl₂, si sciolgono 50 mg (0.025 mmol) di PEG₂₀₀₀-bis-(3-aminopropiletere) in 500 µl di dimetilsolfossido anidro e si lascia reagire alla temperatura di 40° C con 16 µl (0.025 mmol) di 2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossilano. Si segue la reazione tramite TLC (eluente CH₂Cl₂/MeOH 10:1). Dopo un paio d'ore la reazione è terminata.

La sintesi di NH₂-PEG-Si in DMSO è stata effettuata anche utilizzando PEG-bis-(3-aminopropiletere) di PM 1500 e 3350.

5.7 Sintesi del derivato Fol-PEG₂₀₀₀-Si

5.7.1 Sintesi di BOC-NH-PEG₂₀₀₀-NH₂



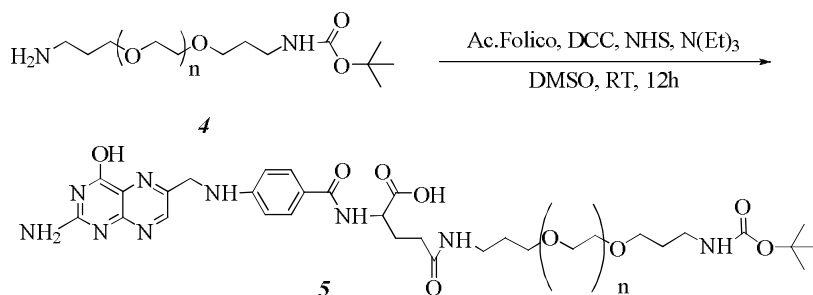
	PM	g	mmol	ml	d(g/ml)	eq
PEG ₂₀₀₀ -bis-(3-aminopropil etero)	2000	1	0.5			1
Boc ₂ O	218.25	0.164	0.75			1.5
N(Et) ₃	101.19	0.025	0.25	0.035	0.726	0.5
CH ₂ Cl ₂				15		

In un pallone da 50 ml contenente una soluzione di 1 g (0.5 mmol) di PEG₂₀₀₀-bis-(3-aminopropil etero) in 5 ml di diclorometano e la trietilammina si fa gocciolare lentamente una soluzione di 0.164 g (0.75 mmol) di Boc₂O in 10 ml di diclorometano. Si munisce il pallone di un tubo CaCl₂ e si lascia reagire a temperatura ambiente. Si segue la reazione tramite TLC (eluente CH₂Cl₂/MeOH 10:1, R_f = 0.2). Dopo 12 ore si allontana il solvente all'evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con 15 ml di diclorometano e si esegue un lavaggio acido utilizzando 15 ml di HCl 1 M. Dopo una colonna cromatografica flash su gel di silice (eluente CH₂Cl₂/MeOH 10:1 e poi CH₂Cl₂/MeOH 5:1) si ottengono 250 mg di prodotto sotto forma di solido arancione (resa 24 %).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.74 (qn, 2H, J = 6.25 Hz, CH₂CH₂NHCOO); 2.04 (qn, 2H, J = 5.75 Hz, CH₂CH₂NH₂); 3.19 (qn, 2H, J = 6.25

Hz, CH₂NHCOO); 3.52 (t, 2H, J = 5.75 Hz, CH₂NH₂); 3.63 (m, ~180H, (OCH₂CH₂)_n); 4.99 (bs, 1H, NHCOO); 7.79 (bs, 2H, NH₂).

5.7.2 Sintesi di BOC-NH-PEG₂₀₀₀-FOL



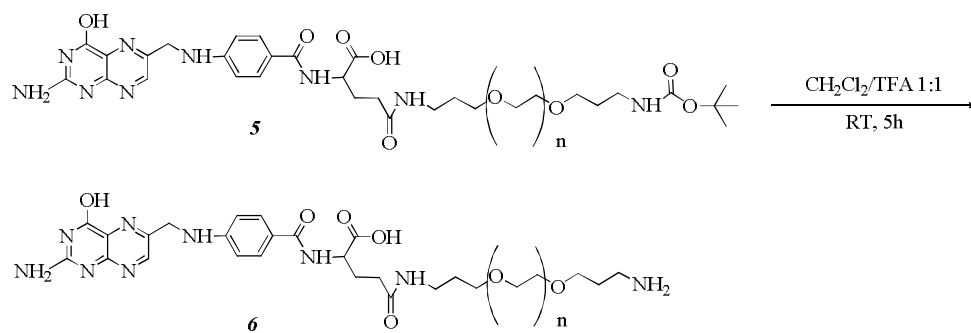
	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
4	2101	190	0.09			1
Acido folico	441.4	59.6	0.135			1.5
N(Et) ₃	101.19	164	1.62	0.226	0.726	18
DCC	206.33	27.8	0.135			1.5
NHS	115.9	15.6	0.135			1.5
DMSO				5		

In un pallone da 10 ml, munito di agitatore magnetico, si lascia reagire, in atmosfera di azoto e a temperatura ambiente, una soluzione di 59.6 mg (0.135 mmol) di acido folico in 5 ml di DMSO anidro contenente trietilammina, NHS e DCC. Dopo un'ora si aggiungono alla miscela di reazione 190 mg (0.09 mmol) del composto **4**. Si segue la reazione tramite TLC (eluente CH₂Cl₂/MeOH 10:1). Dopo 12 ore la miscela di reazione viene addizionata a 100 ml di diclorometano e si elimina il precipitato tramite filtrazione sotto vuoto su gooch. Il filtrato viene invece recuperato e concentrato all'evaporatore rotante. Si procede con la precipitazione del prodotto da un eccesso di etere etilico freddo (300 ml per 3 volte). Il precipitato viene

recuperato tramite filtrazione sotto vuoto su gooch ed essiccato. Si ottengono 112 mg di prodotto sotto forma di gel arancione (resa 49 %).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.57 (m, 4H, CH₂CH₂NH-Boc); 1.9-2.0 (m, 2H, CH₂CHCOOH); 2.29 (m, 2H, CH₂CH₂CHCOOH); 2.93 (m, 2H, CH₂CH₂NH-Folico); 3.05 (m, 2H, CH₂NH-Folico); 3.49 (m, ~180H, (OCH₂CH₂)_n); 4.21 (m, 1H, CHCOOH); 4.46 (s, 2H, Pteridina-CH₂); 6.62 (d, 2H, J = 8 Hz, ArH); 6.89 (bs, 2H); 7.63 (d, 2H, J = 8 Hz, ArH); 8.09 (d, 1H, J = 7.25 Hz, NHCHCOOH); 8.62 (s, 1H, PteridinaH); 11.41 (s, 1H); 12.23 (bs, 1H).

5.7.3 Sintesi di FOL-PEG₂₀₀₀-NH₂

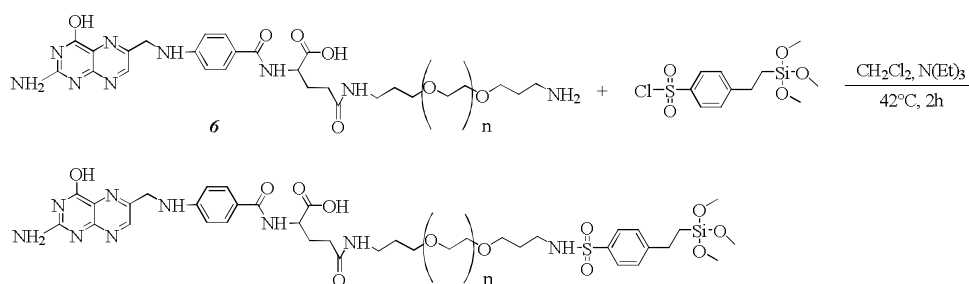


	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
5	2524.4	112				
TFA				10		
CH ₂ Cl ₂				10		

In un pallone da 50 ml, munito di agitatore magnetico e tubo CaCl₂, si sciolgono 112 mg del composto **5** in 10 ml di diclorometano e si lascia reagire a temperatura ambiente con 10 ml di TFA. Si segue la reazione tramite TLC (eluente CH₂Cl₂/MeOH 10:1 + 3 gocce di NH₄OH, R_f = 0.18). Dopo 5 ore si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si ottengono 107 mg di prodotto sotto forma di gel marrone (resa 100 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.59 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 1.77 (m, 2H, CH_2NH_2); 1.9-2.0 (m, 2H, CH_2CHCOOH); 2.31 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH}$); 2.86 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-Folico}$); 3.07 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-Folico}$); 3.50 (m, ~180H, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$); 4.33 (m, 1H, CHCOOH); 4.57 (s, 2H, Pteridina- CH_2); 6.64 (d, 2H, $J = 8.25$ Hz, ArH); 7.65 (d, 2H, $J = 8.25$ Hz, ArH); 8.15 (d, 1H, $J = 7.75$ Hz, NHCHCOOH); 8.49 (bs, 1H); 8.74 (s, 1H, PteridinaH).

5.7.4 Sintesi di FOL-PEG₂₀₀₀-Si



	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
6	2423.4	107	0.044			1
2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano;50% soluzione in CH_2Cl_2	324.85	14.3	0.044	0.028		1
$\text{N}(\text{Et})_3$	101.19	9	0.088	0.012	0.726	2
CH_2Cl_2				10		

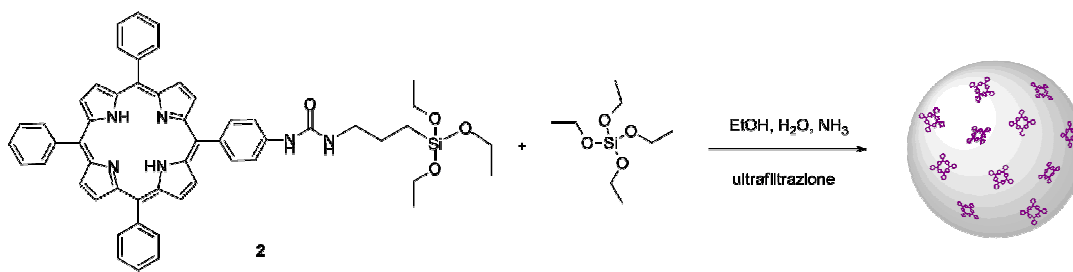
In un pallone da 50 ml, munito di agitatore magnetico, refrigerante a bolle e tubo CaCl_2 , si sciolgono 107 mg (0.044 mmol) del composto **6** in 10 ml di diclorometano e si lascia reagire alla temperatura di 42° C con 14.3 mg (0.044 mmol) di 2-(4-clorosolfonilfenil)etiltrimetossisilano in presenza di trietilammina. Dopo 2 ore la miscela di reazione viene concentrata all'evaporatore rotante e si procede alla precipitazione del prodotto da 300 ml di terbutil metil etere freddo. Il precipitato viene recuperato tramite

filtrazione sotto vuoto su gooch ed essiccato. Si ottengono 102 mg di prodotto sotto forma di gel giallo (resa 85 %).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ 0.88 (m, 2H, CH₂Si); 1.59 (m, 2H, CH₂CH₂NHSO₂); 1.77 (m, 2H, CH₂NHSO₂); 1.9-2.0 (m, 2H, CH₂CHCOOH); 2.31 (m, 2H, CH₂CH₂CHCOOH); 2.72 (m, 2H, CH₂CH₂Si); 2.84 (m, 2H, CH₂CH₂NH-Folico); 3.08 (m, 2H, CH₂NH-Folico); 3.50 (m, ~190H, (OCH₂CH₂)_n e 3 SiOCH₃); 4.33 (m, 1H, CHCOOH); 4.52 (s, 2H, Pteridina-CH₂); 6.64 (d, 2H, J = 8.5 Hz, ArH); 7.15 (m, 2H, ArH); 7.51 (m, 2H, ArH); 7.65 (d, 2H, J = 8.25 Hz, ArH); 8.15 (d, 1H, J = 7.25 Hz, NHCHCOOH); 8.69 (s, 1H, PteridinaH); 9.28 (bs, 1H).

5.8 Sintesi delle nanoparticelle

5.8.1 Sintesi di nanoparticelle tipo Stöber

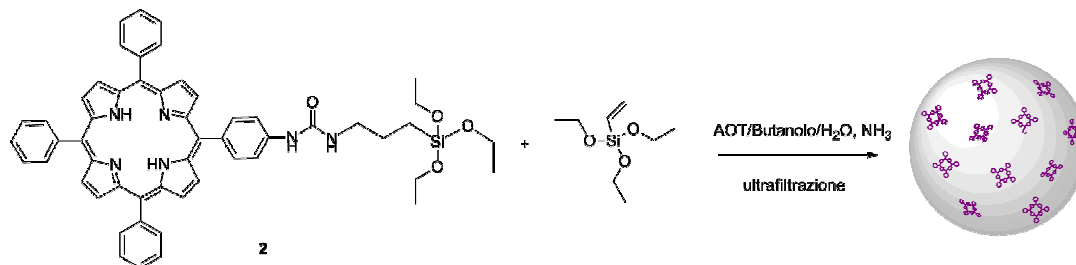


	PM	mg	mmol	mL	d (g/mL)	eq
TEOS	208.33	93	0.45	0.100	0.933	
TPP-Si	877.12	4	0.005		1	
NH ₃ (7.4 M in H ₂ O)			7.4	1	1600	
EtOH				20		

In un reattore incamiciato da 50 mL, termostato a 25 °C, oscurato alle pareti e munito di ancoretta magnetica, si introducono 4 mg (0.005 mmol) di **1** in 20 mL di etanolo. Si aggiungono quindi, nell'ordine, 100 µL di TEOS (0.45 mmol) e 1 mL (7.4 mmol) di NH₃ 7.4 M in H₂O. Si lascia decorrere la reazione per 16 ore. La miscela di reazione viene poi concentrata e diluita a 80 ml per 5 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 5 × 60 mL di acqua milliQ.

Dynamic light scattering: 35 ± 13.4 nm

5.8.2 Sintesi di nanoparticelle tipo Prasad



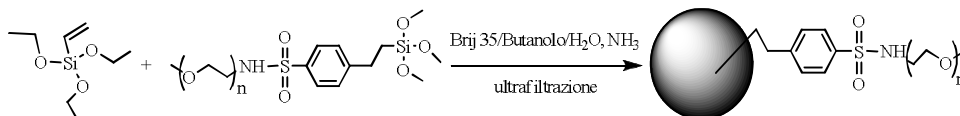
	PM	mg	mmol	mL	d (g/mL)	eq
H ₂ O	18			5		
AOT		0.44	1			
n-butanolo				0,15		
VTES			0,96	200		
NH ₃ (soluzione acquosa al 28%)	17		0.12	0.01		

Un reattore incamiciato da 50 mL, termostatato a 20 °C, oscurato alle pareti e munito di ancoretta magnetica, è stata caricato con la soluzione acquosa di AOT (0,44 g), *n*-butanolo 0.8mL e 20mL di acqua milliQ. Sotto vigorosa agitazione vengono aggiunti 200µL di VTES e la quantità desiderata di una soluzione in DMSO di un dopante idrofobico. Dopo 30 minuti vengono aggiunti 10mL di ammoniaca in soluzione al 28%. La soluzione viene lasciata in vigorosa agitazione per 20h. La soluzione è poi trasferita in una cella da ultrafiltrazione Amicon e dializzata sotto pressione di 4bar con acqua fino a che la concentrazione residua di AOT è inferiore a 30µM, attraverso misure di tensione superficiale.

Dynamic light scattering: 25 ± 10 nm

5.8.3 Sintesi di nanoparticelle PEGilate

Riporto qui di seguito una procedura generale per la sintesi di nanoparticelle di silice PEGilate e successivamente le varianti che si devono attuare per caricarle con un farmaco fotosensibilizzante e per derivatizzarle con gruppi amminici.



	<i>PM</i>	<i>mg</i>	<i>mmol</i>	<i>ml</i>	<i>d(g/ml)</i>
<i>H₂O milliQ</i>				4.166	
<i>Brij 35 (soluzione 30 mM in H₂O milliQ)</i>				0.833	
<i>n-butanolo</i>				0.150	
<i>VTES</i>	190.32		0.48	0.100	0.911
<i>mPEG₂₀₀₀-Si</i>	2288.4	35	0.015		
<i>NH₃:H₂O 1:1</i>				0.010	

In un reattore incamiciato da 10 mL, termostato a 30 °C e munito di ancorotta magnetica, si introducono nell'ordine 4.166 ml di H₂O milliQ, 0.833 ml di una soluzione 30 mM di Brij 35 in H₂O milliQ, 35 mg di mPEG₂₀₀₀-Si (0.015 mmol), 150 µl di n-butanolo, 100 µl di VTES (0.48 mmol) e dopo 30 minuti 10 µl di NH₃:H₂O 1:1. Dopo 2 ore la reazione di polimerizzazione è terminata e si misurano le dimensioni delle nanoparticelle al DLS (*Dynamic Light Scattering*). Quindi si introducono nel reattore 430 mg di Bio-Beads Biorad SM-2 (polistirene, 86 mg per ml di soluzione di nanoparticelle) e si lascia agitare per 3 ore. Dopo aver rimosso i Beads, la miscela di reazione viene concentrata e diluita a 60 ml per 6 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 6 × 55 mL di acqua milliQ a pH 10. Si filtra con filtri HVLP da 0.45 e 0.22 µm e si procede con le caratterizzazioni.

Questa procedura può subire alcune variazioni nel caso si voglia introdurre una molecola fotosensibilizzante o funzionalizzare le nanoparticelle con diversi derivati del PEG:

1. La soluzione di mTHPC-Si in DMSO (8.6 mM) va aggiunta tra i 10 e i 130µl subito dopo il VTES.
2. La soluzione di IR775-Si in DMSO (12 mM) va aggiunta nel quantitativo di 10 µl, dopo 30 minuti, subito dopo l'ammoniaca.
3. La soluzione di cian678Z-Si in DMSO (6,2 mM) va aggiunta nel quantitativo di 10 µl, dopo 30 minuti, subito dopo l'ammoniaca.
4. Il FOL-PEG₂₀₀₀-Si va aggiunto dopo trenta minuti, appena prima dell'ammoniaca, nella quantità determinata dalla percentuale desiderata di folato rispetto alle moli di PEG-Si aggiunte.
5. L'H₂N-PEG₂₀₀₀-Si va aggiunto dopo 30 minuti, appena prima dell'ammoniaca, nel quantitativo determinato dalla percentuale di funzionalizzazione desiderata e dal peso molecolare del derivato PEG-bis(ammina). Sono state preparate nanoparticelle con le ammine con diverso grado di funzionalizzazione (0.1%, 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 30% di NH₂-PEG-Si rispetto al mPEG-Si) o che differivano per il peso molecolare del NH₂-PEG-Si impiegato (PM 1500, 2000 e 3350).

Varianti:

Nel caso si voglia introdurre nelle nanoparticelle il farmaco fotosensibilizzante basta semplicemente aggiungere un quantitativo adeguato di soluzione di mTHPC-Si in DMSO (ad esempio 130 µl di una soluzione 9.5 mM) subito dopo il VTES.

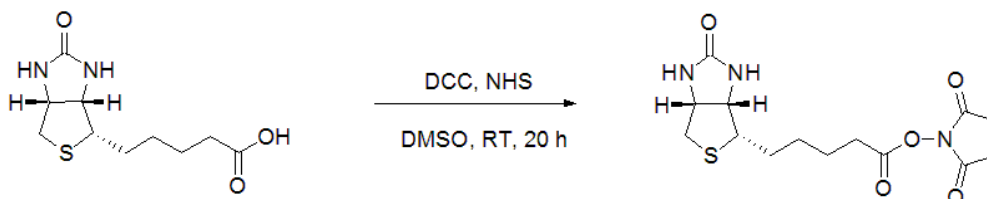
Per ottenere nanoparticelle funzionalizzate con gruppi amminici si aggiunge il NH₂-PEG₂₀₀₀-Si dopo 30 minuti e quindi subito prima dell'ammoniaca.

Caratterizzazioni:

- misura del diametro al DLS,
- determinazione spettrofotometrica della concentrazione del fluoroforo,
- determinazione della concentrazione in peso,
- determinazione per via spettrofluorimetrica della concentrazione dei gruppi amminici (vedere test fluorescamina),
- calcolo del *loading*,
- misura del pH della soluzione di nanoparticelle.

5.9 Sintesi di nanoparticelle biotinilate

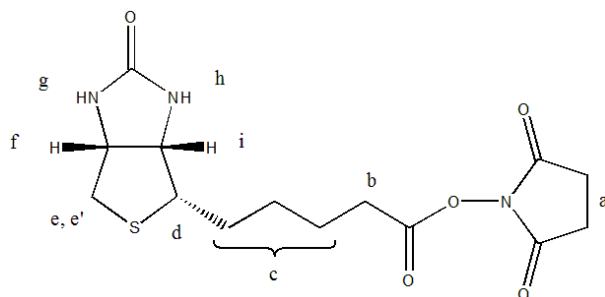
5.9.1 Sintesi di biotina-OSu



	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
Biotina	244.31	250	1.0			1
DCC	206.33	318	1.5			1.5
NHS	115.9	174	1.5			1.5
DMSO				2		

In un pallone da 10 ml, munito di agitatore magnetico e tubo CaCl₂, si sciolgono 250 mg (1.0 mmol) di biotina in 2 ml di DMSO e si fa reagire la soluzione a temperatura ambiente con 318 mg di DCC (1.5 mmol) e 174 mg di NHS (1.5 mmol) per una notte. La miscela di reazione viene addizionata a 100 ml di diclorometano e si elimina il precipitato bianco (dicicloesilurea) tramite filtrazione sotto vuoto su gooch. Il filtrato viene invece recuperato e

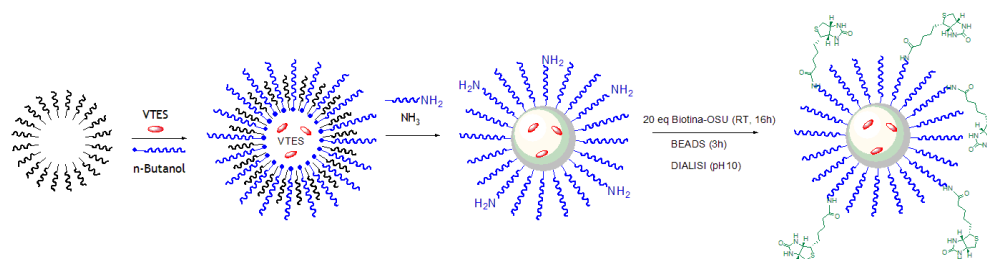
concentrato all'evaporatore rotante. Si precipita il prodotto da un eccesso di *tert*-butil metil etere freddo. Il precipitato viene recuperato per centrifugazione a 4000 rpm ed essiccato. Si ottiene il prodotto sotto forma di solido bianco.



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ 1.62 (m, 6H, H_c); 2.54 (m, 1H, H_e); 2.60 (m, 1H, $H_{e'}$); 2.67 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_b); 2.81 (s, 4H, H_a); 3.10 (m, 1H, H_d); 4.14 (td, 1H, H_i); 4.30 (td, 1H, H_f); 6.37 (s, 1H, H_h); 6.43 (s, 1H, H_g).

ESI-MS ($\text{H}_2\text{O} + \text{MeOH} + 5\% \text{HCOOH} = 1:1$): m/z 342.1 ($\text{M} + \text{H}^+$), 364.0 ($\text{M} + \text{Na}^+$)

5.9.2 Sintesi di nanoparticelle biotinilate



Si sono preparate nanoparticelle biotinilate con grado diverso di funzionalizzazione (3%, 10% e 30%). Di seguito ho riportato le quantità relative alla sintesi di nanoparticelle funzionalizzate al 10%.

	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)
H ₂ O milliQ				4.166	
Brij 35 (soluzione 30 mM in H ₂ O milliQ)				0.833	
n-butanolo				0.150	
VTES	190.32		0.48	0.100	0.911
mPEG ₂₀₀₀ -Si	2288.4	32	0.014		
NH ₂ -PEG ₂₀₀₀ -Si	2288.4	3.2	0.0014		
NH ₃ :H ₂ O 1:1				0.010	
Biotina-OSu	342.2	9.6	0.028		

In un reattore incamiciato da 10 ml, termostato a 30° C e munito di ancorotta magnetica, si introducono nell'ordine 4.166 ml di H₂O milliQ, 0.833 ml di una soluzione 30 mM di Brij 35 in H₂O milliQ, 32 mg di mPEG₂₀₀₀-Si (0.014 mmol), 150 µl di n-butanolo, 100 µl di VTES (0.48 mmol) e 130 µl di una soluzione 9.5 mM di mTHPC-Si in DMSO. Dopo 30 minuti si aggiungono 3.2 mg di NH₂-PEG₂₀₀₀-Si (0,0014 mmol) e per finire 10 µl di NH₃:H₂O 1:1. Dopo 2 ore si introducono nel reattore 20 equivalenti di biotina-OSu scolti nel minor volume possibile di DMSO e si lascia reagire per 5 ore. Quindi si introducono

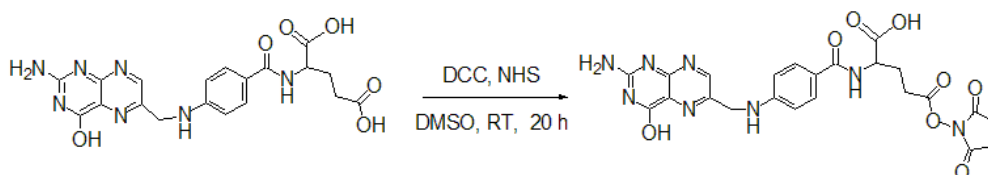
430 mg di Bio-Beads Biorad SM-2 (polistirene, 86 mg per ml di soluzione di nanoparticelle) e si lascia agitare per 3 ore. Dopo aver rimosso i Beads, la miscela di reazione viene concentrata e diluita a 60 ml per 6 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 6 × 55 mL di acqua milliQ a pH 10. Si filtra con filtri HVLP da 0.45 e 0.22 µm e si procede con le caratterizzazioni:

- misura del diametro al DLS,
- determinazione spettrofotometrica della concentrazione del fluoroforo,
- determinazione della concentrazione in peso,
- determinazione per via spettrofluorimetrica della concentrazione delle ammine residua (vedere test fluorescamina),
- calcolo del *loading*,
- misura del pH della soluzione di nanoparticelle,
- determinazione della concentrazione di biotina (vedere test *HABA/Avidin*).

È stato preparato anche un altro tipo di nanoparticelle biotinilate utilizzando mPEG-Si di PM 750 per formare lo strato di rivestimento delle particelle e NH₂-PEG-Si di PM 2000 per l'aggancio della biotina.

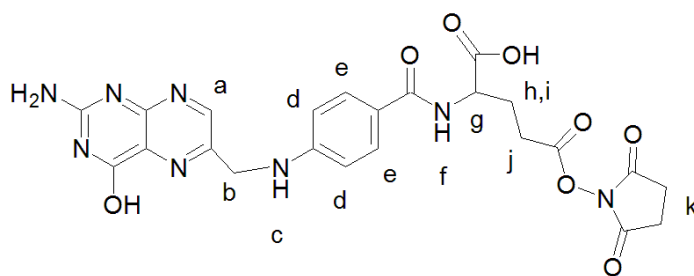
5.10 Sintesi di nanoparticelle con folato

5.10.1 Sintesi di folato-OSu



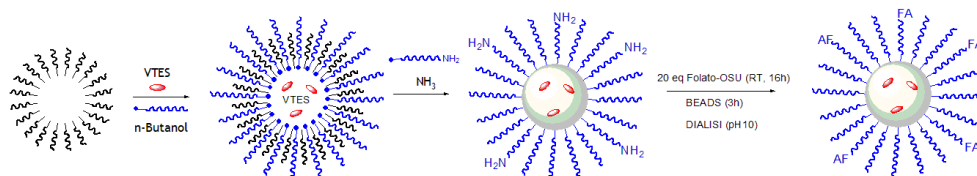
	PM	mg	mmol	ml	d(g/ml)	eq
Acido folico	441.4	1046	2.37			1
DCC	206.33	978	4.74			2
NHS	115.9	549	4.74			2
N(Et) ₃	101.19	479	4.74	0.660	0.727	2
DMSO				5		

In un pallone da 10 ml, munito di agitatore magnetico e tubo CaCl₂, si sciolgono 1046 mg (2.37 mmol) di acido folico in circa 5 ml di DMSO e si fa reagire la soluzione a temperatura ambiente con 978 mg di DCC (4.74 mmol) e 549 mg di NHS (4.74 mmol) in presenza di 660 µl (4.74 mmol) di trietilammina per una notte. La miscela di reazione viene addizionata a 100 ml di diclorometano e si elimina il precipitato bianco (diciolesilurea) tramite filtrazione sotto vuoto su gooch. Il filtrato viene invece recuperato e concentrato all'evaporatore rotante. Si precipita il prodotto da un eccesso di terbutil metil etere freddo. Il precipitato viene recuperato per centrifugazione a 4000 rpm ed essiccato. Si ottiene il prodotto sotto forma di solido rossiccio.



¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ 2.5-2.6 (m, 4H, *Hi, Hh, Hj*); 2.60 (s, 4H, *Hk*); 4.49 (d, 2H, *Hb*); 4.68 (m, 1H, *Hg*); 6.66 (d, 2H, *Hd*); 7.03 (t, 1H, *Hc*); 7.68 (d, 2H, *He*); 8.58 (d, 1H, *Hf*); 8.65 (s, 1H, *Ha*).

5.10.2 Sintesi di nanoparticelle coniugate con l'acido folico



Si sono preparate nanoparticelle con grado diverso di funzionalizzazione (0.1%, 1% e 5%). Di seguito ho riportato le quantità relative alla sintesi di nanoparticelle funzionalizzate all'1%.

	PM	mg	mmol	μl	d(g/ml)
H ₂ O milliQ				4166	
Brij 35 (soluzione 30 mM in H ₂ O milliQ)				833	
n-butanolo				150	
VTES	190.32		0.48	100	0.911
mPEG ₂₀₀₀ -Si	2288.4	35	0.015		
H ₂ N-PEG ₃₃₅₀ -Si (soluzione 155mg/ml in DMSO)	2288.4	0.55	0.00015	3.5	

NH ₃ :H ₂ O 1:1				10	
Folato-OSu	538.5	1.62	0.003		

In un reattore incamiciato da 10 ml, termostato a 30° C e munito di ancoretta magnetica, si introducono nell'ordine 4.166 ml di H₂O milliQ, 0.833 ml di una soluzione 30 mM di Brij 35 in H₂O milliQ, 35 mg di mPEG2000-Si (0.015 mmol), 150 µl di n-butanolo, 100 µl di VTES (0.48 mmol) e 130 µl di una soluzione 9.5 mM di mTHPC-Si in DMSO. Dopo 30 minuti si aggiungono 0.55 mg di H₂N-PEG₂₀₀₀-Si (0,00015 mmol) e per finire 10 µl di NH₃:H₂O 1:1. Dopo 2 ore si introducono nel reattore 20 equivalenti di folato-OSu e si lascia reagire per 5 ore. Quindi si introducono 430 mg di Bio-Beads Biorad SM-2 (polistirene, 86 mg per ml di soluzione di nanoparticelle) e si lascia agitare per 3 ore. Dopo aver rimosso i Beads, la miscela di reazione viene concentrata e diluita a 60 ml per 10 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 10 × 55 mL di acqua milliQ a pH 10. Si filtra con filtri HVLP da 0.45 e 0.22 µm e si procede con le caratterizzazioni:

- misura del diametro al DLS,
- determinazione spettrofotometrica della concentrazione del fluoroforo,
- determinazione della concentrazione in peso,
- calcolo del *loading*,
- misura del pH della soluzione di nanoparticelle.

5.11 Test

5.11.1 Test fluorescamina

Preparazione della retta di taratura per la determinazione spettrofluorimetrica delle ammine.

Si preparano:

- una soluzione tampone borato 0.5M a pH 8.
- una soluzione di propilammina 0.1mM in acqua milliQ.
- una soluzione di fluorescamina 1mM in DMSO.

All'interno di cuvette in quarzo da 2 ml con cammino ottico di un centimetro si preparano diversi campioni contenenti quantità crescenti di propilammina secondo le composizioni riportate in tabella.

Tampone borato 0.5M pH 8 (μl)	Acqua milliQ (μl)	Soluzione propilammina (μl)	Soluzione fluorescamina (μl)	Concentrazione propilammina (μM)
800	800	0	400	0
800	780	20	400	1
800	740	60	400	3
800	700	100	400	5
800	660	140	400	7
800	620	180	400	9
800	580	220	400	11
800	540	260	400	13

L'aggiunta della fluorescamina all'interno della cuvetta va fatta per ultima e poi al fluorimetro si registra lo spettro di emissione e si legge l'intensità di fluorescenza a 475 nm ($\lambda_{\text{ecc}} = 390 \text{ nm}$).

Si costruisce una retta di taratura riportando in ascissa la concentrazione di gruppi amminici in soluzione e in ordinata l'intensità di fluorescenza letta a 475 nm.

A questo punto si prepara una cuvetta contenente 800 μl di tampone borato 0.5 M a pH 8, 800 μl di soluzione di nanoparticelle precedentemente diluita 40 volte in acqua milliQ e 400 μl della soluzione 1 mM di fluorescamina in DMSO.

Al fluorimetro si registra lo spettro di emissione e si legge l'intensità di fluorescenza a 475 nm ($\lambda_{\text{ecc}} = 390 \text{ nm}$) dalla quale, utilizzando la retta di taratura, si ricava la concentrazione dei gruppi amminici presenti sulla superficie delle particelle.

5.11.2 Test HABA/Avidin

Si solubilizza il reagente *HABA/Avidin* in 10 ml di acqua milliQ.

In una cuvetta a volume ridotto da 1 ml si inseriscono 900 µl della soluzione del reagente *HABA/Avidin* e allo spettrofotometro UV-Vis si legge l'assorbanza a 500 nm $\left(A \frac{HABA/Avidin}{500}\right)$.

Quindi si aggiungono all'interno della cuvetta 100 µl della soluzione campione contenente nanoparticelle, si mescola e si legge di nuovo $A_{500} \left(A \frac{HABA/Avidin+sample}{500}\right)$.

Infine si esegue anche una lettura dell'assorbanza a 500 nm del bianco, ottenuto diluendo 100 µl di soluzione campione con 900 µl di acqua milliQ $\left(A \frac{sample\ blank}{500}\right)$.

Si calcola quindi la concentrazione di biotina nei campioni di nanoparticelle utilizzando le seguenti formule:

$$\Delta A_{500} = 0.9 \left(A \frac{HABA/Avidin}{500}\right) + \left(A \frac{sample\ blank}{500}\right) - \left(A \frac{HABA/Avidin+sample}{500}\right)$$

µmole biotina/ml = $(\Delta A_{500}/34) * 10$

0.9 = fattore di diluizione di *HABA/Avidin* dopo l'aggiunta del campione di particelle.

34 (mM^{-1}) = coefficiente di estinzione millimolare a 500 nm * cammino ottico ($\epsilon*b/1000$).

10 = fattore di diluizione del campione di particelle nella cuvetta.

5.11.3 Test EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel

Il reagente che si utilizza per questo test è un gel di colore rosa composto da streptavidina legata covalentemente a *beads* (microsfere) di

agarosio. Prima dell'utilizzo si miscela il gel con cura affinché i *beads* siano uniformemente sospesi al suo interno.

Si prelevano 150 μl della sospensione, usando un puntale a cui si è tagliato 1 mm della punta, e si inseriscono in un tubo eppendorf da 1.5 ml.

Si lavano i *beads* aggiungendo 850 μl di PBS, mescolando, centrifugando per 30 secondi e prelevando il surnatante con una pipetta pasteur facendo attenzione a non rimuovere anche i *beads*. Si ripete il lavaggio in questo modo per tre volte.

A questo punto un millilitro di soluzione di particelle viene aggiunto ai *beads*, si mescola e si lascia in agitazione per un'ora nell'agitatore orbitale. Quindi si centrifuga 30 secondi, si rimuove con attenzione il surnatante e si registra lo spettro di assorbimento UV-Vis che è da confrontare con quello della soluzione di particelle tale e quale, acquisito in precedenza.

6. Riferimenti Bibliografici

- 1) R. Feynman, *Eng Sc*, 1960; 23: 22-36.
- 2) NSTC, The National Nanotechnology Initiative - Strategic Plan, December 2007. Executive Office of the President of the United States; 2007.
- 3) Fonte: www.nanotechproject.org e www.nano.gov
- 4) F. Sanchez, K. Sobolev, *Construction and Building Materials*, 2010, 24, 2060-2071.
- 5) R. Shegokar, R. H. Muller, *Int. J. of Pharm.*, 2010, 399, 129-139.
- 6) N. Onat, H. Bayar, *Renew. and Sust. Energy Rev.*, 2010, 14, 3108-3111.
- 7) N. Sozer, J. L. Kokini, *Trends in Biotech.*, 2009, 27, 2, 82-89.
- 8) R. Nair, Y. Yoshida et al., *Plant Science*, 2010, 179, 154-163.
- 9) L. Mu, R. L. Sprando, *Pharm. Res.*, 2010, 27, 1746-1749.
- 10) N. S. E. Ahmed, R. M. El-Shishtawy, *J. Mater. Sci.*, 2010, 45, 1143-1153.
- 11) V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 1542-1550.
- 12) M. G. Tyshenko, N. Farhat, R. Lewis, N. Shilnikova, *Applying a precautionary risk management strategy for regulation of nanotechnology*, 2010, 7, 2-3, 243-264.
- 13) P. Shapira, J. Youtie, A. L. Porter, *Scientometrics*, 2010, 85, 595-611.
- 14) F. Allhoff, P. Lin, J. Moor, J. Weckert, *R&D Management*, 2009, 39, 1, 109-110.
- 15) K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 872-897.
- 16) S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, *FASEB J.*, 2005, 19, 3, 311-330.
- 17) Council of the Canadian Academies. Small is different: a science perspective on the regulatory challenges of the nanoscale. www.nanolawreport.com/julycanadareport.pdf
- 18) D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat. Nanotech.*, 2007, 2, 751-760.

- 19) Y. Xia, Y. J. Xiong, B. Lim, S. E. Skrabalak, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 60-103.
- 20) B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *N. Eng. J. Med.*, 2010, 363, 25, 2434- 2443.
- 21) J. Alper, *Nat. Biotechnol.*, 2004, 209, 171-176.
- 22) D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell*, 2000, 100, 57-70.
- 23) E. F. Petricoin, K. C. Zoon, E. C. Kohn, J. C. Barret, L. A. Liotta, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2002, 1, 683-695.
- 24) D. Gurvitz, G. Livshits, *Eur. J. Hum. Genet.*, 2006, 14, 376.
- 25) S. Nie, Y. Xing, G. J. Kim, J. W. Simons, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2007, 9, 257-288.
- 26) L. Brannon-Peppas, *Med. Plast. Bio-mater. Mag.*, 1997.
- 27) R. Duncan, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1999, 2, 441-449.
- 28) Y. Barenholz, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2001, 6, 66-77.
- 29) J. P. Rovers, A. E. Saarnak, M. De Jode, H. J. Sterenberg, O. T. Terpstra, M. F. Grhan, *Photochem. Photobiol*, 2000, 71, 2, 210-217.
- 30) S. D. Caruthers, S. A. Wickline, G. M. Lanza, *Current Opinion in Biotechnol.*, 2007, 18, 26-30.
- 31) G. Orive , R. M. Hernández, A. R. Gascón, J. L. Pedraz, *Cancer Therapy*, 2005, 3, 131-138.
- 32) I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu, V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60, 1278-1288.
- 33) B. Romberg, W. E. Hennink, G. Storm, *Pharm. Res.*, 2008, 25, 55.
- 34) S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, *Pharmacol. Rev.*, 2001, 53, 283-318.
- 35) D. K. Chatterjee, L. S. Fong, Y. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60, 1627-1637.
- 36) D. Russel, J. Gavrilovic, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, 5, 727-734.
- 37) M. Zeisser-Labouèbe, A. Vargas, F. Delie, *Nanoparticles for Photodynamic Therapy of Cancer, Nanomaterial for Cancer Therapy*, Challa Kumar Ed., 2007, 40-86.
- 38) S. B. Brown, E. A. Brown, I. Walker, *The Lancet*, 2004, 5, 497-507.

- 39) H. Maeda, Y. Matsumura, K. Hori et al., *J. Controlled Release*, 2000, 65, 271.
- 40) W.E. Grant, P.M. Speight, C. Hopper, S.G. Bown, *Int. J. Cancer*, 1997, 71, 937-942.
- 41) W. Chen, J. Zhang, *J. Nanosci. Nanotec.* 2006, 6, 1159-1166.
- 42) D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura & R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3, 380-387.
- 43) D. Dumas, L. Bezdetnaya, *Br. J. Cancer*, 2007, 96, 944-951.
- 44) Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90,12, 889-900.
- 45) G. A. M. S. Van Dongen, G. W. M. Visser, M. B. Vrouwenraets, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, 56 31-52.
- 46) K. W. Woodburn, N. J. Vardaxis, J. S. Hill, A. H. Kaye, J. A. Reiss, D. R. Phillips, *Photochem. Photobiol.*, 1992, 55 697-704.
- 47) C. Fabris, G. Valduga, G. Miotto, L. Borsetto, G. Jori, S. Garbisa, E. Reddi, *Cancer Res.*, 2001, 61, 7495-7500.
- 48) B. C. Wilson, M. Olivo, G. Singh, *Photochem. Photobiol.*, 1997, 65, 166-176.
- 49) T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90, 889-905.
- 50) N. Ramakrishnan, N. L. Oleinick, M. E. Clay, M. F. Horng, A.R. Antunez, H. H. Evans, *Photochem. Photobiol.*, 1989, 50, 373-378.
- 51) A. P. Castano, P. Mroz & M.R. Hamblin, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6, 535-545.
- 52) A. P. Castano, P. Mroz & M.R. Hamblin, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6, 535-545.
- 53) R. Ideta, F. Tasaka, W.-D. Jang, N. Nishiyama, G.-D. Zhang, A. Harada, Y. Yanagi, Y. Tamaki, T. Aida, K. Kataoka, *Nano Letters*, 2005, 5,12, 2426-2431.
- 54) L. I. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nature*, 2005, 4, 435-446.
- 55) K. Plaetzer, T. Kiesslich, *Laser Med. Sci.*, 2008.
- 56) J. Schuitmaker, P. Baas, H. L. L. M. Van Leengoed, F. W. Van Der Meulen, W. M. Star, N. Van Zandwijk, *J. Photochem. Photobiol.*, 1996, 34, 3-12.
- 57) E. S. Nyman & P. H. Hynninen, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2004, 73, 1-28.

- 58) G. Orive, R. M. Hernández, A. R. Gascón, J. L. Pedraz, *Cancer Therapy*, 2005, 3, 131-138.
- 59) R. Bonnett, G. Martinez, *Tetrahedron*, 2001, 57, 9513.
- 60) J. P. Taquet, C. Frochot, V. Manneville and M. Barberi-Heyob, *Curr. Med. Chem.*, 2007, 14, 1673-1687.
- 61) a) C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.*, 2009, 26, 1025-1058; b) S. Parveen, S. K. J. Sahoo, *Drug Target.*, 2008, 16, 108-123.
- 62) D. K. Chatterjee, L. S. Fong, Y. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60, 1627-1637.
- 63) J. C. Leroux, E. Allemann, F. DeJaeghere, E. Doelker, R. J. Gurny, *Controlled Release*, 1996, 39, 339-350.
- 64) E. Allemann, N. Brasseur, O. Benrezzak, J. Rousseau, S. V. Kudrevich, R. W. Boyle, J. C. Leroux, R. Gurny, J. E. J. Vanlier, *Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47, 382-387.
- 65) a) Y. N. Konan, M. Berton, R. Gurny, E. Allemann, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, 18, 241-249; b) Y. N. Konan, R. Cerny, J. Favet, M. Berton, R. Gurny, E. Allemann, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2003, 55, 115-124.
- 66) Y. N. Konan, J. Chevallier, R. Gurny, E. Allemann, *Photochem. Photobiol.*, 2003, 77, 638-644.
- 67) Y. N. Konan-Kouakou, R. Boch, R. Gurny, E. Allemann, *J. Controlled Release*, 2005, 103, 83-91.
- 68) A. Vargas, B. Pegaz, E. Debeve, Y. Konan-Kouakou, N. Lange, J. P. Ballini, H. Van den Bergh, R. Gurny, F. Delie, *International Journal Of Pharmaceutics*, 2004, 286, 131-145.
- 69) a) A. Vargas, N. Lange, T. Arvinte, R. Cerny, R. Gurny, F. Delie, *J. Drug Targeting*, 2009, 17, 599-609 b) A. Vargas, M. Eid, M. Fanchaouy, R. Gurny, F. Delie, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, 69, 43-53.
- 70) a) J. R. McCarthy, J. M. Perez, C. Bruckner, R. Weissleder, *Nano. Lett.*, 2005, 5, 2552-2556; b) A. J. Gomes, L. O. Lunardi, J. M. Marchetti, C. N. Lunardi, A. C. Tedesco, *Drug Delivery*, 2005, 12, 159-164.
- 71) D. Gao, H. Xu, M. A. Philbert, R. Kopelman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 2224-2227.

- 72) H.E. Bergna & W.O. Roberts, *Colloidal silica.*, CRC Press, 2006.
- 73) *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*; Bergna, H. E.; Roberts, W. O. eds.; CRC Press: Boca Raton, 2006, pp. 48-56.
- 74) I.I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. S. Y. Lin, *Adv. Funct. Mater.*, 2007, 17, 1225-1236.
- 75) S. Wang, R. Gao, F. Zhou & M. Selke, *J. Mater. Chem.*, 2004, 14, 487-493.
- 76) A. Burns, Ow, H. Ow, U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.* 2006, 35, 1028-1042.
- 77) G. Kolbe, *Ph.D. Thesis*, Jena, 1956.
- 78) W. Stober, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, 26, 62-69.
- 79) a) A. Vanblaaderen, A. P. M. J. Kentgens, *Non-Cryst. Solids*, 1992, 149, 161-178; b) A. Vanblaaderen, J. Vangeest, A. Vrij, *J. Colloid Interface Sci.*, 1992, 154, 481-501.
- 80) a) A. Vanblaaderen, A. Vrij, *Langmuir*, 1992, 8, 2921-2931; b) N. A. M. Verhaegh, A. Vanblaaderen, *Langmuir*, 1994, 10, 1427-1438.
- 81) A. Vanblaaderen, A. Vrij, *J. Colloid Interface Sci.*, 1993, 156, 1-18.
- 82) a) K. Osseo-Asare, F. J. Arriagada, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, 218, 68-76; b) F. J. Arriagada, K. Osseo-Asare, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, 211, 210-220.
- 83) X. J. Zhao, R. P. Bagwe, W. H. Tan, *Adv. Mater.*, 2004, 16, 173-174.
- 84) S. Santra, J. S. Xu, K. M. Wang, W. H. Tan, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2004, 4, 590-599.
- 85) S. Das, T. K., Jain, A., Maitra, *J. Colloid Interface Sci.*, 2002, 252, 1, 82-88.
- 86) a) I. Roy, T. Y. Ohulchansky, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty, P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 7860-7865; b) I. Roy, T. Y. Ohulchansky, D. J. Bharali, H. E. Pudavar, R. A. Mistretta, N. Kaur, P. N. Prasad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102, 279-284.
- 87) X. He, X. Wu, K. Wang, B. Shi & L. Hai, *Biomaterials*, 2009, 30, 5601-5609.
- 88) J. Qian, A. Gharibi & S. He, *J. Biomed. Opt.*, 2009, 14, 014012.
- 89) B. Z. Zhao, J. J. Yin, P. J. Bilski, C. F. Chignell, J. E. Roberts & Y. Y. He, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009, 241, 163-172.

- 90) V. Simon, C. Devaux, A. Darmon, T. Donnet, E. Thiénot, M. Germain, J. Honnorat, A. Duval, A. Pottier, E. Borghi, L. Levy & J. Marill, *Photochem. Photobiol.*, 2010, 86, 213-222.
- 91) C. Compagnin, L. Bau, M. Mognato, L. Celotti, G. Miotto, M. Arduini, F. Moret, C. Fede, F. Selvestrel, I. M. R. Echevarria, F. Mancin & E. Reddi, *Nanotechnology*, 2009, 20, 345101.
- 92) S. Kim, T. Y. Ohulchanskyy, D. Bharali, Y. H. Chen, R. K. Pandey & P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. C.*, 2009, 113, 12641-12644.
- 93) W. Tang, H. Xu, R. Kopelman & M. A. Philbert, *Photochem. Photobiol.*, 2005, 81, 242-249.
- 94) X. He, X. Wu, K. Wang, B. Shi & L. Hai, *Biomaterials*, 2009, 30, 5601-5609.
- 95) L. Zhou, J.-H. Liu, J. Zhang, S. H. Wei, Y. Y. Feng, J. H. Zhou, B. Y. Yu & J. Shen, *Int. J. Pharm.*, 2010, 386, 131-137.
- 96) H. J. Kim, K. J. Shin, M. K. Han, K. An, J. K. Lee, I. Honma & H. Kim, *Scr. Mater.*, 2009, 61, 1137-1140.
- 97) D. B. Tada, L. L. R. Vono, E. L. Duarte, R. Itri, P. K. Kiyohara, M. S. Baptista & L. M. Rossi, *Langmuir*, 2007, 23, 8194-8199.
- 98) Z. L. Chen, Y. Sun, P. Huang, X. X. Yang & X. P. Zhou, *Nanoscale Res. Lett.*, 2009, 4, 400-408.
- 99) M. O. Davydenko, E. O. Radchenko, V. M. Yashchuk, I. M. Dmitruk, Y. I. Prylutsky, O. P. Matishevska & A. A. Golub, *J. Mol. Liq.*, 2006, 127, 145-147.
- 100) B. H. L. Tu, Y. S. Lin, Y. Hung, L. W. Lo, Y. F. Chen & C. Y. Mou, *Adv. Mater.*, 2009, 21, 172-174.
- 101) L. M. Rossi, P. R. Silva, L. L. R. Vono, A. U. Fernandes, D. B. Tada & M. S. Baptista, *Langmuir*, 2008, 24, 12534-12538.
- 102) T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, L. N. Goswami, Y. Chen, E. J. Bergey, R. K. Pandey, A. R. Oseroff & P. N. Prasad, *Nano Lett.*, 2007, 7, 2835-2842.
- 103) R. R. Zhang, C. L. Wu, L. L. Tong, B. Tang & Q. H. Xu, *Langmuir*, 2009, 25, 10153-10158.
- 104) R. K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.*, 1990, 9, 253-266.

- 105) R. K. Jain, *Cancer Res.*, **1997**, *47*, 3039-3051.
- 106) Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.*, **1986**, *46*, 6387-6392.
- 107) A. K. Iyer, G. Khaled, J. Fang, H. Maeda, *Drug Discov. Today*, **2006**, *11*, 812-818.
- 108) H. Maeda, *Adv. Enzyme Regul.*, **2001**, *41*, 189-207.
- 109) R. K. Jain, *J. Control Release*, **2001**, *74*, 7-25.
- 110) T. P. Padera, B. R. Stoll, J. B. Tooredman, D. Capen, E. Di Tomaso & R. K. Jain, *Nature*, **2004**, *427*, 695.
- 111) A. Pluen, Y. Boucher, S. Ramanujan, T. D. McKee, T. Gohongi, E. Di Tomaso, E. B. Brown, Y. Izumi, R. B. Campbell, D. A. Berk, et al., *P.N.A.S.*, **2001**, *98*, 4628-4633.
- 112) M. E. Akerman, W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia & E. Ruoslahti, *P.N.A.S.*, **2002**, *99*, 12617-12621.
- 113) G. Kohler, C. Milstein, *Nature*, **1975**, *256*, 495-497.
- 114) T. M. Allen, *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 750-763.
- 115) Y. Lu, P.S. Low, *Adv. Drug Del. Rev.*, **2002**, *54*, 675-693.
- 116) J. Sudimack, R. J. Lee, *Advanced Drug Del. Rev.*, **2000**, *41*, 2, 147-162.
- 117) S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Jr. Zurawski, B. A. Kamen, *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 3396-3401.
- 118) I. G. Campbell, T. A. Jones, W. D. Foulkes, J. Trowsdale, *Cancer Res.*, **1991**, *51*, 5329-5338.
- 119) P. Garin-Chese, I. Campbell, P. E. Saigo, J. L. Jr. Lewis, L. J. Old, W. J. Retting, *Am. J. Pat.*, **1993**, *142*, 557-567.
- 120) M. S. Jhaveri, A. S. Rait, K. N. Chung, J. B. Trepel, E. H. Chang, *Mol. Cancer Ther.*, **2004**, *3*, 12, 1505-1512.
- 121) S. Rijnboutt, G. Jansen, G. Postuma, J. B. Hynes, J. H. Schornagel, G. J. Strous, *J. Cell Biol.*, **1999**, *132*, 1-2, 35-47.
- 122) B. Stella, S. Arpicco, M. T. Peracchia, D. Desmaele, J. Hoebeke, M. Renoir, J. D'Angelo, L. Cattel, P. Couvreur, *J. Pharm. Sciences*, **2000**, *89*, 1452-1464.

- 123) S. Wang, J. R. Lee, J. C. Mathias, A. M. Green, S. P. Low, *Bioconj. Chem.*, **1996**, *7*, 56-62
- 124) B. Stella, S. Arpicco, M. Arpicco, T. Peracchia, D. Desmaële, J. Hoebeke, M. Renoir, J. D'Angelo, L. Cattel, P. Couvreur, *J. of Pharm. Science*, **2000**, *89*,11.
- 125) I. R. Vlahov, H. K. R. Santhapuram, P. J. Kleindl, S. J. Howard, K. M. Stanford, C. P. Leamon, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, *16*, 5093-5096.
- 126) Y. Lu, P. S. Low, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, 675-693.
- 127) M. Wilchek, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.*, **1988**, *171*, 1-32.
- 128) R. C. Bruch, H. B. White, *Biochemistry*, **1982**, *21*, 5334-5341.
- 129) S. F. Rosebrough, *Nucl. Med. Biol.*, **1993**, *20*, 663-668.
- 130) S. F. Rosebrough, F. Hartley, *J. Nucl. RadioiodiMed.*, **1996**, *37*, 1380-1384.
- 131) D. J. Hnatowich, B. Fritz, F. Virzi, G. Mardirossian, M. Rusckowski, *Nucl. Med. Biol.*, **1993**, *20*, 189-195.
- 132) M. Rusckowski, B. Fritz, D. J. Hnatowich, *J. Nucl. Med.*, **1992**, *33*, 1810-1815.
- 133) Z. Yao, M. Zhang, H. Sakahara, T. Saga, Y. Arano, J. Konishi, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, *90*, 25-29.
- 134) G. Paganelli, M. Malcovati, F. Fazio, *Nucl. Med. Commun.*, **1991**, *12*, 211-234.
- 135) B. Fadeel, A. E. Garcia-Bennett, *Adv. Drug Del. Rev.*, **2010**, *62*, 362-374.
- 136) W. Lin, Y. W. Huang, X. D. Zhou et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **2006**, *217*, 252-259.
- 137) J. S. Chang, K. L. B. Chang et al., *Environ Sci Technol*, **2007**, *41*, 2064-2068.
- 138) Y. Jin, S. Kanna et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **2007**, *20*, 1126-1133.
- 139) M. N. Ravi Kumar, M. Gameti et al., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2004**, *4*, 876-881.